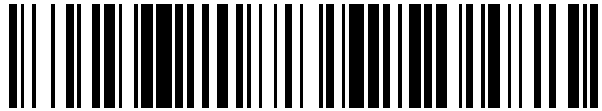


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 674**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2015 PCT/US2015/059030**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16073602**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2015 E 15802231 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3215601**

54 Título: **Métodos para la transducción y el procesamiento de células**

30 Prioridad:

**05.11.2014 US 201462075801 P**

**05.03.2015 US 201562129023 P**

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

**15.02.2021**

73 Titular/es:

**JUNO THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**

**400 Dexter Avenue North, Suite 1200**

**Seattle, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

**CRISMAN, RYAN, L.;**

**RAMSBORG, CHRIS y**

**WOOD, TRAVIS**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 805 674 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Métodos para la transducción y el procesamiento de células

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos N° 62/075.801 presentada el 5 de noviembre de 2014, titulada "Methods for Transduction and Cell Processing", y la solicitud provisional de Estados Unidos N° 62/129.023 presentada el 5 de marzo de 2015, titulada "Methods for Transduction and Cell Processing".

Campo

La presente divulgación se refiere al procesamiento de células para uso terapéutico, como para terapia celular adoptiva. Los métodos proporcionados incluyen generalmente métodos de transducción, en los que las células y las partículas de vectores virales se incuban en condiciones que dan como resultado la transducción de las células con un vector viral. La incubación puede llevarse a cabo en una cavidad interna de una cámara de centrifuga generalmente rígida, como una cámara cilíndrica hecha de plástico duro. Los métodos incluyen otros pasos de procesamiento, incluyendo los que se llevan a cabo en dicha cámara, incluyendo lavado, selección, aislamiento, cultivo y formulación. En particular, la divulgación se refiere a un método que proporciona ventajas sobre los métodos de procesamiento disponibles, como los métodos disponibles para el procesamiento a gran escala. Tales ventajas incluyen, por ejemplo, costo reducido, racionalización, eficacia aumentada, seguridad aumentada, y reproducibilidad aumentada entre diferentes sujetos y condiciones.

25 Antecedentes

Hay disponibles ciertos métodos para el procesamiento celular, incluyendo métodos a gran escala y métodos para su uso en la preparación de células para terapia celular adoptiva. Por ejemplo, hay disponibles métodos para la transferencia de vectores virales, por ejemplo, transducción, selección, aislamiento, estimulación, cultivo, lavado y formulación. Los métodos disponibles no han sido del todo satisfactorios. Se necesitan métodos mejorados, por ejemplo, para el procesamiento a gran escala, por ejemplo, transducción, de células para terapia celular adoptiva. Por ejemplo, se necesitan métodos para mejorar la eficiencia y la reproducibilidad, y para reducir el tiempo, el costo, el manejo, la complejidad y/u otros parámetros asociados con dicha producción. Entre los casos proporcionados se encuentran métodos, sistemas y kits que abordan tales necesidades.

La EP2594632A1 describe un método y dispositivo para la modificación celular.

La EP0995802A2 describe un método para la administración de ácidos nucleicos a células in vitro o ex vivo.

Naoki Nishimura et al., Human Gene Therapy, vol. 12, N° 4, pág. 333-346, describe la manipulación centrífuga de la transducción de 12 genes de interleucina mediada por adenovirus en células dendríticas derivadas de monocitos humanas.

Bahnon Alfred B et al., Journal of Virological methods, vol. 54, N° 2-3, pág. 131-143 describe la mejora centrífuga de la transferencia génica mediada por retrovirales.

La US5911983A describe terapia génica para la enfermedad de Gaucher usando vectores retrovirales.

Sumario

La invención proporciona un método de transducción, que comprende incubar, en una cavidad interna de una cámara de centrifuga, una composición de entrada que comprende células y partículas virales que contienen un vector viral recombinante, en donde: la cámara de centrifuga comprende: una pared final, una pared lateral sustancialmente rígida que se extiende desde dicha pared final, y por lo menos una abertura, en donde por lo menos una parte de dicha pared lateral rodea dicha cavidad interna y dicha por lo menos una abertura es capaz de permitir la entrada de líquido en dicha cavidad interna y la extracción de líquido desde dicha cavidad; y un miembro móvil capaz de moverse dentro de la cámara para variar el volumen interno de la cavidad interna, por lo que la cavidad interna es una cavidad de volumen variable definida por dicha pared final, dicha pared lateral sustancialmente rígida, y dicho miembro móvil; la cámara de centrifuga es rotatoria alrededor de un eje de rotación y rota alrededor de dicho eje de rotación durante por lo menos una parte de la incubación; y el método genera una composición de salida que comprende una pluralidad de las células transducidas con el vector viral. Las realizaciones de la invención se describen en algunos de los casos siguientes. La siguiente divulgación proporciona métodos para el procesamiento celular como transferencia de vectores virales y/o selección de células basada en inmunofluorescencia. En algunos casos, las células son para uso en terapia celular, tales células primarias preparadas para transferencia autóloga o alogénica, por ejemplo, en terapia celular adoptiva. Los métodos pueden incluir pasos adicionales de procesamiento

celular como lavado celular, aislamiento, separación.

En algunos casos, los métodos se llevan a cabo incubando, en un recipiente, como una cavidad interna de una cámara de centrifuga, una composición (considerada una composición de entrada), que contiene células y partículas de vectores virales, las partículas virales que conteniendo un vector viral recombinante, generando de este modo una composición de salida que contiene una pluralidad de células transducidas con el vector viral. La cámara de centrifuga típicamente es rotatoria alrededor de un eje de rotación. El eje de rotación en algunos casos es vertical. La cámara incluye típicamente una pared final, una pared lateral que se extiende desde la pared final, como una pared lateral sustancialmente rígida, y por lo menos una abertura, como una entrada/salida o una entrada y una salida. Por lo menos una parte de la pared lateral rodea generalmente la cavidad interna. La por lo menos una abertura (por ejemplo, la entrada/salida o la entrada y la salida) es capaz de permitir la entrada de líquido en la cavidad interna y la extracción de líquido desde la cavidad. La por lo menos una abertura en algunos casos es coaxial con la cámara y en algunos casos está en una pared final de la cámara. La pared lateral puede ser curvilínea, por ejemplo, cilíndrica o generalmente cilíndrica.

En algunos casos, los métodos incluyen incubar, en una cavidad interna de una cámara de centrifuga, una composición de entrada que contiene células y partículas virales que contienen un vector viral recombinante, en donde dicha cámara de centrifuga es rotatoria alrededor de un eje de rotación e incluye una pared final, una pared lateral sustancialmente rígida que se extiende desde dicha pared final, y por lo menos una abertura, por lo menos una parte de dicha pared lateral que rodea dicha cavidad interna y dicha por lo menos una abertura es capaz de permitir la entrada de líquido en dicha cavidad interna y la extracción de líquido desde dicha cavidad, en donde la cámara de centrifuga rota alrededor de dicho eje de rotación durante por lo menos una parte de la incubación y el método genera una composición de salida que contiene una pluralidad de células transducidas con el vector viral.

En algunos casos, la cámara de centrifuga incluye además un miembro móvil, como un pistón. En tales casos, la cavidad interna es generalmente una de volumen variable, por ejemplo, una cavidad de volumen variable definida por la pared final, la pared lateral y el miembro móvil, por ejemplo, el pistón, de tal manera que el miembro móvil es capaz de moverse dentro de la cámara (como axialmente dentro de la cámara) para variar el volumen interno de la cavidad. En algunos casos, el líquido se mueve dentro y fuera de la cámara alternativamente por medio de una bomba, jeringuilla y/o motor, u otro dispositivo para la entrada y la extracción de líquido o gas, que, por ejemplo, extrae líquido de la cavidad y/o empuja líquido dentro, mientras que el propio volumen de la cavidad permanece constante.

En algunos casos, los métodos incluyen incubar, en una cavidad interna de una cámara de centrifuga, una composición de entrada que contiene células y una partícula viral que contiene un vector viral recombinante, dicha cámara de centrifuga siendo rotatoria alrededor de un eje de rotación y comprendiendo una pared final, una pared lateral sustancialmente rígida que se extiende desde dicha pared final, y por lo menos una abertura, en donde por lo menos una parte de dicha pared lateral rodea dicha cavidad interna y dicha por lo menos una abertura es capaz de permitir la entrada de líquido en dicha cavidad interna y la extracción de líquido desde dicha cavidad, en donde la cámara de centrifuga está rotando alrededor del eje de rotación durante por lo menos una parte de la incubación, el volumen de líquido total de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad durante la rotación de dicha cámara de centrifuga no es más de aproximadamente 5 ml por pulgada cuadrada del área superficial interna de la cavidad y el método genera una composición de salida que comprende una pluralidad de células transducidas con el vector viral.

La cámara puede comprender dos paredes finales. En algunos de tales casos, una pared final junto con otras características define la cavidad interna, mientras que la otra está fuera de la cavidad. En algunos casos, la cavidad está unida por ambas paredes finales.

La por lo menos una abertura puede comprender: una entrada y una salida, respectivamente capaces de permitir dicha entrada y extracción, o una sola entrada/salida, capaz de permitir dicha entrada y dicha extracción.

Típicamente, la incubación se lleva a cabo por lo menos en parte bajo rotación de la cámara, como bajo fuerza centrífuga o aceleración. Por tanto, los métodos en algunos casos incluyen además efectuar la rotación de la cámara de centrifuga, como alrededor de su eje de rotación, durante por lo menos una parte de la incubación.

En algunos de tales casos, dicha rotación incluye rotación a una fuerza centrífuga relativa (RCF) en una superficie interna de la pared lateral de la cavidad y/o en una capa superficial de las células de más de aproximadamente 200 g, de más de aproximadamente 300 g, o de más de aproximadamente 500 g. En algunos de tales casos, dicha rotación incluye la rotación a una fuerza centrífuga relativa en una superficie interna de la pared lateral de la cavidad y/o en una capa superficial de las células que es: a o aproximadamente 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2100 g, 2200 g, 2500 g o 3000 g; o por lo menos aproximadamente 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2100 g, 2200 g, 2500 g, o 3000 g. En algunos de tales casos, dicha rotación incluye rotación a una fuerza centrífuga relativa en una superficie interna de la pared lateral de la cavidad y/o en una capa superficial de las células que es: entre o entre aproximadamente 1000 y 3600, 1000 y 3200, 1000 y 2800, 1000 y 2000, 1000 y 1600, 1600 y 3600, 1600 y 3200,

1600 y 2800, 1600 y 2000, 2000 y 3600, 2000 y 3200, 2000 y 2800, 2800 y 3600, 2800 y 3200, 3200 y 3600, cada uno incluido; o por lo menos a o aproximadamente 2000 g, 2100, 2200 g, 2400 g, 2600 g, 2800 g, 3000 g, 3200 g o 3600 g; a o aproximadamente 2000 g, 2100 g, 2200 g, 2400 g, 2600 g, 2800 g, 3000 g, 3200 g o 3600 g.

5 En algunos de tales casos, la por lo menos una parte de la incubación durante la cual la cámara rota es durante un tiempo que es: de más de o aproximadamente 5 minutos, como de más de o aproximadamente 10 minutos, de más de o aproximadamente 15 minutos, de más de o aproximadamente 20 minutos, de más de o aproximadamente 30 minutos, de más de o aproximadamente 45 minutos, de más de o aproximadamente 60 minutos, de más de o aproximadamente 90 minutos o de más de o aproximadamente 120 minutos; o entre o entre  
10 aproximadamente 5 minutos y 60 minutos, 10 minutos y 60 minutos, 15 minutos y 60 minutos, 15 minutos y 45 minutos, 30 minutos y 60 minutos o 45 minutos y 60 minutos, cada uno incluido.

15 En algunos casos, la composición de entrada (o el número de células) en la cavidad durante la incubación, por ejemplo, en cualquier momento o durante toda la incubación, y/o procesada por los métodos, incluye en o aproximadamente o por lo menos aproximadamente  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  o  $5 \times 10^8$  de las células.

20 En algunos de tales casos, dicha composición de entrada en la cavidad contiene por lo menos o aproximadamente  $1 \times 10^7$  de dichas células, por lo menos o aproximadamente  $2 \times 10^7$  de dichas células,  $3 \times 10^7$  de dichas células, por lo menos o aproximadamente  $4 \times 10^7$  de dichas células, por lo menos o aproximadamente  $5 \times 10^7$  de dichas células, por lo menos o aproximadamente  $6 \times 10^7$  de dichas células, por lo menos o aproximadamente  $7 \times 10^7$  de dichas células, por lo menos o aproximadamente  $8 \times 10^7$  de dichas células, por lo menos o aproximadamente  $9 \times 10^7$  de dichas células, por lo menos o aproximadamente  $1 \times 10^8$  de dichas células, por lo menos o aproximadamente  $2 \times 10^8$  de dichas células, por lo menos o aproximadamente  $3 \times 10^8$  de dichas células o por lo menos o aproximadamente  $4 \times 10^8$  de dichas células.

25 En algunos casos, el área de superficie interna de la cavidad es de por lo menos o aproximadamente  $1 \times 10^9 \mu\text{m}^2$  o  $1 \times 10^{10} \mu\text{m}^2$ , y/o la longitud de la pared lateral en la dirección que se extiende desde la pared final es de por lo menos aproximadamente 5 cm y/o por lo menos aproximadamente 8 cm; y/o la cavidad interna tiene un radio de por lo menos aproximadamente 2 cm en por lo menos una sección transversal.

30 En algunos casos, la composición de entrada incluye por lo menos o aproximadamente 1 unidad infecciosa (UI) por una de las células, por lo menos o aproximadamente 2 UI por una de las células, por lo menos o aproximadamente 3 UI por una de las células, por lo menos o aproximadamente 4 UI por una de las células, por lo menos o aproximadamente 5 UI por una de las células, por lo menos o aproximadamente 10 UI por una de las células, por lo menos o aproximadamente 20 UI por una de las células, por lo menos o aproximadamente 30 UI por una de las células, por lo menos o aproximadamente 40 UI por una de las células, por lo menos o aproximadamente 50 UI por una de las células, o por lo menos o aproximadamente 60 UI por una de las células. En algunos casos, la composición de entrada incluye 1 o aproximadamente 1 unidad infecciosa (UI) por una de las células, 2 o aproximadamente 2 UI por una de las células, 3 o aproximadamente 3 UI por una de las células, 4 o aproximadamente 4 UI por una de las células, 5 o aproximadamente 5 UI por una de las células, 10 o aproximadamente 10 UI por una de las células, 20 o aproximadamente 20 UI por una de las células, 30 o aproximadamente 30 UI por una de las células, 40 o aproximadamente 40 UI por una de las células, 50 o aproximadamente 50 UI por una de las células, o 60 o aproximadamente 60 UI por una de las células.

45 En algunos casos, el volumen de líquido medio o el volumen de líquido máximo de la composición de entrada, composición con partículas y células de vectores virales, y/o cualquier composición líquida presente en la cavidad durante la incubación no es de más de aproximadamente 10, 5 o 2,5 mililitros (ml) por pulgada cuadrada del área de superficie interna de la cavidad durante la incubación. En algunos casos, el volumen total máximo de dicha composición líquida presente en la cavidad en cualquier momento durante la incubación no es de más de 2 veces, no más de 10 veces, no más de 100 veces, no más de 500 veces o no más de 1000 veces el volumen total de las células. En algunos casos, el volumen total de células es el volumen total de un sedimento de las células. En algunos casos, el volumen total de células es el volumen de una monocapa de las células, como una monocapa de células presentes en la superficie interna de la cavidad durante la rotación de la cámara de centrífuga.

55 En algunos casos, el volumen de líquido de la composición de entrada ocupa todo o sustancialmente todo el volumen de la cavidad interna durante por lo menos una parte de la incubación. En otros casos, durante por lo menos una parte de la incubación, el volumen de líquido de la composición de entrada ocupa solo una parte del volumen de la cavidad interna, el volumen de la cavidad durante esta por lo menos una parte comprendiendo además un gas, que es tomado en la cavidad, por ejemplo, a través de dicha por lo menos una abertura u otra  
60 abertura, antes o durante la incubación.

65 En algunos de tales casos, el volumen de líquido de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad durante dicha rotación está entre o entre aproximadamente 0,5 ml por pulgada cuadrada del área de superficie interna de la cavidad (ml/pulgada cuadrada) y 5 ml/pulgada cuadrada, 0,5 ml/pulgada cuadrada y 2,5 ml/pulgada cuadrada, 0,5 ml/pulgada cuadrada y 1 ml/pulgada cuadrada, 1 ml/pulgada cuadrada y 5 ml/pulgada

## ES 2 805 674 T3

cuadrada, 1 ml/pulgada cuadrada y 2,5 ml/pulgada cuadrada o 2,5 ml/pulgada cuadrada y 5 ml/pulgada cuadrada.

5 En algunos de tales casos, el volumen de líquido total máximo de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad en cualquier momento durante dicha incubación no es más de 2 veces, no más de 10 veces, o no más de 100 veces, el volumen total de dichas células en dicha cavidad o el volumen medio de la composición de entrada en el transcurso de la incubación no es más de 2, 10 o 100 veces el volumen total de células en la cavidad.

10 En algunos de tales casos, el volumen máximo de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad en cualquier momento durante dicha incubación o el volumen medio durante el transcurso de la incubación no es de más de 2 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, o 1000 veces el volumen de una monocapa de dichas células formadas en la superficie interior de dicha cavidad durante la rotación de dicha cámara a una fuerza de o de aproximadamente 2000 g en una superficie interna de dicha pared lateral.

15 En algunos de tales casos, el volumen de líquido de la composición de entrada no es de más de 20 ml, no más de 40 ml, no más de 50 ml, no más de 70 ml, no más de 100 ml, no más de 120 ml, no más de 150 ml o no más de 200 ml.

20 En algunos de tales casos, durante por lo menos una parte de la incubación en la cámara o durante la rotación de la cámara, el volumen de líquido de la composición de entrada ocupa solo una parte del volumen de la cavidad interna de la cámara, el volumen de la cavidad durante dicha por lo menos una parte o durante dicha rotación comprende además un gas, dicho gas tomado en dicha cavidad a través de dicha por lo menos una abertura, antes o durante dicha incubación.

25 En algunos casos, la cámara de centrífuga incluye un miembro móvil, por lo que la entrada de gas en la cámara de centrífuga efectúa el movimiento del miembro móvil para aumentar el volumen de la cavidad interna de la cámara, disminuyendo de este modo el volumen total de líquido de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad durante la rotación de dicha cámara de centrífuga por pulgada cuadrada del área superficial interna de la cavidad en comparación con la ausencia de gas en la cámara.

30 En algunos casos, el número de células en la cavidad durante la incubación es igual o aproximadamente el número de células suficiente para formar una monocapa en la superficie interna de la cavidad durante la rotación de la cámara de centrífuga a una fuerza de o de aproximadamente 2000 g y/o no es más de 1,5 veces o 2 veces ese número de células.

35 En algunos de tales casos, el número de dichas células en dicha composición de entrada es igual o aproximadamente el número de dichas células suficiente para formar una monocapa en la superficie de dicha cavidad durante la rotación de dicha cámara de centrífuga a una fuerza de o de aproximadamente 2000 g en una superficie interna de la pared lateral; y/o el número de dichas células en dicha composición de entrada no es más de 1,5 veces o 2 veces el número de dichas células suficiente para formar una monocapa en la superficie de dicha cavidad durante la rotación de dicha cámara de centrífuga con una fuerza de o de aproximadamente 2000 g en una superficie interna de la pared lateral.

40 En algunos casos, la centrifugación tiene una duración de entre 120 y 7200 segundos, como entre 120 y 3600 segundos, incluyendo valores incluidos o dentro del intervalo, tales como valores de minutos completos inclusive o dentro del intervalo.

45 En algunos casos, los métodos incluyen a) proporcionar a una cavidad interna de una cámara de centrífuga que tiene un área de superficie interna de por lo menos  $1 \times 10^9 \mu\text{m}^2$  o por lo menos  $1 \times 10^{10} \mu\text{m}^2$ : i) una composición de entrada que incluye células y partículas virales que contienen un vector viral recombinante, en donde: el número de células en la composición de entrada es de por lo menos  $1 \times 10^7$  células, y las partículas virales están presentes en la composición de entrada por lo menos a o aproximadamente a 1 unidad infecciosa (UI) por una de dichas células, y la composición de entrada contiene un volumen de líquido que es menor que el volumen máximo de la cavidad interna de la cámara de centrífuga; y ii) gas, a un volumen que es hasta el resto del volumen máximo de la cavidad interna de la cámara de centrífuga; y b) incubar la composición de entrada, en donde por lo menos una parte de la incubación se lleva a cabo en dicha cavidad interna de dicha cámara de centrífuga mientras se efectúa la rotación de dicha cámara de centrífuga; y en donde el método genera una composición de salida que contiene una pluralidad de las células transducidas con el vector viral.

50 En algunos casos, el número de células es por lo menos o aproximadamente  $50 \times 10^6$  células;  $100 \times 10^6$  células; o  $200 \times 10^6$  células; y/o las partículas virales están presentes a por lo menos 1,6 UI/célula, 1,8 UI/célula, 2,0 UI/célula, 2,4 UI/célula, 2,8 UI/célula, 3,2 UI/célula o 3,6 UI/célula, 4,0 UI/célula, 5,0 IU/célula, 6,0 IU/célula, 7,0 IU/célula, 8,0 IU/célula, 9,0 IU/célula o 10,0 IU/célula.

60 En algunos de tales casos, el volumen de líquido de la composición de entrada es menor o igual a 200 ml, menor o igual a 100 ml o menor o igual a 50 ml o menor o igual a 20 ml. En algunos de tales casos, el volumen de

## ES 2 805 674 T3

gas es de hasta 200 ml, hasta 180 ml, hasta 140 ml o hasta 100 ml.

5 En algunos de tales casos, dicha rotación es a una fuerza centrífuga relativa en una superficie interna de la pared lateral de la cavidad o en una capa superficial de las células de por lo menos igual a o aproximadamente 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2400 g, 2600g, 2800 g, 3000 g, 3200 g o 3600 g.

En algunos casos, los métodos son para procesamiento a gran escala.

10 En algunos casos, la composición en la cavidad (por ejemplo, composición de entrada) incluye por lo menos 50 ml, por lo menos 100 ml o por lo menos 200 ml, volumen de líquido y/o por lo menos o aproximadamente 1 millón de células por cm<sup>2</sup> del área superficial interna de la cavidad durante por lo menos una parte de dicha incubación.

15 En algunos casos, el volumen máximo de líquido de la composición de entrada presente en la cavidad en cualquier momento durante dicha incubación no es de más de aproximadamente 2 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, o 1000 veces el volumen de una monocapa de dichas células formadas en la superficie interna de dicha cavidad durante la rotación de dicha cámara, por ejemplo, a una fuerza, por ejemplo, fuerza efectiva, de aproximadamente 2000 g.

20 En algunos casos, la rotación de la cámara durante por lo menos una parte de la incubación tes a una fuerza de más de o de aproximadamente 200 g, de más de o de aproximadamente 300 g, o de más de o de aproximadamente 500 g, como de más de o de aproximadamente 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g, o 3200 g, en una pared interna de la cavidad de la cámara de centrífuga y/o una capa, por ejemplo, la capa superficial, de células. En algunos casos, la fuerza es de por lo menos o de aproximadamente 1000 g, 1500 g, 2000 g, o 2500 g, 25 En algunos casos, la fuerza es de aproximadamente 2100 g, 2200 g o 3000 g.

30 En algunos casos, los métodos incluyen incubar una composición de entrada que contiene células y partículas virales que contienen un vector viral recombinante, por lo menos una parte de dicha incubación llevándose a cabo en condiciones de rotación, generando de este modo una composición de salida que contiene una pluralidad de células transducidas con el vector viral, en donde dicha composición de entrada contiene más de o aproximadamente 20 ml, 50 ml, por lo menos 100 ml, o por lo menos 150 ml en volumen, y/o dicha composición de entrada comprende por lo menos  $1 \times 10^8$  células; y dichas condiciones de rotación comprenden una fuerza centrífuga relativa sobre una capa superficial de las células de más de aproximadamente 1500 g.

35 En algunos casos de los métodos, por lo menos el 25% o por lo menos el 50% de dichas células en la composición de salida se transducen con dicho vector viral; y/o por lo menos el 25% o por lo menos el 50% de dichas células en la composición de salida expresan un producto de un ácido nucleico heterólogo contenido dentro de dicho vector viral.

40 En algunos de tales casos, dicha incubación se lleva a cabo en una cavidad de una cámara de centrífuga y el número de dichas células en dicha composición de entrada es igual a o aproximadamente el número de dichas células suficiente para formar una monocapa o una bicapa en la superficie interna de dicha cavidad durante dicha rotación.

45 En algunos casos, dicha cámara de centrífuga incluye una pared final, una pared lateral sustancialmente rígida que se extiende desde dicha pared final, y por lo menos una abertura, en donde por lo menos una parte de dicha pared lateral rodea dicha cavidad interna y dicha por lo menos una abertura es capaz de permitir la entrada de líquido en dicha cavidad interna y la extracción de líquido desde dicha cavidad,

50 En algunos casos, dicha cámara de centrífuga incluye además un miembro móvil y dicha cavidad interna es una cavidad de volumen variable definida por dicha pared final, dicha pared lateral sustancialmente rígida y dicho miembro móvil, dicho miembro móvil siendo capaz de moverse dentro la cámara para variar el volumen interno de la cavidad.

55 En algunos de tales casos, la composición de entrada en dicha cavidad contiene un volumen de líquido de por lo menos 20 ml o por lo menos 50 ml y 1 millón o aproximadamente 1 millón de células por cm<sup>2</sup> del área superficial interna de la cavidad durante por lo menos una parte de dicha incubación.

60 En algunos de tales casos, una parte adicional de la incubación se lleva a cabo fuera de la cámara de centrífuga y/o sin rotación, dicha parte adicional se lleva a cabo después de la por lo menos una parte llevada a cabo en la cámara y/o con rotación

65 En algunos de tales casos, la por lo menos una parte de la incubación llevada a cabo en la cavidad de la cámara de centrífuga y/o la parte adicional de la incubación se efectúa a o aproximadamente a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

En algunos de tales casos, la incubación incluye además transferir por lo menos una pluralidad de las células a un recipiente durante dicha incubación y dicha parte adicional de la incubación se efectúa en el recipiente. En algunos casos, la transferencia se realiza dentro de un sistema cerrado, en el que la cámara de centrifuga y el recipiente son integrales al sistema cerrado.

5 En algunos de tales casos, la incubación se lleva a cabo durante un tiempo entre de o aproximadamente 1 hora y de o aproximadamente 96 horas, entre o aproximadamente 4 horas y de o aproximadamente 72 horas, entre o aproximadamente 8 horas y de o aproximadamente 48 horas, entre de o aproximadamente 12 horas y de o aproximadamente 36 horas, entre de o aproximadamente 6 horas y de o aproximadamente de 24 horas, entre de o aproximadamente de 36 horas y de o aproximadamente de 96 horas, inclusive; o la parte adicional de la incubación se lleva a cabo durante un tiempo entre de o aproximadamente 1 hora y de o aproximadamente 96 horas, entre de o aproximadamente 4 horas y de o aproximadamente 72 horas, entre de o aproximadamente 8 horas y de o aproximadamente 48 horas, entre de o aproximadamente 12 horas y de o aproximadamente 36 horas, entre de o aproximadamente 6 horas y de o aproximadamente 24 horas, entre de o aproximadamente 36 horas y de o aproximadamente 96 horas, inclusive.

20 En algunos de tales casos, la incubación o una parte adicional de la incubación se lleva a cabo durante un tiempo que no es más de 48 horas, no más de 36 horas o no más de 24 horas; o la parte adicional de la incubación se lleva a cabo durante un tiempo que no es más de 48 horas, no más de 36 horas o no más de 24 horas.

En algunos de tales casos, la incubación se realiza en presencia de un agente de estimulación; y/o la parte adicional de la incubación se realiza en presencia de un agente de estimulación.

25 En algunos de tales casos, la incubación se lleva a cabo durante un tiempo que no es más de 24 horas; las células en la composición no han sido sometidas a una temperatura de más de 30° C durante más de 24 horas; y/o la incubación no se realiza en presencia de un agente de estimulación.

30 En algunos de tales casos, el agente de estimulación es un agente capaz de inducir la proliferación de células T, células T CD4+ y/o células T CD8+.

En algunos de tales casos, el agente de estimulación es una citoquina seleccionada entre IL-2, IL-15 e IL-7.

35 En algunos de tales casos, la composición de salida que contiene células transducidas contiene por lo menos  $1 \times 10^7$  células o por lo menos  $5 \times 10^7$  células.

En algunos de tales casos, la composición de salida que contiene células transducidas contiene por lo menos  $1 \times 10^8$  células,  $2 \times 10^8$  células,  $4 \times 10^8$  células,  $6 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$  células o  $1 \times 10^9$  células.

40 En algunos de tales casos, las células son células T. En algunos casos, las células T son células T no fraccionadas, células T CD4+ aisladas y/o células T CD8+ aisladas.

45 En algunos de tales casos, el método da como resultado la integración del vector viral en un genoma huésped de una o más de por lo menos una pluralidad de células y/o en un genoma huésped del o por lo menos de aproximadamente el 20% o de por lo menos el o aproximadamente el 30% o por lo menos el o aproximadamente el 40% de las células en la composición de salida.

50 En algunos de tales casos, por lo menos el 2,5%, por lo menos el 5%, por lo menos el 6%, por lo menos el 8%, por lo menos el 10%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, o por lo menos el 75% de dichas células en dicha composición de entrada se transducen con dicho vector viral mediante el método; y/o por lo menos el 2,5%, por lo menos el 5%, por lo menos el 6%, por lo menos el 8%, por lo menos el 10%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, o por lo menos el 75% de dichas células en dicha composición de salida se transducen con dicho vector viral; y/o por lo menos el 2,5%, por lo menos el 5%, por lo menos el 6%, por lo menos el 8%, por lo menos el 10%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, o por lo menos el 75% de dichas células en dicha composición de salida expresan un producto de un ácido nucleico heterólogo contenido dentro de dicho vector viral.

60 Los casos particulares incluyen métodos de transducción llevados a cabo incubando una composición de entrada que comprende células y partículas de vectores virales en condiciones de rotación, por lo que se inocula una pluralidad de las células para la transducción con el vector viral, en donde la composición de entrada incluye un volumen total de más de 50 ml, como por lo menos 100 ml, o por lo menos 150 ml en volumen, y/o dicha composición de entrada comprende por lo menos  $1 \times 10^8$  células; y las condiciones de rotación comprenden una fuerza centrífuga de más de aproximadamente 1500 g. En algunos de tales casos, la incubación se lleva a cabo en una cavidad de una cámara de centrifuga y el número de dichas células en dicha composición de entrada es igual a o aproximadamente el número de dichas células suficiente para formar una monocapa en la superficie interna de la

cavidad durante la rotación. En algunos de tales casos, por lo menos el 25% o por lo menos el 50% de dichas células se transducen con el vector viral.

5 En algunos casos, los métodos dan como resultado por lo menos el 2,5%, por lo menos el 5%, por lo menos el 6%, por lo menos el 8%, por lo menos el 10%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, o por lo menos el 75% de dichas células en dicha composición de entrada que se transducen con el vector viral, y/o producen una composición de salida en la que por lo menos el 10%, por lo menos el 25%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, o por lo menos el 75% de las células se transducen con el vector y/o expresan un producto recombinante codificado por el vector. En algunos casos, la eficiencia de transducción se expresa para una cantidad de entrada particular o una cantidad relativa de virus. Por ejemplo, en algunos casos, tales eficiencias se logran mediante los métodos para una composición de entrada que comprende un virus en una proporción de aproximadamente 1 o aproximadamente 2 UI por célula.

15 En algunos casos, entre todas las células en dicha composición de salida producidas por los métodos, el número de copias medio del vector viral recombinante no es de más de aproximadamente 10, no más de aproximadamente 5, no más de aproximadamente 2,5, o no más de aproximadamente 1,5. En algunos casos, entre las células en la composición de salida que contienen el vector viral recombinante, el número de copias medio del vector no es de más de aproximadamente 5, no más de aproximadamente 2, no más de aproximadamente 1,5, o no más de aproximadamente 1.

25 En algunos de cualquiera de tales casos, entre todas las células en dicha composición de salida que contienen el vector viral recombinante o en las que está integrado el vector viral, el número de copias medio de dicho vector viral recombinante no es de más de aproximadamente 10, no más de aproximadamente 5, no más de aproximadamente 2,5, o no más de aproximadamente 1,5; o entre las células en la composición de salida, el número de copias medio de dicho vector no es de más de aproximadamente 2, no más de aproximadamente 1,5, o no más de aproximadamente 1.

30 En algunos casos, la cámara de centrifuga es integral a un sistema cerrado, por ejemplo, donde el sistema cerrado incluye la cámara y por lo menos una línea de tubos conectada operativamente a la por lo menos una abertura a través de por lo menos un conector, de tal manera que se permite que el líquido y el gas se muevan entre dicha cavidad y dicha por lo menos una línea de tubos en por lo menos una configuración del sistema. La por lo menos una línea de tubos incluye típicamente una serie de líneas de tubos. El por lo menos un conector incluye típicamente una pluralidad de conectores. El sistema cerrado puede incluir además por lo menos un recipiente conectado operativamente a la serie de líneas de tubos, de tal manera que la por lo menos una conexión permite que el líquido y/o el gas pase entre el por lo menos un recipiente y la por lo menos una abertura a través de la serie de líneas de tubos.

40 El por lo menos un conector puede incluir uno o más conectores seleccionados del grupo que consiste de válvulas, puertos Luer y espigas, por ejemplo, una válvula rotacional, como una llave de paso o puerto multirrotatorio, y/o un conector aséptico.

45 El por lo menos un recipiente puede incluir una o más bolsas, viales y/o jeringuillas, y puede incluir recipientes designados como un recipiente de diluyente, un recipiente de residuos, un recipiente de recolección de producto, un recipiente de salida y/o un recipiente de entrada.

50 En algunos casos, el por lo menos un recipiente incluye por lo menos un recipiente de entrada que incluye el virus y/o las células (que puede ser un recipiente de entrada único que comprende el virus y las células o dos recipientes de entrada que comprenden el virus y las células, respectivamente), un recipiente de residuos, un recipiente de producto, y por lo menos un recipiente que contiene diluyente o solución de lavado, cada uno conectado a dicha cavidad a través de dicha serie de líneas de tubos y la por lo menos una abertura.

55 En algunos de tales casos, por lo menos un recipiente incluye además un recipiente que contiene un gas antes y/o durante por lo menos un punto durante dicha incubación y/o el sistema cerrado incluye además un filtro microbiano capaz de absorber el gas a la cavidad interna de la cámara de centrifuga y/o el sistema cerrado contiene un puerto de jeringuilla para efectuar la entrada de gas.

60 Los métodos en algunos casos incluyen además, antes y/o durante la incubación, efectuar la entrada de la composición de entrada en dicha cavidad. La entrada puede incluir el flujo de líquido desde por lo menos un recipiente de entrada a la cavidad a través de dicha por lo menos una abertura. La entrada puede incluir la entrada de virus desde un recipiente de entrada y la entrada de células desde otro, para producir la composición de entrada para la incubación.

65 En algunos casos, el método incluye, antes y/o durante dicha incubación, proporcionar o efectuar la entrada de gas en dicha cavidad en condiciones estériles, dicha entrada efectuándose mediante (a) flujo de gas desde el



recipiente que incluye gas, (b) flujo de gas desde un entorno externo al sistema cerrado, a través del filtro microbiano, o (c) flujo de gas desde una jeringuilla conectada al sistema en el puerto de la jeringuilla.

5 En algunos casos, la entrada efectiva del gas en la cavidad interna de la cámara de centrífuga se lleva a cabo simultáneamente o junto con la entrada efectiva de la composición de entrada a la cavidad interna de la cámara de centrífuga.

10 En algunos de tales casos, la composición de entrada y el gas se combinan en un único recipiente en condiciones estériles fuera de la cámara antes de dicha entrada de dicha composición de entrada y gas en la cavidad interna de la cámara de centrífuga.

En algunos casos, efectuar la entrada del gas se lleva a cabo por separado, ya sea simultánea o secuencialmente, desde el efecto de la entrada de la composición de entrada en dicha cavidad.

15 En algunos de tales casos, la entrada de gas se efectúa permitiendo o provocando el flujo del gas desde un recipiente cerrado estéril que contiene el gas, un entorno externo a través de un filtro microbiano, o una jeringuilla que contiene dicho gas.

20 En algunos de tales casos, el gas es aire.

25 En algunos casos de los métodos de proceso proporcionados, la incubación es parte de un proceso continuo, donde el método incluye además, durante por lo menos una parte de la incubación, efectuar la entrada continua de dicha composición de entrada en la cavidad, típicamente durante la rotación de la cámara, y durante una parte de la incubación, efectuar la extracción continua (es decir, la salida) de líquido desde dicha cavidad a través de dicha por lo menos una abertura, típicamente durante la rotación de la cámara. La entrada y salida continuas en algunos casos se producen simultáneamente.

30 En algunos casos, el método incluye durante una parte de dicha incubación, efectuar una entrada continua de gas en dicha cavidad durante la rotación de la cámara; y/o durante una parte de dicha incubación, efectuar una extracción continua de gas desde dicha cavidad.

En algunos casos, el método incluye la extracción de líquido y la extracción de gas de dicha cavidad, donde cada uno se extrae, simultánea o secuencialmente, a un recipiente diferente.

35 En algunos de tales casos, por lo menos una parte de la entrada continua y la extracción continua se producen simultáneamente.

40 En algunos casos, la incubación es parte de un proceso semicontinuo, como uno en el que el método incluye además efectuar la entrada de la composición de entrada en la cavidad a través de por lo menos una abertura, realizando toda o parte de la incubación, como la centrifugación, y luego efectuando la extracción de líquido desde la cavidad, y luego repitiendo el proceso, mediante el cual otra composición de entrada es llevada a la cavidad, seguido de centrifugación, seguido de extracción. El proceso puede ser iterativo e incluir varias rondas más de entrada, procesamiento y extracción.

45 En algunos de tales casos, la incubación es parte de un proceso semicontinuo, el método incluye además antes de dicha incubación, efectuar la entrada de dicha composición de entrada, y opcionalmente gas, en dicha cavidad a través de dicha por lo menos una abertura; posterior a dicha incubación, efectuar la extracción de líquido y/o opcionalmente gas de dicha cavidad; efectuar la entrada de otra composición de entrada que incluye células y dichas partículas virales que contienen un vector viral recombinante, y opcionalmente gas, en dicha cavidad interna; e incubar dicha otra composición de entrada en dicha cavidad interna, en donde el método genera otra composición de salida que contiene una pluralidad de células de la otra composición de entrada que se transducen con dicho vector viral.

50 En algunos de tales casos, dicho suministro o dicha entrada de la composición de entrada en la cavidad incluye la entrada de una composición individual que incluye las células y las partículas virales que contienen el vector viral recombinante; o la entrada de una composición que incluye las células y una composición separada que contiene las partículas virales que contienen el vector viral recombinante, por lo que las composiciones se mezclan, efectuando la entrada de la composición de entrada.

60 La entrada puede incluir la entrada de una composición única que contiene las células y el virus; o la entrada de una composición que contiene las células y una composición separada que contiene el virus, por lo cual las composiciones se mezclan, efectuando la entrada de la composición de entrada. En algunos casos del proceso continuo o semicontinuo, por lo menos  $1 \times 10^8$  células o por lo menos  $1 \times 10^9$  células o por lo menos  $1 \times 10^{10}$  células o más se procesan en total, a lo largo de las múltiples rondas o proceso continuo.

65

En algunos casos, el método incluye efectuar la rotación de la cámara de centrífuga antes y/o durante dicha incubación y efectuar la extracción de líquido desde la cavidad en dicho recipiente de residuos después de la incubación; efectuar la extracción de líquido desde por lo menos un recipiente de diluyente en dicha cavidad a través de la por lo menos una abertura y efectuar la mezcla de los contenidos de la cavidad; y efectuar la extracción de líquido desde dicha cavidad en el recipiente del producto, transfiriendo de este modo las células transducidas con el vector viral a la bolsa del producto.

En algunos casos, el método incluye además llevar a cabo otros pasos de procesamiento, o por lo menos una parte de uno o más de otros pasos de procesamiento, dentro de la misma cámara y/o sistema cerrado. En algunos casos, el uno o más pasos de procesamiento pueden incluir procesos en los que las células están aisladas, como separadas o seleccionadas, estimuladas y formuladas dentro de la misma cámara y/o sistema cerrado. En algunos casos, el uno o más pasos de procesamiento adicionales también pueden incluir lavar células, suspender células y/o diluir o concentrar células, que pueden llevarse a cabo antes o después de uno o más de los pasos de procesamiento para aislar, como separar o seleccionar, estimular, transducir y/o formular las células. En algunos casos, el uno o más de otros pasos de procesamiento pueden llevarse a cabo antes de, simultáneamente con o después de la incubación de células con las partículas del vector viral en los métodos de transducción. En algunos casos, el uno o más pasos de procesamiento adicionales, o una parte del uno o más pasos de procesamiento adicionales, pueden llevarse a cabo en una cavidad de una cámara de centrífuga que sea igual o diferente a la cavidad de una cámara de centrífuga empleada en la incubación de las células con las partículas del vector viral.

Entre los métodos de procesamiento proporcionados, que incluyen aislamiento, por ejemplo, métodos de selección, métodos de estimulación, métodos de formulación y otros métodos de procesamiento, se encuentran aquellos realizados de acuerdo con cualquiera de los casos descritos anteriormente.

Por ejemplo, en algunos casos, el método incluye además (a) lavar una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre completa, una muestra de capa leucocitaria, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una muestra de células T no fraccionadas, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis, un producto de leucaféresis) que contiene células en una cavidad de una cámara, antes de la incubación para aislar, por ejemplo seleccionar células, y/o antes de la incubación para incubar las células con partículas de un vector viral, (b) aislar, por ejemplo seleccionar, las células de una muestra (por ejemplo, una muestra de sangre completa, una muestra de capa leucocitaria, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una muestra de células T no fraccionadas, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis, un producto de leucaféresis) en una cavidad antes de la incubación de tales células con partículas de un vector viral y/o (c) estimular las células en una cavidad antes de y/o durante la incubación de tales células con partículas de un vector viral, por ejemplo, exponiendo las células a condiciones de estimulación, induciendo de este modo la proliferación de las células de la composición de entrada. En algunos casos, el aislamiento incluye una selección basada en inmunofinidad.

En algunos de tales casos, el método incluye (a) lavar una muestra biológica que contiene dichas células en una cavidad interna de una cámara de centrífuga antes de dicha incubación; y/o (b) aislar dichas células de una muestra biológica, en donde por lo menos una parte del paso de aislamiento se realiza en una cavidad interna de una cámara de centrífuga antes de dicha incubación; y/o (c) estimular células antes de y/o durante dicha incubación, dicha estimulación incluye exponer dichas células a condiciones de estimulación, induciendo de este modo que proliferen las células de la composición de entrada, en donde por lo menos una parte del paso de estimular las células se realiza en una cavidad interna de una cámara de centrífuga.

En algunos casos, los métodos pueden incluir además el aislamiento, por ejemplo, selección, de las células en la cámara, por ejemplo, mediante selección basada en inmunofinidad. En algunos casos, el aislamiento, por ejemplo, la selección de las células se lleva a cabo antes de la incubación de las células con las partículas del vector viral en los métodos de transducción, por lo que las células aisladas, como las seleccionadas, son las células presentes en la composición de entrada y/o incubadas con las partículas del vector viral. En algunos casos, el aislamiento, por ejemplo, selección, incluye la incubación de células con un reactivo de selección, como un reactivo de inmunofinidad. En algunos casos, por lo menos una parte del paso de aislamiento, por ejemplo, selección, como incubación de células con un reactivo de selección, por ejemplo, un reactivo de inmunofinidad, se lleva a cabo en la cavidad de una cámara, que, en algunos casos, puede incluir la rotación de la cámara, por ejemplo, para mezclar el reactivo y las células.

En algunos casos, los métodos pueden incluir además estimular células antes, durante y/o después de la incubación de células con las partículas del vector viral, en las que por lo menos la totalidad o una parte de la estimulación puede llevarse a cabo en una cavidad de una cámara de centrífuga. En algunos casos, las condiciones de estimulación pueden incluir la incubación de células en presencia de un agente capaz de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR, como un agente primario que se une específicamente a un miembro de un Complejo TCR, por ejemplo, CD3, y un agente secundario que se une específicamente a una molécula coestimuladora de células T, por ejemplo, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 o ICOS, incluyendo anticuerpos como los presentes en la superficie de un soporte sólido, como una perla. En algunos casos,

por lo menos una parte de la estimulación, como la incubación de las células en presencia de una condición de estimulación, se lleva a cabo en la cavidad de una cámara que, en algunos casos, puede incluir la rotación de la cámara, por ejemplo, para mezclar el reactivo y las células.

5 En algunos de tales casos, el método incluye formular células, como células producidas o generadas de acuerdo con los métodos proporcionados, incluyendo células transducidas por el método, en un tampón farmacéuticamente aceptable en una cavidad interna de una cámara de centrífuga, produciendo de este modo una composición formulada. En algunos casos, los métodos incluyen además efectuar la extracción de la composición formulada en uno o una pluralidad de recipientes. En algunos casos, los métodos incluyen efectuar la extracción de la composición formulada que incluye efectuar la extracción de una serie de células presentes en una sola dosis unitaria a uno o cada uno de dichos uno o una pluralidad de recipientes.

10 En algunos de tales casos, cada una de dichas cavidades de una cámara de centrífuga es igual o diferente a la cavidad de una centrífuga empleada en uno o más de los otros pasos y/o en el proceso de incubación y/o rotación de una composición de entrada que contiene células y partículas virales.

15 En algunos de tales casos, cada una de dichas cámaras centrífugas es integral a un sistema cerrado, dicho sistema cerrado incluyendo dicha cámara y por lo menos una línea de tubos conectada operativamente a la por lo menos una abertura a través de por lo menos un conector, por lo que se permite que el líquido y el gas se muevan entre dicha cavidad y dicha por lo menos una línea de tubos en por lo menos una configuración de dicho sistema.

20 Las células procesadas por los métodos son típicamente células primarias, como células obtenidas de un sujeto, típicamente un humano. Las células pueden derivarse de un sujeto al que se administrará la terapia, como uno que tiene una enfermedad o afección a la que se dirige una molécula recombinante expresada por un vector transducido, por ejemplo, un receptor de antígenos recombinante como un receptor de antígenos quimérico o TCR transgénico. Alternativamente, las células pueden ser de un sujeto diferente. Por tanto, los métodos abarcan el procesamiento para la transferencia autóloga y alogénica. Las células pueden incluir células en suspensión, por ejemplo, glóbulos blancos, por ejemplo, células T, como células T CD8<sup>+</sup> aisladas, o células T CD4<sup>+</sup> aisladas o subconjuntos de las mismas, o células NK.

25 En algunos casos, durante la incubación, la cámara de centrífuga está asociada con un sensor, por ejemplo, un sensor capaz de monitorizar la posición del miembro móvil y los circuitos de control, como circuitos capaces de recibir y transmitir información a y desde el sensor, provocando el movimiento de dicho miembro móvil, y/o que está asociada además con una centrífuga y, por tanto, es capaz de provocar la rotación de la cámara durante dicha incubación.

30 En algunos casos, la cámara contiene el miembro móvil y durante la incubación está localizada dentro de una centrífuga y está asociada con un sensor capaz de monitorizar la posición del miembro móvil y los circuitos de control capaces de recibir y transmitir información desde el sensor y provocar el movimiento del miembro móvil, la entrada y la extracción de líquido hacia y desde dicha cavidad a través de dichas una o más líneas de tubos, y la rotación de la cámara a través de la centrífuga.

35 En algunos casos, la cámara, el circuito de control, la centrífuga y/o el sensor están alojados dentro de un armario, por ejemplo, durante la incubación.

40 En algunos casos de cualquiera de las transferencias virales, por ejemplo, métodos de transducción, el vector viral recombinante codifica un receptor recombinante, que es expresado de este modo por las células de la composición de salida. En algunos casos, el receptor recombinante es un receptor de antígenos recombinante, tal como un receptor de células no T funcional, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico (CAR), o un receptor de células T transgénicas (TCR). En algunos casos, el receptor recombinante es un receptor quimérico que contiene una parte extracelular que se une específicamente a un ligando y una parte de señalización intracelular que contiene un dominio de activación y un dominio coestimulador.

45 En algunos de tales casos, las células incluyen células T humanas primarias obtenidas de un sujeto humano y antes de la incubación con partículas de un vector viral y/o antes de completar la transducción y/o, cuando el método incluye formulación, antes de la formulación, las células T humanas primarias no han estado presentes externamente al sujeto a una temperatura superior a 30° C durante más de 1 hora, más de 6 horas, más de 24 horas o más de 48 horas o antes a la incubación y/o antes de la finalización de la transducción, y/o cuando el método incluye formulación, antes de la formulación, las células T humanas primarias no se han incubado en presencia de un anticuerpo específico para CD3 y/o un anticuerpo específico para CD28 y/o una citoquina, durante más de 1 hora, más de 6 horas, más de 24 horas o más de 48 horas.

50 En la presente se proporcionan métodos para el aislamiento, por ejemplo, selección, de células que incluyen (a) incubar un reactivo de selección y células primarias en una cavidad interna de una cámara de centrífuga en condiciones de mezclado, mediante lo cual una pluralidad de células primarias se unen a dicho reactivo de

55

selección y (b) separar la pluralidad de las células primarias de otra o más de las células primarias en base a la unión al reactivo de selección, enriqueciendo de este modo las células primarias en base a la unión al reactivo de selección, en donde la cámara de centrífuga es rotatoria alrededor de un eje de rotación y la cavidad interna tiene un volumen máximo de por lo menos 50 ml, por lo menos 100 ml o por lo menos 200 ml. En algunos casos, los métodos de aislamiento, por ejemplo, selección, se producen en un sistema cerrado. En algunos casos, antes del paso de separar la pluralidad de células, Las células incubadas con el reactivo de selección, se extraen desde o se transfieren fuera de la cámara, pero se mantienen en el sistema cerrado. En algunos casos, opcionalmente, después de la incubación con el reactivo de selección y antes de separar las células, el método incluye además uno o más pasos de lavado, que en algunos casos, pueden realizarse en la cavidad de la cámara de acuerdo con los métodos proporcionados. En algunos casos, el paso de separar las células puede efectuarse usando un soporte sólido, como usando una columna de inmunoafinidad, incluyendo las de separación magnética, que pueden estar contenidas en el sistema cerrado.

En la presente se proporcionan métodos para la estimulación de las células, incluyendo la incubación de un agente de estimulación y células primarias en condiciones en las que el agente de estimulación se une a una molécula expresada por una pluralidad de células primarias y la pluralidad de las células se activan o estimulan, en donde por lo menos una parte de la incubación se lleva a cabo en una cavidad interna de una cámara de centrífuga en condiciones de mezclado, donde la cámara de centrífuga es rotatoria alrededor de un eje de rotación y la cavidad interna tiene un volumen máximo de por lo menos 50 ml, por lo menos 100 ml, o por lo menos 200 ml.

En algunos casos, los métodos de estimulación se realizan como parte de un proceso que incluye transducción de células, por lo que todo o parte de dicho proceso se realiza en una cámara de centrífuga y/o como parte del mismo sistema cerrado. En algunos casos, las células primarias que se estimulan con un agente de estimulación incluyen o son células obtenidas después del aislamiento, por ejemplo, selección, de células de una muestra biológica, de acuerdo con los métodos proporcionados. En algunos casos, por lo menos una parte de la estimulación se lleva a cabo simultáneamente o durante la incubación de células con las partículas del vector viral, de tal manera que las células primarias incluyen o son células presentes en la composición de entrada y/o son células en las que la transducción ha tenido lugar o se ha iniciado. En algunos casos, por lo menos una parte de la estimulación se lleva a cabo antes de la incubación de las células con las partículas del vector viral, de tal manera que las células incubadas con las partículas del vector viral son células estimuladas que, en algunos casos, incluye la proliferación de células.

En algunos casos, por lo menos una parte de uno de los otros pasos de procesamiento del método, incluyendo el aislamiento, por ejemplo, selección, estimulación, lavado y/o formulación, que se lleva a cabo en una cámara incluye donde la cámara incluye una pared final, una pared lateral sustancialmente rígida que se extiende desde dicha pared final, y por lo menos una abertura, en donde por lo menos una parte de la pared lateral rodea la cavidad interna y la por lo menos una abertura es capaz de permitir la entrada de líquido en la cavidad interna y la extracción de líquido desde la cavidad.

En la presente se proporcionan composiciones que contienen células transducidas producidas por los métodos de cualquiera de los casos anteriores. En algunos de tales casos, la composición contiene células que son células primarias y/o células humanas y/o incluyen glóbulos blancos, y/o células T, y/o células NK. En algunos de tales casos, la composición contiene por lo menos  $5 \times 10^7$  células,  $1 \times 10^8$  células,  $2 \times 10^8$  células,  $4 \times 10^8$  células,  $6 \times 10^8$  células,  $8 \times 10^8$  células o  $1 \times 10^9$  células. En algunos de tales casos, la composición contiene un número terapéuticamente eficaz de células para su uso en terapia de células T adoptivas. En algunos de tales casos, las células son células T y después de la transducción, las células en la composición no se someten a expansión celular en presencia de un agente de estimulación y/o las células no se incuban a una temperatura superior a  $30^\circ\text{C}$  durante más de 24 horas o la composición no contiene una citoquina o la composición no contiene un agente de estimulación que se una específicamente a CD3 o un complejo TCR.

En la presente se proporcionan composiciones que contienen por lo menos  $1 \times 10^7$  o por lo menos  $5 \times 10^7$  células T, por lo menos una pluralidad de las cuales se transducen con un vector viral recombinante, donde después de la transducción, las células en la composición no se han sometido a expansión celular en presencia de un agente de estimulación y/o las células no han sido incubadas a una temperatura de más de  $30^\circ\text{C}$  durante más de 24 horas y/o por lo menos el 30, 40, 50, 60, 70 o el 80% de las células T en la composición contienen una expresión superficial alta de CD69 o TGF-beta-II. En algunos casos, la composición contiene por lo menos  $1 \times 10^8$  células,  $2 \times 10^8$  células,  $4 \times 10^8$  células,  $6 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$  células o  $1 \times 10^9$  células.

En algunos de tales casos, las células T son células T no fraccionadas, células T CD8+ aisladas o células T CD4+ aisladas.

En algunos de tales casos, por lo menos el 2,5%, por lo menos el 5%, por lo menos el 6%, por lo menos el 8%, por lo menos el 10%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, o por lo menos el 75% de dichas células en dicha composición se transducen con el vector viral.

- 5 En algunos de tales casos, el vector viral codifica un receptor recombinante y las células transducidas en la composición expresan el receptor recombinante. En algunos casos, el receptor recombinante es un receptor de antígenos recombinante. En algunos casos, el receptor de antígenos recombinante es un receptor funcional de células no T. En algunos casos, el receptor funcional de células no T es un receptor de antígeno quimérico (CAR).
- 10 En algunos casos, el receptor recombinante es un receptor quimérico que contiene una parte extracelular que se une específicamente a un ligando y una parte de señalización intracelular que contiene un dominio de activación y un dominio de coestimulación. En algunos casos, el receptor de antígenos recombinante es un receptor de células T transgénicas (TCR).
- 15 En algunos de tales casos, entre todas las células en la composición, el número de copias medio del vector viral recombinante no es de más de aproximadamente 10, no más de 8, no más de 6, no más de 4, o no más de aproximadamente 2, o entre las células en la composición transducidas con el vector viral recombinante, el número de copias medio de dicho vector no es de más de aproximadamente 10, no más de 8, no más de 6, no más de 4, o no más de aproximadamente 2.
- 20 En algunos de tales casos, la composición contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 En la presente se proporcionan métodos de tratamiento, que incluyen administrar a un sujeto que tiene una enfermedad o afección la composición de cualquiera de los casos anteriores. En algunos casos, las células T transducidas en la composición muestran una expansión y/o persistencia aumentadas o más prolongadas en el sujeto que las células T transducidas en una composición en la cual, después de la transducción, las células en la composición han sido sometidas a expansión celular en presencia de un agente de estimulación y/o las células se han incubado a una temperatura mayor de a 30° C durante más de 24 horas.
- 30 En algunos de tales casos, el receptor recombinante, el receptor de antígeno quimérico o el TCR transgénico se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o afección. En algunos casos, la enfermedad o afección es un cáncer, una enfermedad o trastorno autoinmune, o una enfermedad infecciosa.
- 35 En la presente se proporcionan composiciones que contienen por lo menos 1 x 10<sup>7</sup> células y por lo menos 1 o aproximadamente 1 unidad infecciosa (UI) por célula de partículas virales que contienen un vector viral recombinante. En algunos casos, las células contienen por lo menos o aproximadamente 50 x 10<sup>6</sup> células, 100 x 10<sup>6</sup> células o 200 x 10<sup>6</sup> células, y/o dichas partículas virales están presentes en la composición en una cantidad que es por lo menos 1,6 UI/célula, 1,8 UI/célula, 2,0 UI/célula, 2,4 UI/célula, 2,8 UI/célula, 3,2 UI/célula, 3,6 IU/célula, 4,0 IU/célula, 5,0 IU/célula, 6,0 IU/célula, 7,0 IU/célula, 8,0 IU/célula, 9,0 IU/célula o 10,0 IU/célula.
- 40 En cualquiera de tales casos, el volumen de líquido de la composición es menor o igual a 220 ml, menor o igual a 200 ml, menor o igual a 100 ml, menor o igual a 50 ml o menor que o igual a 20 ml.
- 45 En algunos de tales casos, las células son células primarias. En algunos de tales casos, las células son células humanas. En algunos de tales casos, las células incluyen células en suspensión, las células incluyen glóbulos blancos y/o las células incluyen células T o células NK. En algunos casos, las células son células T y las células T son células T no fraccionadas, células T CD8+ aisladas o células T CD4+ aisladas.
- 50 En algunos de tales casos, el vector viral codifica un receptor recombinante. En algunos casos, el receptor recombinante es un receptor de antígenos recombinante. En algunos casos, el receptor de antígenos recombinante es un receptor de células no T funcional. En algunos casos, el receptor de células no T funcional es un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, el receptor recombinante es un receptor quimérico que contiene una parte extracelular que se une específicamente a un ligando y una parte de señalización intracelular que contiene un dominio de activación y un dominio de coestimulación. En algunos casos, el receptor de antígenos recombinante es un receptor de células T transgénicas (TCR).
- 55 En la presente se proporcionan cámaras centrífugas rotatorias alrededor de un eje de rotación, que incluye una cavidad interna que contiene la composición de cualquiera de los casos anteriores.
- 60 En la presente se proporcionan cámaras centrífugas rotatorias alrededor de un eje de rotación, que contienen una cavidad interna que contiene (a) una composición que contiene por lo menos 5 x 10<sup>7</sup> células T primarias transducidas con un vector viral recombinante y/o (b) una composición que contiene por lo menos 5 x 10<sup>7</sup> células T primarias y partículas virales que contienen un vector viral recombinante.
- 65 En algunos de tales casos, la cámara contiene además una pared final, una pared lateral sustancialmente rígida que se extiende desde dicha pared final, y por lo menos una abertura, en donde por lo menos una parte de dicha pared lateral rodea dicha cavidad interna y dicho por lo menos una abertura es capaz de permitir la entrada de líquido en dicha cavidad interna y la extracción de líquido desde dicha cavidad.
- 70 En algunos de tales casos, dicha composición en dicha cavidad contiene por lo menos 1 x 10<sup>8</sup> células, 2 x

10<sup>8</sup> células, 4 x 10<sup>8</sup> células, 6 x 10<sup>8</sup> células, 8 x 10<sup>8</sup> células o 1 x 10<sup>9</sup> de las células.

En algunos de tales casos, las células T son células T no fraccionadas, células T CD8+ aisladas o células T CD4+ aisladas.

En algunos de tales casos de la cámara, por lo menos el 2,5%, por lo menos el 5%, por lo menos el 6%, por lo menos el 8%, por lo menos el 10%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, o por lo menos el 75% de dichas células en dicha composición se transducen con un vector viral.

En algunos de tales casos de la cámara, el vector viral codifica un receptor recombinante y las células en la composición expresan el receptor recombinante. En algunos casos, el receptor recombinante es un receptor de antígenos recombinante. En algunos casos, el receptor de antígenos recombinante es un receptor de células no T funcional. En algunos casos, el receptor de células no T funcional es un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, el receptor recombinante es un receptor quimérico que contiene una parte extracelular que se une específicamente a un ligando y una parte de señalización intracelular que contiene un dominio de activación y un dominio de coestimulación. En algunos casos, el receptor de antígeno recombinante es un receptor de células T transgénicas (TCR).

En algunos de tales casos de la cámara, entre todas las células en la composición, el número de copias medio de dicho vector viral recombinante no es de más de aproximadamente 10, no más de 8, no más de 6, no más de 4, o no más de aproximadamente 2 o entre las células en la composición transducidas con el vector viral recombinante, el número de copias medio de dicho vector no es de más de aproximadamente 10, no más de 8, no más de 6, no más de 4, o no más de aproximadamente 2.

En la presente se proporcionan cámaras centrífugas rotatorias alrededor de un eje de rotación, que incluyen una cavidad interna que contiene la composición de cualquiera de los casos anteriores. En algunos casos, la cámara contiene además un volumen de gas hasta el volumen máximo de la cavidad interna de la cámara. En algunos casos, el gas es aire.

En algunos de tales casos de la cámara, la cámara es rotatoria alrededor de un eje de rotación e incluye una pared final, una pared lateral sustancialmente rígida que se extiende desde dicha pared final, y por lo menos una abertura, en donde por lo menos una parte de dicha pared lateral rodea dicha cavidad interna y dicha por lo menos una abertura es capaz de permitir la entrada de líquido en dicha cavidad interna y la extracción de líquido de dicha cavidad. En algunos casos, la pared lateral es curvilínea. En algunos casos, la pared lateral es generalmente cilíndrica.

En algunos de tales casos de la cámara, dicha por lo menos una abertura incluye una entrada y una salida, respectivamente, capaces respectivamente de permitir dicha entrada y extracción o dicha por lo menos una abertura incluye una única entrada/salida, capaz de permitir dicha entrada y dicha extracción. En algunos de tales casos de la cámara, por lo menos una abertura es coaxial con la cámara y está localizada en la pared final.

En algunos de tales casos, la cámara incluye además un miembro móvil y dicha cavidad interna es una cavidad de volumen variable definida por dicha pared final, dicha pared lateral sustancialmente rígida, y dicho miembro móvil, dicho miembro móvil siendo capaz de moverse dentro de la cámara para variar el volumen interno de la cavidad. En algunos casos, el miembro móvil es un pistón y/o el miembro móvil es capaz de moverse axialmente dentro de la cámara para variar el volumen interno de la cavidad.

En algunos de tales casos, el área de superficie interna de dicha cavidad es de por lo menos o de aproximadamente 1 x 10<sup>9</sup> μm<sup>2</sup>, el área de superficie interna de dicha cavidad es de por lo menos o de aproximadamente 1 x 10<sup>10</sup> μm<sup>2</sup>, la longitud de dicha pared rígida en la dirección que se extiende desde dicha pared final es de por lo menos aproximadamente 5 cm, la longitud de dicha pared rígida en la dirección que se extiende desde dicha pared final es de por lo menos aproximadamente 8 cm y/o la cavidad contiene un radio de por lo menos aproximadamente 2 cm en por lo menos una sección transversal.

En algunos de tales casos de la cámara, el volumen de líquido de dicha composición presente en dicha cavidad está entre o entre aproximadamente 0,5 ml por pulgada cuadrada del área superficial interna de la cavidad (ml/pulgada cuadrada) y 5 ml/pulgada cuadrada, 0,5 ml/pulgada cuadrada y 2,5 ml/pulgada cuadrada, 0,5 ml/pulgada cuadrada y 1 ml/pulgada cuadrada, 1 ml/pulgada cuadrada y 5 ml/pulgada cuadrada, 1 ml/pulgada cuadrada y 2,5 ml/pulgada cuadrada o 2,5 ml/pulgada cuadrada y 5 ml/pulgada cuadrada. En algunos de tales casos, el volumen de líquido de dicha composición presente en dicha cavidad es de por lo menos 0,5 ml/pulgada cuadrada, 1 ml/pulgada cuadrada, 2,5 ml/pulgada cuadrada o 5 ml/pulgada cuadrada.

En la presente se proporcionan sistemas cerrados que contienen la cámara de centrífuga de cualquiera de los casos anteriores. En algunos de tales casos del sistema cerrado, la cámara de centrífuga es capaz de rotar a una

velocidad de hasta 8000 g, en donde la cámara de centrífuga es capaz de resistir una fuerza de 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 o 3200 g, sin ceder, doblarse, romperse sustancialmente o dañar de otra manera la cámara y/o al mismo tiempo mantener sustancialmente una forma generalmente cilíndrica bajo tal fuerza.

## 5 Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1A** muestra la eficiencia de transducción calculada como porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión superficial de un receptor de antígeno quimérico (CAR) codificado por un vector viral, después de la incubación en varias condiciones como se describe en el Ejemplo 1. La **FIG. 1B** muestra duplicaciones de la población durante un período de seis días durante el estudio de transducción descrito en el Ejemplo 1.

La **FIG. 2** muestra la eficiencia de transducción calculada como porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión superficial de un CAR codificado por un vector viral después de la incubación en las condiciones indicadas como se describe en el ejemplo 2.

La **FIG. 3** muestra la eficiencia de transducción calculada como porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión superficial de un CAR codificado por un vector viral después de la incubación en varias condiciones como se describe en el ejemplo 3.

La **FIG. 4** muestra el número medio de copias del vector (VCN) de un vector viral en poblaciones celulares indicadas después de la transducción en varias condiciones como se describe en el Ejemplo 4.

La **FIG. 5** proporciona una representación esquemática de un caso de un sistema cerrado (kit de procesamiento) para su uso en casos de los métodos proporcionados. El sistema ejemplar representado incluye una cámara de centrífuga generalmente cilíndrica (1), rotatoria alrededor de un eje de rotación e incluye una pared final (13), una pared lateral rígida (14) y un pistón (2), que definen una cavidad interna (7) de la cámara. La cámara incluye además una abertura de entrada/salida (6) para permitir el flujo de líquido y gas dentro y fuera de la cavidad en por lo menos algunas configuraciones del sistema. La abertura (6) está operativamente unida con una serie de tubos (3) y conectores, que incluyen válvulas de llave de paso (4) y varios recipientes adicionales. También se representan las abrazaderas (5).

La **FIG. 6A** muestra duplicaciones de la población durante un período de diez días durante el estudio descrito en el Ejemplo 6. La **FIG. 6B** muestra el porcentaje de viabilidad de las células durante un período de diez días durante el estudio descrito en el Ejemplo 6.

La **FIG. 7** proporciona una representación esquemática de un caso de un sistema cerrado (kit de procesamiento) para su uso en casos de los métodos proporcionados. El sistema ejemplar representado incluye una cámara de centrífuga generalmente cilíndrica (1), rotatoria alrededor de un eje de rotación e incluye una pared final (13), una pared lateral rígida (14) y un pistón (2), que definen una cavidad interna (7) de la cámara. La cámara incluye además una abertura de entrada/salida (6) para permitir el flujo de líquido y gas dentro y fuera de la cavidad en por lo menos algunas configuraciones del sistema. La abertura (6) está operativamente conectada con una serie de líneas de tubos (3) y conectores, que incluyen válvulas de llave de paso (4), varios recipientes adicionales y un filtro de aire (15) acoplado a una tapa desmontable (16). También se representan las abrazaderas (5).

La **FIG. 8A** muestra la eficiencia de transducción calculada como porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión superficial de un CAR codificado por un vector viral después de la incubación en las condiciones indicadas como se describe en el ejemplo 8A. La **FIG. 8B** muestra la eficiencia de transducción calculada como porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión superficial de un CAR codificado por un vector viral después de la incubación en las condiciones indicadas como se describe en el ejemplo 8B. La **FIG. 8C** muestra el número medio de copias del vector (VCN) de un vector viral en poblaciones celulares indicadas después de la transducción en diversas condiciones como se describe en el Ejemplo 8B.

La **FIG. 9A** muestra la eficiencia de transducción calculada como porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión superficial de un CAR codificado por un vector viral después de la incubación en las condiciones indicadas como se describe en el Ejemplo 9. La **FIG. 9B** muestra el número medio de copias del vector (VCN) de un vector viral en poblaciones de células indicadas después de la transducción en varias condiciones como se describe en el Ejemplo 9.

La **FIG. 10** muestra la eficiencia de transducción calculada como porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión superficial de un CAR codificado por un vector viral después de la incubación en las condiciones indicadas como se describe en el ejemplo 10.

La **FIG. 11** proporciona una representación esquemática de un caso de un sistema cerrado (kit de procesamiento) para su uso en casos de los métodos proporcionados. El sistema ejemplar representado incluye una cámara de centrífuga generalmente cilíndrica (1), rotatoria alrededor de un eje de rotación e incluye una pared final (13), una pared lateral rígida (14) y un pistón (2), que definen una cavidad interna (7) de la cámara. La cámara incluye además una abertura de entrada/salida (6) para permitir el flujo de líquido y gas dentro y fuera de la cavidad en por lo menos algunas configuraciones del sistema. La abertura (6) está conectada operativamente a una serie de líneas de tubos (3) y conectores, que incluyen válvulas de llave de paso (4) y puertos (18), y varios recipientes adicionales, que incluyen una pluralidad de bolsas de salida (17). También se representan las abrazaderas (5).

## Descripción detallada

65

A menos que se defina lo contrario, todos los términos de técnica, anotaciones y otros términos o terminología técnica y científica usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica al que pertenece el asunto reivindicado. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en la presente para mayor claridad y/o para una referencia inmediata, y la inclusión de tales definiciones en la presente no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial sobre lo que generalmente se entiende en la técnica.

Los encabezados de sección usados en la presente son solo con propósitos organizativos y no deben interpretarse como limitativos del asunto descrito.

## I. Métodos de procesamiento celular y sistemas, kits y dispositivos asociados

Se proporcionan métodos para procesar células, por ejemplo, para generar composiciones de células para uso en terapia celular adoptiva. Los métodos incluyen aquellos para transferir vectores virales recombinantes a las células, como por transducción viral. Los vectores virales generalmente codifican moléculas recombinantes para ser expresadas en las células, por ejemplo, para su uso en terapia celular. Los pasos de procesamiento de los métodos también pueden incluir o, alternativamente, todos o una parte de lavado, dilución, selección, aislamiento, separación, cultivo, estimulación, envasado y/o formulación de células. Los métodos generalmente permiten el procesamiento, por ejemplo, selección o separación y/o transducción, de células a gran escala (como en composiciones de volúmenes de más de o aproximadamente 50 ml). Uno o más de los pasos de procesamiento celular generalmente se llevan a cabo en la cavidad interna de una cámara de centrífuga, como una cámara sustancialmente rígida que generalmente tiene forma cilíndrica y rota alrededor de un eje de rotación, lo que puede proporcionar ciertas ventajas en comparación con otros métodos disponibles. En algunos casos, todos los pasos de procesamiento se llevan a cabo en la misma cámara de centrífuga. En algunos casos, uno o más pasos de procesamiento se llevan a cabo en diferentes cámaras centrífugas, como múltiples cámaras centrífugas del mismo tipo.

Los métodos proporcionados ofrecen varias ventajas en comparación con los métodos disponibles para el procesamiento celular, incluyendo la transducción y la selección, particularmente aquellos para el procesamiento celular a gran escala. Ciertos métodos disponibles no han sido completamente satisfactorios, por ejemplo, debido a una eficacia, precisión, reproducibilidad, gasto de tiempo y costo, riesgo de error, complejidad y necesidad de instalaciones de manipulación y bioseguridad para el usuario menos que óptimos. En algunos casos, los métodos proporcionados son adecuados para la producción celular a gran escala y/o de grado clínico, a la vez que proporcionan características deseables que de otro modo solo estarían disponibles con métodos de producción a pequeña escala, y ofrecen ventajas adicionales no proporcionadas por los métodos disponibles. Por ejemplo, los métodos para la transducción celular y/o la selección basada en afinidad ofrecen ventajas en comparación con los métodos disponibles realizados en bolsas de plástico flexibles o placas de múltiples pocillos de plástico.

En algunos casos, la cámara de centrífuga y/o su cavidad interna en la que se procesan las células está rodeada o definida por lo menos en parte por material rígido o sustancialmente rígido. La incubación en una cavidad unida por dichos materiales, como el plástico duro, permite la centrifugación bajo ciertas condiciones, como fuerzas más altas que las que se pueden usar con bolsas usadas en otros métodos de procesamiento de células a gran escala. Por ejemplo, en algunos casos, la cámara y la cavidad soportan la centrifugación a una fuerza, por ejemplo, una fuerza centrífuga relativa, de por lo menos aproximadamente 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g o 3200 g, medida, por ejemplo, en una pared interna o externa de la cámara o cavidad, o en una o más células, como una capa de células, sin ceder, doblarse, o romperse o dar como resultado de otra manera el daño de la cámara o cavidad que mantiene las células, de tal manera que la cámara y o la cavidad mantienen sustancialmente su forma bajo dicha fuerza.

Por consiguiente, la cámara y/o su cavidad interna típicamente están rodeadas por todo o una parte de una pared lateral rígida o semirrígida, como una hecha de plástico duro, que mantiene su forma bajo la fuerza centrífuga aplicada. La pared lateral generalmente es curvilínea, por ejemplo, cilíndrica o generalmente cilíndrica, y típicamente se extiende desde una o dos paredes finales de la cámara, el lado interno de una o ambas de las cuales también puede definir los límites de la cavidad interna. Las paredes finales en algunos casos también están hechas de materiales rígidos, y en algunos casos pueden incluir materiales más flexibles. En algunos casos, aunque una pared esté hecha de material rígido o material sustancialmente rígido, puede no obstante estar revestida y/o recubierta con material flexible y/o contener pequeñas partes que son más flexibles, siempre que la cavidad en su conjunto mantenga su forma general durante las condiciones de los métodos.

La cámara de centrífuga generalmente es rotatoria alrededor de un eje de rotación, y la cavidad típicamente es coaxial con la cámara. En algunos casos, la cámara de centrífuga incluye además un miembro móvil, como un pistón, que generalmente es capaz de moverse (por ejemplo, movimiento axial) dentro de la cámara, para variar el volumen de la cavidad. Por tanto, en casos particulares, la cavidad interna está unida por la pared lateral y la pared final de la cámara y el miembro móvil, y tiene un volumen variable que puede ajustarse moviendo el miembro móvil. El miembro móvil puede estar hecho de materiales rígidos, sustancialmente o generalmente rígidos, flexibles, o combinaciones de los mismos.



La cámara generalmente también incluye una o más aberturas, como una o más entradas, una o más salidas, y/o una o más entradas/salidas, que pueden permitir la entrada y extracción de líquido y/o gas hacia y desde la cavidad. En algunos casos, la abertura puede ser una entrada/salida donde se producen tanto la entrada como la extracción del líquido y/o gas. En algunos casos, la una o más entradas pueden estar separadas o ser diferentes de la una o más salidas. La abertura o aberturas pueden estar en una de las paredes finales. En algunos casos, el líquido y/o el gas se toman y/o se extraen desde la cavidad mediante el movimiento del miembro móvil para aumentar y/o disminuir el volumen de la cavidad. En otros casos, el líquido y/o el gas pueden tomarse y/o extraerse desde la cavidad a través de una línea de tubos u otro canal que esté o esté colocado en conexión con la abertura, por ejemplo, colocando la línea o canal en conexión con y control de una bomba, jeringuilla, u otra maquinaria, que puede controlarse de manera automática.

En algunos casos, la cámara es parte de un sistema cerrado, como un sistema estéril, que tiene varios componentes adicionales como líneas de tubos y conectores y tapas, dentro de los cuales se producen los pasos de procesamiento. Por tanto, en algunos casos, los métodos y/o pasos proporcionados de los mismos se llevan a cabo en un entorno completamente cerrado o semicerrado, como un sistema estéril cerrado o semicerrado, que facilita la producción de células para la administración terapéutica a sujetos sin necesidad de un ambiente estéril separado, como un armario o sala de bioseguridad. Los métodos en algunos casos se llevan a cabo de manera automatizada o parcialmente automatizada.

En algunos casos, la cámara está asociada con una centrífuga, que es capaz de efectuar la rotación de la cámara, como alrededor de su eje de rotación. La rotación puede producirse antes, durante y/o después de la incubación en uno o más de los pasos de procesamiento. Por tanto, en algunos casos, uno o más de los varios pasos de procesamiento se llevan a cabo bajo rotación, por ejemplo, a una fuerza particular. La cámara es típicamente capaz de rotación vertical o generalmente vertical, de tal manera que la cámara se asienta verticalmente durante la centrifugación y la pared lateral y el eje son verticales o generalmente verticales, con las paredes finales horizontales o generalmente horizontales. Una cámara ejemplar se representa dentro de los sistemas cerrados ejemplares representados en la FIG. 5, la FIG. 7 o la FIG. 11.

Los pasos de procesamiento de los métodos (por ejemplo, los pasos llevados a cabo total o parcialmente en la cámara) pueden incluir uno o más de una serie de pasos de procesamiento de células, solos o en combinación. En casos particulares, los pasos de procesamiento incluyen la transducción de las células con partículas del vector viral que contienen un vector retroviral, como uno que codifica un producto recombinante para la expresión en las células, donde por lo menos una parte de la incubación con las partículas del vector viral se realiza en la cámara para iniciar la transducción. Los métodos pueden incluir además y/o alternativamente otros pasos de procesamiento, como los pasos para el aislamiento, separación, selección, cultivo (por ejemplo, estimulación de las células, por ejemplo, para inducir su proliferación y/o activación), lavado, suspensión, dilución, concentración y/o formulación de las células. En algunos casos, el método incluye pasos de procesamiento llevados a cabo en un orden en el que: se aíslan, como seleccionarse o separarse, primero las células, por ejemplo, las células primarias de una muestra biológica; las células aisladas o seleccionadas resultantes se estimulan en presencia de un reactivo de estimulación; las células estimuladas se incuban con partículas de vectores virales para la transducción; y las células transducidas se formulan en una composición. En algunos casos, la estimulación se realiza adicional o alternativamente durante por lo menos una parte de la incubación con las partículas del vector viral. En algunos casos, la estimulación se lleva a cabo adicional o alternativamente después de la incubación de las células con las partículas del vector viral. En algunos casos, los métodos no incluyen un paso para estimular las células. En algunos casos, el método puede incluir uno o más pasos de procesamiento entre el lavado, la suspensión, la dilución y/o la concentración de células, que pueden producirse antes, durante o simultáneamente con o después de uno o más de los pasos de aislamiento, como la separación o selección, estimulación, de transducción y/o formulación. La totalidad o una parte de cada uno de los pasos de procesamiento puede realizarse en un sistema cerrado, como en una cámara de centrífuga. En aspectos de los métodos, los procesos no necesitan realizarse en el mismo sistema cerrado, como en la misma cámara de centrífuga, sino que pueden realizarse en un sistema cerrado diferente, como en una cámara de centrífuga diferente; en algunos casos, tales cámaras centrífugas diferentes están en los puntos respectivos en los métodos colocados en asociación con el mismo sistema, como colocados en asociación con la misma centrífuga. En algunos casos, todos los pasos de procesamiento se realizan en un sistema cerrado, en el que todo o una parte de cada uno o más pasos de procesamiento se realizan en la misma cámara de centrífuga o en una diferente.

En algunos casos, los métodos proporcionan la capacidad de transducir las células con una mayor eficiencia de transducción en comparación con los métodos disponibles, por ejemplo, llevando a cabo toda o parte de la transducción a fuerzas centrífugas/velocidades más altas, y/o permitiendo un control o ajuste fácil, automatizado y/o independiente de varios parámetros, como volumen o cantidad de reactivos, velocidad y/o temperatura. En algunos casos, los métodos aumentan la eficacia y/o reducen la variabilidad (aumentando la reproducibilidad), por ejemplo, racionalizando y/o disminuyendo el número de interacciones del usuario y/o pasos de manejo, como proporcionando un control automatizado o semiautomatizado de los varios pasos.

En algunos casos, en virtud de llevar a cabo uno o más, por ejemplo, la totalidad o una parte de todos los

pasos de procesamiento dentro de un sistema cerrado, como un sistema cerrado estéril, los métodos proporcionados permiten la preparación a gran escala de células para uso clínico sin exponer las células a condiciones no estériles y sin el uso de una habitación o armario estéril separado. En algunos casos, las células se aíslan, separan o seleccionan, estimulan, transducen, lavan y formulan dentro del sistema cerrado, por ejemplo, de manera automatizada. En algunos casos, los métodos son ventajosos en que están optimizados, por ejemplo, requieren menos pasos, menos manipulación o intervención del usuario, por ejemplo, al llevarse a cabo en un sistema único, cerrado y/o de manera automatizada. Por ejemplo, en algunos casos, los métodos proporcionan mejora sobre los métodos para el procesamiento de células para su uso en aplicaciones clínicas, que pueden requerir la transducción en bolsas en una centrífuga o placa, mezclando partículas del vector viral y células a proporciones apropiadas en un armario de bioseguridad, seguido por el transporte de la placa o bolsa a la centrífuga para la transducción u otro paso de procesamiento, y pasos adicionales que también pueden requerir manejo. En algunos casos, los métodos proporcionados son menos manuales y/o intensivos en mano de obra en comparación con tales métodos disponibles, lo que requiere un grado o cantidad reducida de manipulación e interacción por el usuario.

En algunos casos, los métodos permiten un mayor grado de control del proceso en comparación con los métodos disponibles. Por ejemplo, los métodos en algunos casos permiten el control independiente de varios parámetros, por ejemplo, de manera automatizada. Por ejemplo, los métodos pueden permitir un control independiente del volumen, cantidad y/o concentración de varios componentes y reactivos usados y procesados con los métodos o varias condiciones usadas en uno o más de los procesos o métodos. Generalmente permiten el control de la duración de uno o más de los varios pasos de los métodos, y/o el control de la proporción de células en una incubación o composición particular, volumen de líquido y/o área de superficie del recipiente que se está usando para el procesamiento, como la cámara o la cavidad. La capacidad de controlar dichos parámetros de manera independiente, particularmente de una manera automatizada e independientemente unos de otros, puede permitir a un usuario optimizar fácilmente y llevar a cabo los métodos para condiciones individuales.

También se proporcionan sistemas, dispositivos y aparatos para su uso con tales métodos, kits que contienen los mismos, y métodos de uso de las composiciones y células producidas por los métodos. Por ejemplo, se proporcionan métodos de tratamiento y uso terapéutico de las células y composiciones producidas por los métodos, como en la terapia celular adoptiva. También se proporcionan composiciones farmacéuticas y formulaciones para su uso en tales terapias.

## II Cámaras centrífugas y sistemas y dispositivos asociados

En algunos casos, todos o parte de uno o más de los pasos de procesamiento, como la incubación con virus para iniciar o efectuar la transducción y/o la incubación con perlas para la separación basada en inmunoafinidad y/o uno o más de otros pasos de procesamiento como se describe, se lleva a cabo en una cámara de centrífuga. En particular, tales pasos e incubaciones generalmente se llevan a cabo en una cavidad interna de dicha cámara, que puede ser la misma cámara de centrífuga o una diferente para cada uno de los procesos.

La cámara de centrífuga generalmente puede rotarse, por ejemplo, mediante una centrífuga que puede estar asociada con la cámara durante la incubación. En algunos casos, la cámara de centrífuga es rotatoria alrededor de un eje de rotación, como un eje de rotación vertical o generalmente o sustancialmente vertical. En algunos casos, la cámara de centrífuga incluye una pared final y una pared lateral, por lo menos una parte de la cual rodea o circunda la cavidad interna de la cámara. La cámara de centrífuga generalmente también incluye otra pared final, desde la cual la pared lateral se extiende en la dirección opuesta.

La cavidad interna generalmente está unida en su exterior por los lados internos de toda o una parte de la pared final, toda o una parte de la pared lateral, y toda o una parte de otra pared final de la cámara u otra superficie u objeto, como un miembro móvil dentro de la cámara, como un pistón. La cavidad en algunos aspectos es hueca. En otros aspectos, un objeto sólido o hueco está contenido dentro de parte del espacio interno de la cavidad, como un tubo o canal.

En algunos aspectos, la cavidad es de volumen variable, lo que significa que el volumen total disponible dentro de la cavidad que puede estar ocupado, por ejemplo, por líquido o gas, puede variar, por ejemplo, por el movimiento del miembro móvil, por ejemplo, un pistón. En algunos casos, dicho movimiento es posible durante varios pasos de los métodos, como durante la incubación para iniciar o efectuar la transducción o selección o los pasos posteriores y/o anteriores a los mismos. El movimiento en algunos casos puede efectuarse de manera automatizada, como por un programa preespecificado ejecutado en virtud de los circuitos y maquinaria asociados con la cámara, como sensores y motores que detectan y controlan la posición del miembro móvil y otros aspectos del proceso y los circuitos para la comunicación entre los sensores y uno o más componentes.

La pared lateral de la cámara, o la parte de la misma que rodea la cavidad interna de la cámara (y, por tanto, la forma de la cavidad), típicamente es curvilínea, como cilíndrica, sustancialmente cilíndrica o generalmente cilíndrica. Los expertos en la técnica generalmente entienden que el término cilíndrico se refiere a un tipo particular

de superficie curvilínea, formada por los puntos a una distancia fija de un segmento de línea dado, considerado el eje de una forma cilíndrica. "Generalmente cilíndrico" se refiere a una forma o superficie que tiene una configuración que es aproximadamente cilíndrica en forma o estructura, como una que parece cilíndrica al ojo o es casi cilíndrica, pero que permite cierto grado de variabilidad. Por ejemplo, el término abarca formas y superficies de las cuales no todos los puntos están a la misma distancia del eje, y permite cierto grado de contorneado y/o ahusamiento, siempre que la forma o superficie parezca cilíndrica y/o tenga una forma principalmente cilíndrica. También abarca formas en las que la mayoría de la forma es cilíndrica, como cuando la mayoría de una pared exterior de la cámara de centrífuga es cilíndrica o sustancialmente cilíndrica, pero partes relativamente menores de ella adoptan otra configuración, por ejemplo, ahusándose o contorneándose o aproximándose a uno o más extremos de la pared. En algunos casos, la parte de la pared lateral de la cámara que rodea la cavidad es cilíndrica, mientras que otras partes de la pared pueden no ser cilíndricas.

En algunos casos, toda o partes de la cámara y/o cavidad son rígidas o sustancialmente rígidas. Por ejemplo, toda o parte de la pared lateral puede ser rígida o sustancialmente rígida, por ejemplo, para permitir que la cámara y la cavidad resistan la fuerza, por ejemplo, como se aplica durante la centrifugación a altas velocidades, por ejemplo, a una fuerza (fuerza centrífuga relativa (RCF)) en la superficie interna de la pared lateral de la cavidad y/o en una capa superficial de las células de más de aproximadamente 200 g, más de o aproximadamente 300 g, o más de o aproximadamente 500 g, como más de o aproximadamente 600 g, 800 g, 1100 g, 1000 g, 1500 g, 1600 g, 2000 g, 2200 g, 2500 g, 3000 g o 3200 g; o por lo menos o aproximadamente 600 g, 800 g, 1000 g, 1100 g, 1500 g, 1600 g, 2000 g, 2200 g, 2500 g, 3000 g, o 3200 g, como de o aproximadamente 2100 g o 2200 g. En algunos casos, El RCF en la superficie interna de la pared lateral de la cavidad y/o en una capa superficial de las células es de más de o aproximadamente o es de o aproximadamente 1100 g, 1200 g, 1400 g, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g o más. Por el contrario, los métodos disponibles para procesar células a gran escala, por ejemplo, de más de 50 o 100 ml de volumen, usando bolsas flexibles, solo pueden permitir la centrifugación a una fuerza centrífuga relativa de no más de 200 g, 500 g, o 1000 g. Por tanto, los métodos proporcionados pueden producir una mayor eficacia en comparación con tales métodos.

El término "fuerza centrífuga relativa" o RCF se entiende generalmente como la fuerza efectiva impartida sobre un objeto o sustancia (como una célula, muestra o sedimento y/o un punto en la cámara u otro recipiente que se está rotando), con respecto a la fuerza gravitacional de la Tierra, en un punto particular del espacio en comparación con el eje de rotación. El valor puede determinarse usando fórmulas bien conocidas, teniendo en cuenta la fuerza gravitacional, la velocidad de rotación y el radio de rotación (distancia desde el eje de rotación y el objeto, sustancia o partícula en la que se mide el RCF).

Puede especificarse el objeto, partícula o localización (o medio de los mismos) en el que se expresa o determina el RCF en un caso dado. Por ejemplo, un valor de RCF o un valor o intervalo aproximado en algún contexto en la presente se da para una parte o localización particular dentro de la cámara de centrífuga usada en tales métodos, como en la superficie interna de la pared lateral de la cavidad de la cámara en la cual se procesan las células, como en cualquier punto a lo largo de la superficie de la pared lateral cilíndrica de la cavidad o en la distancia radial media de la misma. De manera similar, el valor de RCF puede darse para una distancia radial o distancia radial media dentro de otro recipiente, como una bolsa, en la que se procesan las células, con respecto al eje de rotación. En otros casos, el RCF se proporciona para la localización de la muestra o composición en su conjunto o en una o más células particulares o media o capa de la misma, durante la rotación. Por ejemplo, el valor puede ser el RCF en una capa superficial de las células en la cámara u otro recipiente durante la rotación, como en la superficie celular en la interfaz entre un líquido en el que se están girando las células y las propias células.

En general, el RCF se calcula mediante la fórmula  $1,119 \times 10^{-5} (\text{rpm})^2 r$  (o  $1,12 \times 10^{-5} \times (\text{rpm})^2 r$ ), donde  $r$  = el radio (es decir, la distancia en cm de una partícula, objeto o sustancia dada desde el eje de rotación), rpm=revoluciones por minuto. Por ejemplo, en algunos casos, el RCF en la superficie interna de la pared lateral de la cavidad de procesamiento interna en la que se procesan las células puede calcularse usando esta fórmula, en la que  $r$  es la distancia entre un punto en la superficie interna de la pared lateral y el eje de rotación. Alternativamente, el RCF en una célula o capa superficial de células (como la interfaz entre la(s) capa(s) de células y el líquido durante la rotación) puede calcularse usando la fórmula, en la que  $r$  es la distancia entre la célula, la capa superficial y/o la interfaz, o una media de los mismos. Por ejemplo, en algunos casos, el valor del radio ( $r$ ) para un RCF de la pared lateral puede basarse en la media de los radios máximos y mínimos posibles o todos los radios posibles a lo largo de la longitud de la pared lateral de la cámara. En algunos casos, el radio para una cámara de centrífuga ejemplar vendida por Biosafe AG para uso con el sistema Sepax® (por ejemplo, A-200/F) es de o de aproximadamente 2,6 cm o de o de aproximadamente 2,7 cm. En dicha cámara ejemplar, el radio para determinar RCF en la interfaz entre la(s) capa(s) de células y el líquido durante la rotación en dicha cámara puede calcularse añadiendo la distancia radial exacta o aproximada entre la pared lateral interna de la cavidad y la cámara ocupada por las células de la(s) capa(s) durante la rotación. Dicho valor puede calcularse o aproximarse usando métodos conocidos, por ejemplo, en base al diámetro de una de las células que se están procesando y/o el diámetro medio entre dichas células, por ejemplo, durante la rotación de la cámara. Dicho valor puede basarse en el tamaño completo de la célula, pero típicamente tendrá en cuenta el impacto sobre el volumen relativo ocupado por cada célula de la rotación o la propia fuerza, lo que en general reducirá dicho volumen. En algunos ejemplos, el valor aproximado se determina usando el

tamaño de un núcleo de la célula (o la media del mismo).

Por lo tanto, el RCF o el RCF medio durante un giro particular en una cámara o dispositivo particular puede calcularse para un punto o área dada en base a las revoluciones por minuto (rpm) y la distancia entre ese punto y el eje de rotación usando bien -métodos conocidos. Las revoluciones por minuto (rpm) pueden determinarse para varios dispositivos y cámaras usando métodos conocidos, por ejemplo, usando un tacómetro apropiado para el dispositivo, sistema o cámara en particular. Por ejemplo, en algunos casos, puede usarse una foto de mano o un tacómetro láser, por ejemplo, en combinación con cinta reflectante, en el caso de una centrífuga, sistema o dispositivo con una ventana desde el entorno a la cámara o cavidad, como el Sepax®, que es transparente o permite de otro modo el paso de la luz entre el tacómetro a la cámara. Para sistemas opacos, pueden usarse otros tacómetros como tacómetros de tipo junco vibratorios.

Como se entiende por los expertos en la técnica, cuando se usa en el contexto de varios envases y recipientes como cámaras, placas, tubos y bolsas, usados en el procesamiento y centrifugación de células y materiales de las mismas, rígidos generalmente describe un objeto, parte del mismo, o material que mantiene sustancialmente su forma y/o volumen cuando se coloca en un entorno, como bajo un grado de fuerza, temperatura u otra condición, en la que normalmente se esperaría que estuviese presente en el curso del uso del objeto. Por ejemplo, se entiende en la técnica que las cámaras y tubos centrífugos rígidos, como los hechos de plástico duro, se distinguen de los recipientes flexibles, como las bolsas de procesamiento celular y de cultivo celular, como las bolsas hechas de plásticos y gomas blandas, por ejemplo, fluoro etileno propileno y materiales similares, cuya forma cambia cuando se aplica presión manualmente o se mete líquido o gas, lo que hace que la bolsa se expanda. Por lo tanto, en algunos casos, los materiales rígidos incluyen plástico duro, metal, fibra de carbono, materiales compuestos, cerámica y vidrio, y/o se distinguen de los materiales flexibles como goma blanda, silicona y plásticos utilizados en la elaboración de bolsas flexibles, la forma y volumen de los cuales se cambia fácilmente por presión ordinaria, por ejemplo, presión manual o el llenado de un recipiente con líquido a temperatura ambiente o condiciones normales.

Por ejemplo, en algunos casos, la cámara de centrífuga rígida y/o parte(s) o material(es) de la misma, como la pared lateral rígida o parte de la misma que rodea la cavidad central, puede mantener su forma y/o volumen y/o no se quiebra o rompe de una manera que ya no contendría el líquido o gas, bajo condiciones particulares. En algunos casos, tales condiciones incluyen presión manual, como presión capaz de ser aplicada por mano humana. En algunos casos, tales condiciones incluyen fuerzas centrífugas específicas, como una fuerza (RCF), por ejemplo, fuerza efectiva, en la superficie interna de la pared lateral de la cavidad, de más de o aproximadamente 200 g, de más de o aproximadamente 300 g, o de más de o aproximadamente 500 g, como de más de o aproximadamente 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g o 3200 g; o por lo menos o aproximadamente 1000 g, 1500 g, 2000 g, o 2500 g, 3000 g, o 3200 g, como de o aproximadamente 2100 o 2200 g. En algunos casos, el entorno incluye condiciones particulares, como temperaturas de hasta aproximadamente -80° C y/o hasta temperaturas fisiológicas o temperaturas a las que las células permanecen viables y/o más altas, como temperaturas de 18° C a 42° C, como de 22° C a 39° C, por ejemplo por lo menos 25° C  $\pm$ 2° C o 37° C  $\pm$ 2° C.

Como se entiende en la técnica, describir un objeto como rígido o sustancialmente rígido no excluye la posibilidad de que se produzca algún cambio en la forma o el volumen de un objeto o material, como bajo una fuerza excesiva o inesperada. Por ejemplo, bajo fuerza excesiva o condiciones ambientales extremas, como las que están fuera de las usadas ordinariamente en relación con los métodos de transducción descritos en la presente.

La cámara generalmente incluye por lo menos una abertura, como una entrada, una salida y/o una entrada/salida, para permitir que las sustancias pasen entre la cavidad u otra parte de la cámara y otros espacios. Por ejemplo, tales aberturas generalmente están incluidas en por lo menos una de las paredes de la cámara. La cámara generalmente incluye por lo menos una entrada y por lo menos una salida, que en algunos casos puede ser la misma abertura (entrada/salida), a través de la cual el líquido y/o el gas pueden entrar y extraerse desde la cavidad. La abertura está generalmente asociada con otro entorno a través de un canal, por ejemplo, línea de tubos o sistema de líneas de tubos, en algunos casos, como a través de uno o más conectores.

En algunos casos, la cámara se incluye como parte de y/o es integral a un sistema, como un sistema cerrado o parcialmente cerrado, que además incluye componentes adicionales como líneas de tubos, conectores y recipientes. En algunos casos, la cámara se conecta previamente a uno o más de los componentes adicionales, directa y/o indirectamente. Dicha cámara puede proporcionarse como parte de un kit pre-montado, por ejemplo, un kit envasado para uso único, estéril, para su uso en conexión con los métodos proporcionados. En algunos casos, varios componentes se envasan por separado, por ejemplo, para permitir configuraciones personalizadas en las que un usuario conecta y organiza los componentes para un caso particular de los métodos de procesamiento.

Los componentes incluyen típicamente por lo menos una línea de tubos, y generalmente un conjunto o sistema de líneas de tubos, y por lo menos un conector. Los conectores ejemplares incluyen válvulas, puertos, espigas, soldaduras, sellos y abrazaderas de manguera. Los conectores y/u otros componentes pueden ser asépticos, por ejemplo, para permitir que todo el proceso se lleve a cabo en un sistema cerrado y estéril, que puede eliminar o reducir la necesidad de salas limpias, armarios estériles y/o sistemas de flujo laminar.

En algunos casos, la por lo menos una línea de tubos incluye una serie de líneas de tubos. Los tubos pueden estar hechos de un plástico, como el policarbonato, y pueden ser de varios tamaños y/o volúmenes, generalmente diseñados para permitir el flujo del líquido/gas deseado a la velocidad adecuada, y la conexión con la cámara y/u otros componentes. La serie de líneas de tubos permite generalmente el flujo de líquidos y gases entre la cámara y/u uno o más componentes del sistema, como los otros recipientes, facilitados en algunos aspectos por los conectores. En algunos casos, el sistema incluye líneas de tubos que conectan cada uno de los varios componentes con por lo menos otro de los componentes, donde se permite que el líquido fluya entre cada uno de los recipientes, como bolsas y la cámara, que puede permitirse o detenerse por la configuración de varios conectores como válvulas y/o abrazaderas.

En algunos aspectos, los conectores son tales que pueden colocarse o dirigirse a configuraciones alternativas, bloqueando, permitiendo y/o dirigiendo respectivamente el flujo de fluidos y gases a través de varios componentes, como entre varios recipientes y a través de ciertas líneas de tubos que conectan varios componentes, como las válvulas de rotación y de compuerta. En otros casos, ciertos conectores y/u otros componentes tienen una única configuración que permite, dirige o bloquea el paso de líquido o gas, como sellos, tapas y/o puertos o canales abiertos. Varios componentes en el sistema pueden incluir válvulas, puertos, sellos y abrazaderas. Las válvulas pueden incluir válvulas rotatorias como llaves de paso, válvulas rotatorias y válvulas de compuerta. Las válvulas pueden disponerse en un conjunto de colector o como una válvula rotativa multipuerto única. Los puertos pueden incluir puertos Luer o puertos de espiga. Los sellos pueden incluir juntas tóricas, juntas, sellos adhesivos y acoplamientos. Las abrazaderas pueden incluir abrazaderas de sujeción.

Otros componentes de un sistema incluyen recipientes capaces de contener o almacenar líquidos y/o gases. Los recipientes pueden incluir bolsas, viales, cajas, jeringuillas, bulbos, tanques, botellas, vasos de precipitados, cubos, matraces y líneas de tubos. Tales componentes pueden contener composiciones usadas y producidas por los métodos, incluyendo subproductos y productos intermedios y residuos. Tales composiciones pueden incluir líquido, incluyendo tampones, medios de crecimiento, medios de transducción, agua, diluyentes, lavados y/o solución salina, y también pueden incluir células, virus y/u otros agentes para usar en los pasos de procesamiento, como la transducción. Los recipientes también pueden incluir recipientes de residuos y recipientes que contienen uno o más productos de salida, como un producto que contiene células seleccionadas y/o transducidas por uno o más pasos de procesamiento de los métodos en la presente.

En algunos casos de los sistemas, una pluralidad de recipientes pueden conectarse de manera estéril en una o más posiciones en la línea de tubos del sistema. Los recipientes pueden conectarse simultáneamente y/o secuencialmente durante los métodos de procesamiento celular en los casos proporcionados. En algunos casos, los recipientes son desmontables o extraíbles de los conectores, de tal manera que los recipientes pueden retirarse del sistema y/o reemplazarse por otro recipiente en la misma posición para usar con el sistema. En algunos casos, no todas las posiciones de conector de un sistema están conectadas a un recipiente, de tal manera que el sistema puede contener conectores vacíos. En algunos de tales casos, un sistema cerrado se mantiene mediante la operación de una o más llaves de paso, válvulas o abrazaderas, ya sea manual o automáticamente, para cerrar la comunicación entre una línea de tubos y un conector vacío, por ejemplo, un puerto. En algunos casos, se mantiene un sistema cerrado sellando o separando un conector vacío, por ejemplo, un puerto.

En algunos casos de los sistemas, como los sistemas ejemplares representados en la FIG. 5, la FIG. 7 o la FIG. 11, los recipientes pueden conectarse operativamente a líneas de tubos, como a través de un conector, en las posiciones correspondientes a una posición de bolsa de entrada, posición de bolsa de diluyente 1, posición de bolsa de diluyente 2, posición de bolsa de residuos y/o posición de bolsa de salida. Con referencia a las Figuras, la designación de estas posiciones es solo para ejemplificar, y no se pretende que limite el tipo particular de recipiente o el contenido del recipiente que puede conectarse en una posición. Además, en los casos de los métodos proporcionados, no todas las posiciones del sistema, como las representadas en las Figuras, deben utilizarse para realizar los pasos de procesamiento de los métodos proporcionados. En algunos de tales casos, una línea de tubos que da servicio a un conector vacío, por ejemplo, puerto, puede desconectarse o cerrarse mediante el manejo de una llave de paso o válvula. En algunos casos, un conector vacío puede sellarse o separarse.

En algunos casos, el sistema, como un sistema cerrado, es estéril. En algunos casos, todas las conexiones de componentes del sistema, como entre la línea de tubos y un recipiente a través de un conector, se realizan en condiciones estériles. En algunos casos, las conexiones se realizan bajo flujo laminar. En algunos casos, las conexiones se realizan usando un dispositivo de conexión estéril que produce conexiones estériles, como soldaduras estériles, entre un tubo y un recipiente. En algunos casos, un dispositivo de conexión estéril efectúa la conexión en condiciones térmicas lo suficientemente altas como para mantener la esterilidad, como temperaturas de por lo menos 200° C, como por lo menos 260° C o 300° C.

En algunos casos, el sistema puede ser desechable, como un kit de un solo uso. En algunos casos, puede utilizarse un kit de un solo uso en una pluralidad de ciclos de un proceso o procesos, como por lo menos 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, en procesos que se producen de manera continua o semicontinua. En algunos casos, el

sistema, como un kit de un solo uso, se emplea para procesar células de un solo paciente.

Las cámaras centrífugas ejemplares incluyen las producidas y vendidas por Biosafe SA, incluyendo las que se usan con el sistema Sepax® y Sepax® 2, que incluyen cámaras centrífugas A-200/F y A-200 y varios kits para usar con tales sistemas. Ejemplos de cámaras, sistemas e instrumentos y armarios de procesamiento se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 6.123.655, la Patente de Estados Unidos Nº 6.733.433 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada con Nº de Publicación US 2008/0171951, y la Solicitud de Patente Internacional Publicada con Nº de publicación WO 00/38762. Dependiendo del proceso particular (por ejemplo, dilución, lavado, transducción, formulación), está dentro del nivel de un experto en la técnica elegir un kit particular que sea apropiado para el proceso. Los kits ejemplares para su uso con tales sistemas incluyen, pero no están limitados a, kits de un solo uso vendidos por BioSafe SA con los nombres de productos CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 o CS-900.2.

En algunos casos, el sistema comprende una serie de recipientes, por ejemplo, bolsas, tubos, llaves de paso, abrazaderas, conectores y una cámara de centrífuga. En algunos casos, los recipientes, como bolsas, incluyen uno o más recipientes, como bolsas, que contienen las células a transducir y las partículas del vector viral, en el mismo recipiente o recipientes separados, como la misma bolsa o bolsas separadas. En algunos casos, el sistema incluye además uno o más recipientes, como bolsas, que contienen medio, como diluyente y/o solución de lavado, que se introduce en la cámara y/o otros componentes para diluir, resuspender y/o lavar componentes y/o composiciones durante los métodos. Los recipientes pueden conectarse en una o más posiciones en el sistema, como en una posición correspondiente a una línea de entrada, línea de diluyente, línea de lavado, línea de residuos y/o línea de salida.

Los sistemas ejemplares para su uso en casos de los métodos proporcionados para llevar a cabo una o más o todas las partes del proceso se representan en la FIG. 5, la FIG. 7 y la FIG. 11. En un caso ejemplar como se muestra en la FIG. 5, la cámara de centrífuga (1) es por lo menos generalmente cilíndrica y es rotatoria alrededor de un eje de rotación. La cámara incluye una pared final (13) y una pared lateral rígida (14), y el miembro móvil, que es un pistón (2). Las superficies internas de la pared final (13), la pared lateral rígida (14) y el pistón (2) definen colectivamente los límites de la cavidad interna (7) de la cámara. La cavidad (7) es de volumen variable y es coaxial con la cámara, y está diseñada para contener el líquido y/o gas que se incluye dentro de la cámara durante los pasos de procesamiento. El pistón (2) se puede mover axialmente dentro de la cámara (1) para variar el volumen de la cavidad interna (7). La cámara incluye además una abertura de entrada/salida (6) para permitir el flujo de líquido y gas dentro y fuera de la cavidad en por lo menos algunas configuraciones del sistema. La abertura (6) está conectada operativamente a una serie de líneas de tubos (3) y conectores, incluyendo las válvulas de llave de paso (4), que son capaces de controlar el movimiento de fluido y/o gas entre los varios componentes del sistema. La serie de líneas de tubos (3) se conectan además con varios recipientes adicionales, que en la configuración representada incluyen bolsas etiquetadas como bolsa de entrada, bolsas de diluyente 1 y 2, una bolsa de residuos y una bolsa de salida. Las abrazaderas (5) pueden abrirse y cerrarse para permitir y bloquear el movimiento del fluido a través de las partes indicadas de la serie de tubos (3), permitiendo el flujo entre varios componentes del sistema. En algunos casos, cada recipiente está conectado operativamente a una línea de tubos a través de un puerto, como un puerto luer o puerto de espiga. Como ejemplo, con referencia a la FIG. 5, en cada punto que se muestra un recipiente, en algunos aspectos, el recipiente se conecta indirectamente a través de un puerto.

Aunque la FIG. 5 muestra la conexión de un recipiente en cada posición o línea, en un caso alternativo, en algunos aspectos, un recipiente no está conectado en cada posición o línea del sistema. En algunos casos de los sistemas proporcionados, un puerto está disponible en cada posición o línea para la conexión, y un recipiente está conectado a todas las posiciones o líneas o menos que todas las posiciones o líneas. En algunos casos, no todas las posiciones de conectores de un sistema están conectadas a un recipiente, de tal manera que el sistema puede contener conectores vacíos en cada posición o línea.

En algunos casos, el sistema, como el sistema mostrado en la FIG. 5, puede incluir un filtro estéril o microbiano. Un ejemplo de dicho sistema se muestra en la FIG. 7, que representa un filtro (15). En algunos casos, el filtro incluye una membrana de filtración que tiene un tamaño de poro que bloquea el paso de organismos microbianos, como bacterias o virus. En algunos casos, el tamaño de poro está entre 0,1 µm y 0,45 µm, como entre 0,1 µm y 0,22 µm, como aproximadamente 0,20 µm. En algunos casos, la membrana está compuesta de nitrocelulosa (nitrato de celulosa), acetato de celulosa, celulosa regenerada, poliamida, politetrafluoretileno (PTFE) o polietersulfona (PES). En algunos casos, el filtro incluye una tapa (16) para cerrar o sellar la membrana del filtro de la exposición al medio ambiente fuera del sistema cerrado. En algunos casos, la tapa está cerrada o sin ventilación. En algunos casos, la tapa es desmontable. En algunos casos, la tapa se ajusta al filtro mediante un accesorio de conexión luer. Como se describe con más detalle a continuación, en algunos casos, el filtro puede usarse para efectuar el paso de gas, como aire, hacia y desde la cámara del sistema. En algunos de tales casos, el paso de aire se mantiene en condiciones estériles o libres de microbios.

En un caso, la bolsa de entrada incluye células para el procesamiento por los métodos proporcionados, como la transducción. En un caso, la bolsa de diluyente 1 incluye partículas de vectores virales que contienen el

vector con el que transducen las células. Por lo tanto, en algunos casos, la composición de entrada que contiene las partículas de vectores virales y las células se genera efectuando la entrada de fluido desde la bolsa de entrada y efectuando la entrada de fluido desde la bolsa de diluyente 1. En algunos casos, la bolsa de diluyente 2 contiene solución de lavado. La bolsa de salida generalmente está diseñada para recoger las células siguiendo uno o más de los pasos de procesamiento, como por ejemplo, mediante la transferencia de la composición de salida desde la cavidad de la cámara a la bolsa de salida después de la incubación con partículas de vectores virales. Por tanto, en algunos casos, la bolsa de salida contiene células transferidas transducidas con y/o en las que la transducción se ha iniciado con las partículas del vector viral. En algunos casos, el procesamiento comprende la transducción de las células con un vector viral.

En algunos casos, puede usarse un colector multidireccional (17) para conectar operativamente uno o una pluralidad de recipientes al sistema a través de una pluralidad de puertos (18) conectados a un colector de líneas de tubos. El colector multidireccional puede contener una serie de líneas de tubos que se alimentan a la entrada/salida de la cámara para permitir el flujo entre la cámara y el recipiente o recipientes conectados. En algunos de tales casos, el colector conecta una pluralidad de recipientes, como por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más recipientes, en la misma posición o línea en el sistema. En algunos casos, todos los puertos del colector multidireccional (17) están conectados a un recipiente, como una bolsa. En algunos casos, no todos los puertos del colector multidireccional (17) están conectados a un recipiente, como una bolsa, de tal manera que un recipiente esté conectado a menos del número total de posiciones de puerto, por ejemplo, se conectan menos de 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 recipientes, como bolsas. En algunos casos, las líneas de tubos asociadas con el colector pueden contener una abrazadera o llave de paso, que puede abrirse o cerrarse para controlar el movimiento a través de la línea hacia el recipiente según sea necesario. El colector multidireccional (17) puede conectarse a cualquiera de las posiciones o líneas disponibles en el sistema, como una posición o línea designada como línea de entrada, línea de diluyente, línea de lavado, línea de residuos y/o línea de salida.

En algunos casos, se muestra un ejemplo de un colector multidireccional (17) para conectar un recipiente o recipientes en la FIG. 11 para conectar uno o una pluralidad de recipientes, como una o una pluralidad de bolsas, por ejemplo una o una pluralidad de bolsas de salida. Como se muestra, en algunos casos, puede conectarse un colector multidireccional (17) a una posición o línea de salida, que incluye una serie de líneas de tubos del colector que terminan con un conector, como un puerto (18), para la conexión operable a un recipiente, como una bolsa. Uno o más de los puertos, como todos los puertos o no todos los puertos, pueden conectarse a un recipiente. En un caso como se ejemplifica en la FIG. 11, pueden conectarse hasta 3 recipientes a cada línea de tubos del colector a través de un puerto. En otros casos, pueden conectarse hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 recipientes, como bolsas de salida, en la línea de salida. En algunos casos, una o una pluralidad de abrazaderas (5) asociadas con líneas de tubos, como la línea de tubos del colector, pueden abrirse o cerrarse para permitir o controlar el movimiento del líquido en una o más de la pluralidad de bolsas de salida. En algunos casos, una sola abrazadera puede controlar el movimiento del líquido en todas las bolsas de salida simultáneamente. En algunos casos, el movimiento del líquido dentro de cada una de la pluralidad de bolsas está regulado por separado mediante una abrazadera conectada operativamente a una línea de tubos asociada con un único recipiente respectivo, de tal manera que el movimiento del líquido dentro del recipiente respectivo puede hacerse separable del movimiento de líquido hacia todos los demás recipientes. En algunos casos, el movimiento de líquido dentro en cada recipiente, como cada bolsa, por ejemplo, cada bolsa de salida, puede hacerse secuencial.

En algunos casos, el sistema está incluido con y/o se asocia con otra instrumentación, incluida la instrumentación para operar, automatizar, controlar y/o monitorizar aspectos de los varios pasos de procesamiento realizados en el sistema. Esta instrumentación en algunos casos está contenida dentro de un armario.

En algunos casos, la instrumentación incluye un armario, que incluye una carcasa que contiene circuitos de control, una centrífuga, una tapa, motores, bombas, sensores, pantallas y una interfaz de usuario. Un dispositivo ejemplar se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 6.123.655, Patente de Estados Unidos Nº 6.733.433 y US 2008/0171951.

Los circuitos de control en algunos aspectos monitorizan y comunican información e instrucciones hacia y desde la otra instrumentación y varios componentes del sistema. En algunos casos, el armario contiene un dispositivo de interfaz de usuario, que comprende una pantalla y un dispositivo de entrada, como un teclado, un ratón o una pantalla táctil. La interfaz de usuario muestra información de los circuitos de control, permite al usuario detener e iniciar un proceso o pasos, como para efectuar un protocolo de transducción. La interfaz también puede solicitar al usuario que introduzca configuraciones para las variables usadas por los circuitos de control durante un paso del proceso, como un protocolo de transducción. Tales variables pueden incluir el volumen de varias soluciones que se añadirán y/o eliminarán de los varios recipientes y/o la cavidad de la cámara, el tiempo/duración de la sedimentación, centrifugación, agitación, mezclado y/o otros pasos del proceso, la fuerza rotacional, el movimiento del pistón, y/o la selección de programas.

La instrumentación incluye generalmente además una centrífuga, en la que se coloca la cámara de centrífuga para efectuar la rotación de la cámara. En algunos casos, la cámara de centrífuga está acoplada con una

unidad de accionamiento rotatoria en el aparato centrífugo, de tal manera que la cámara puede rotar alrededor de un eje de rotación. En algunos casos, una tapa se cierra en la parte superior de la cámara de centrífuga y mantiene la cámara en su sitio. En algunos casos, la cubierta incluye dos discos semicirculares que pueden rotar sobre una bisagra. Una centrífuga y una cubierta ejemplares se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.123.655 o en la Patente de Estados Unidos N° 6.733.433. La centrífuga bloquea la cámara de centrífuga en su sitio y rota la cámara de centrífuga contactando los lados o extremos de la cámara.

En algunos casos, un sensor o un conjunto de sensores en la centrífuga puede medir la velocidad de rotación de la cámara de centrífuga, la posición del miembro móvil o el volumen contenido dentro de la cavidad interna. Los sensores fuera de la centrífuga pueden detectar el color y el caudal del líquido y el gas que fluye hacia y desde la cámara de centrífuga. Los sensores también pueden detectar un tubo vacío o una cámara de centrífuga. Los sensores incluyen sensores ópticos, como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.123.655, la Patente de Estados Unidos N° 6.733.433 y la US 2008/0171951. En algunos casos, la información del sensor o sensores puede recibirse mediante circuitos de control. En base a la información transmitida, los circuitos de control, en algunos casos, pueden efectuar cambios en una o más de la velocidad de rotación de la cámara de centrífuga, la posición del miembro móvil, el volumen contenido en la cavidad, la orientación de una o más válvulas, puertos, sellos o abrazaderas, y otros procesos de la centrífuga, cámara o sistema.

En algunos casos, el armario incluye un motor o conjunto de motores. Los motores pueden comunicar información con los circuitos de control, que pueden operar o ajustar los motores.

En algunos casos, el motor o conjunto de motores pueden rotar la cámara de centrífuga dentro de la centrífuga. Los circuitos de control pueden iniciar, detener o ajustar la velocidad de los motores que rotan la cámara de centrífuga dentro de la centrífuga.

En algunos casos, los motores o el conjunto de motores pueden mover el miembro móvil dentro de la cámara de centrífuga. Mover el miembro móvil varía el volumen de la cavidad interna, provocando la entrada o extracción de líquido o gas hacia o desde la cavidad interna.

En algunos casos, los motores o el conjunto de motores pueden manejar las válvulas, puertos, sellos y abrazaderas descritos en la presente. Los circuitos de control pueden hacer que los motores abran, cierren o dirijan el fluido hacia o desde un recipiente o la cámara de centrífuga a través de la serie de tubos.

En algunos casos, el motor o motores son un motor eléctrico, motor neumático o motor hidráulico. En algunos casos, el armario incluye un motor eléctrico para manejar algunos aspectos y un motor neumático para manejar otros aspectos. En algunos casos, el armario incluye un motor eléctrico para centrifugación y un motor neumático para controlar el movimiento del miembro móvil.

### III. Transferencia de ácidos nucleicos virales a las células, por ejemplo, mediante transducción

En algunos casos, los pasos de procesamiento de los métodos incluyen aquellas para la transferencia de partículas virales a las células, como vectores virales que codifican productos recombinantes para ser expresados en las células. Las partículas del vector viral incluyen generalmente un genoma que contiene ácidos nucleicos recombinantes como transgenes que codifican dichos productos. En algunos casos, las partículas del vector viral codifican un receptor recombinante, como un receptor de antígeno quimérico (CAR), por lo que la transducción de células puede generar células que expresan receptor recombinante (por ejemplo, CAR). La transferencia del ácido nucleico del vector viral a las células puede usar cualquiera de una serie de métodos conocidos. La transferencia es típicamente por transducción. Los métodos alternativos para transferir vectores virales a las células incluyen transposones y/o electroporación. Tales pasos de procesamiento pueden realizarse en una cámara de centrífuga de acuerdo con los casos de los métodos proporcionados. En algunos casos, la cámara de centrífuga es integral a un sistema cerrado, de tal manera que dichos pasos de procesamiento se realizan en un sistema cerrado.

La transferencia se lleva a cabo generalmente por transducción. Los métodos para la transferencia viral, por ejemplo, la transducción, implican generalmente por lo menos el inicio de la transducción incubando en una cámara de centrífuga una composición de entrada que comprende las células a transducir y las partículas del vector viral que contienen el vector, en condiciones en las que las células se transducen o se inicia la transducción en por lo menos algunas de las células en la composición de entrada, en donde el método produce una composición de salida que comprende las células transducidas.

En algunos casos, las células para transducción y/o células transducidas contienen células inmunes, como células T, para uso en inmunoterapia adoptiva. En algunos casos, antes de la incubación de las células con partículas de vectores virales, las células para la transducción se obtienen por métodos que incluyen aislar, como seleccionar, un subconjunto particular de células presentes en una muestra biológica. Los métodos relacionados con el aislamiento y la selección de células para la transducción, y las células resultantes, se describen a continuación. En algunos casos, antes del inicio de los procesos para la transducción, las células T se activan, como mediante



cultivo y estimulación como se describe a continuación. En algunos casos, uno o más de todos o parte de los pasos relacionados con el aislamiento, por ejemplo, selección, y activación también pueden llevarse a cabo en la cavidad de una cámara centrífuga de acuerdo con los casos proporcionados como se describe a continuación.

5 En algunos casos, las partículas del vector viral usadas en aspectos del método de transducción son adecuadas para la transducción de las células, como una célula inmune, por ejemplo una célula T. En algunos casos, las partículas del vector viral son partículas de vector retroviral como partículas de vector lentiviral o partículas de vector gammaretroviral. En algunos de tales casos, la partícula del vector viral contiene un genoma que comprende un ácido nucleico recombinante, es decir, un vector viral recombinante. Los ejemplos de tales partículas de vectores virales se describen a continuación.

10 La composición de entrada (la composición que contiene las partículas del vector viral y células durante el paso de transducción) puede incluir además uno o más agentes adicionales, como aquellos para promover la eficiencia de la transducción, como policationes que incluyen protamina (por ejemplo, sulfato de protamina), bromuro de hexadimetrina (POLYBRENE®, Abbott Laboratories Corp) y CH-296 (RETRONECTIN®, Clontech). En algunos casos, el policatión puede estar presente en la composición de entrada a una concentración final de 1 µg/ml a 100 µg/ml, como de 5 µg/ml a 50 µg/ml. La composición también puede incluir medios, incluyendo un medio de cultivo celular que incluye un medio diseñado para el cultivo del tipo celular a procesar, como un medio de células madre hematopoyéticas, por ejemplo, un medio libre de suero.

15 En los métodos proporcionados, todos o parte de los pasos de procesamiento para la transducción de células pueden tener lugar en la cámara de centrífuga, como bajo centrifugación o rotación. En algunos de tales casos, la composición de entrada que contiene las células y las partículas del vector viral se proporcionan o se llevan a la cavidad interna de la cámara de centrífuga. En algunos casos, la composición de entrada se incuba en condiciones que comprenden la rotación de la cámara de centrífuga. En algunos casos, la rotación puede efectuarse a fuerzas centrífugas relativas mayores que las que pueden lograrse usando bolsas de plástico flexibles o placas de plástico con múltiples pocillos.

20 En algunos casos se logra una mayor eficiencia de transducción en parte debido a la capacidad de los métodos para llevar a cabo la transducción a una mayor fuerza centrífuga relativa (RCF) en comparación con otros métodos para procesar células a escalas grandes. Por ejemplo, ciertos métodos disponibles para procesar células a gran escala, por ejemplo, un volumen mayor de 50 o 100 ml, usando bolsas flexibles, pueden permitir solamente la centrifugación a una fuerza centrífuga relativa de no más de 200, 500 o 1000 g. Al permitir la centrifugación a una mayor aceleración o fuerza relativa, por ejemplo, de o de aproximadamente o de por lo menos o de aproximadamente 1000, 1500, 2000, 2100, 2200, 2500, 3000 g, 3200 g o 3600 g, los métodos proporcionados pueden mejorar o permitir la co-sedimentación de virus y células en la composición durante la transducción, mejorando la tasa de interacciones de virus a célula, mejorando de este modo la transducción.

25 Los métodos generalmente son capaces de realizar la transducción a gran escala. Por tanto, la composición de entrada incubada durante la transducción y/o la composición de salida puede contener por lo menos un cierto volumen y/o número de células. En algunos casos, el volumen de líquido de la composición de entrada, o el volumen de líquido durante por lo menos un punto durante la incubación, es de por lo menos o de más de aproximadamente 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml o 500 ml. En algunos casos, la composición de entrada, la composición transducida, y/o las células totales transducidas por los métodos incluyen por lo menos aproximadamente  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ , o  $1 \times 10^{10}$  células. En algunos casos, para por lo menos una parte de la incubación, el recipiente en el que se transducen las células, por ejemplo, la cámara de centrífuga o cavidad de la misma, contiene por lo menos o aproximadamente  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  o  $1 \times 10^{10}$  células. Tales números y volúmenes también pueden aplicarse a otros pasos de procesamiento llevados a cabo en el sistema, por ejemplo, en la cavidad de la cámara, como los pasos de separación de células y/o de lavado.

30 En algunos casos, al describir los varios pasos de los procesos en una cavidad de la cámara de centrífuga, incluidos los procesos para la transducción, como la preparación de la composición de entrada, u otro proceso como se describe en las secciones posteriores, la referencia a cualquier volumen es u volumen n objetivo. En algunos casos, los volúmenes exactos utilizados en varios pasos (por ejemplo, lavado, dilución o formulación) pueden variar de un volumen objetivo deseado, debido, en algunos aspectos, a volúmenes muertos en una línea de tubos, cebado de líneas, sensibilidad de un sensor, control del usuario y otros factores asociados con el mantenimiento o monitorización de un volumen. Los métodos pueden permitir un control preciso de los volúmenes como, en algunos aspectos, la inclusión de un sensor como parte de los circuitos asociados con el sistema. En algunos casos, los volúmenes varían en no más del 10% de un volumen objetivo deseado, como no más del 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%. En algunos casos, los volúmenes están dentro de 2 ml o 3 ml de un volumen objetivo y/o varían en no más de 2 ml o 3 ml de un volumen objetivo.

35 En algunos casos, los pasos de procesamiento se llevan a cabo combinando las células y las partículas del vector viral para generar una composición de entrada. En aspectos del método, la composición de las células y las

- partículas del vector viral se preparan de tal manera que la composición de entrada combinada resultante tiene una proporción baja de volumen total de líquido con respecto al área superficial interna de la cavidad de la cámara de centrífuga. En algunos casos, el volumen total de líquido es suficiente para cubrir o simplemente exceder un volumen de células presentes como una monocapa en la superficie interna de la cavidad después de la rotación de la cámara de centrífuga, a la vez que se minimiza el espesor del líquido que cubre las células. En algunos casos, reducir el espesor del líquido puede reducir el tiempo de sedimentación requerido para el contacto de las partículas del vector viral con las células porque las partículas del vector viral tienen menos distancia que recorrer y /o están sometidas a menos resistencia del medio viscoso.
- En algunos casos, ventajas como la eficiencia de transducción mejorada se deben por lo menos en parte a la capacidad de usar un volumen de líquido relativamente más bajo por volumen de células, número de células o tamaño de sedimentos de células, durante procesos de transducción, como durante la rotación, particularmente en comparación con otros métodos para la producción a gran escala.
- En algunos casos, el volumen de líquido de la composición de entrada (que contiene células y partículas del vector viral) presente en el recipiente, por ejemplo, la cavidad, durante la rotación no es de más de aproximadamente 0,5, 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, o 7 mililitros (ml) por pulgada cuadrada del área de superficie interna de la cavidad durante la rotación o el área de superficie interna máxima de la cavidad.
- En casos particulares, el volumen de líquido medio de la composición de entrada presente en el recipiente, por ejemplo, la cavidad, en la que se inicia la transducción, como la media del volumen de líquido de todos los procesos realizados en un ciclo del método, es de no más de aproximadamente 0,5, 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, o 7 mililitros (ml) por pulgada cuadrada del área superficial interna de la cavidad durante la incubación o del área superficial interna máxima de la cavidad. En algunos casos, el volumen máximo de líquido de la composición de entrada (que contiene células y partículas del vector viral) presente en el recipiente, por ejemplo, la cavidad, en la que se inicia la transducción, como el volumen máximo de líquido de todos los procesos realizados en un ciclo del método, no es más de aproximadamente 0,5, 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 o 7 mililitros (ml) por pulgada cuadrada del área de superficie interna de la cavidad de la cámara de centrífuga. En algunos casos, el volumen de líquido, como el volumen de líquido de la composición de entrada, presente en el recipiente, por ejemplo, la cavidad, durante la rotación no es de más del 50%, tal como no más del 40%, no más del 30%, no más del 20% o no más del 10% del volumen del área superficial interna de la cavidad durante la rotación o el área superficial interna máxima de la cavidad. En algunos casos, el resto del volumen puede ser gas, como aire.
- En algunos casos, el volumen de líquido total de la composición de entrada (que contiene células y partículas de vector viral) en la cámara de centrífuga durante la incubación, como durante la rotación, es de por lo menos 5 ml o por lo menos 10 ml pero no es de más de 220 ml, como no más de 200 ml. En algunos casos, el volumen de líquido de la composición de entrada durante la incubación, como durante la rotación, no es de más de 100 ml, 90 ml, 80 ml, 70 ml, 60 ml, 50 ml, 40 ml, 30 ml o 20 ml. En aspectos del método proporcionado, la composición de entrada se prepara a un volumen total para lograr una concentración, cantidad y/o proporción deseadas de células y partículas de vectores virales, tal como se describe a continuación.
- En algunos casos, los métodos permiten al usuario controlar la proporción de células con la superficie de la cavidad, por ejemplo, variando el volumen de la cavidad y/o el número de células añadidas. En algunos casos, esto permite la reducción de la capa de células (por ejemplo, sedimento celular) en la superficie de la cavidad en comparación con otros métodos, particularmente aquellos disponibles para la transducción a gran escala bajo fuerza centrífuga, como los que se llevan a cabo en bolsas de centrífuga. En algunos casos, la capacidad de controlar el espesor de la capa de células en la cavidad de la cámara de centrífuga durante la transducción puede llevar a una eficiencia de transducción aumentada en condiciones comparables de otro modo y/o la falta de un número de copias aumentado con una mayor transducción de virus aumentada.
- En algunos casos, las células en los métodos proporcionados están presentes en la cavidad en o sobre una monocapa única, o no más de o aproximadamente 1,5 o 2 veces más que una monocapa única, o no son sustancialmente más gruesas que una monocapa, durante la incubación para transducción bajo fuerza centrífuga. Esta reducción durante la centrifugación puede facilitar y mejorar las interacciones entre el virus y las células y evitar aumentos en el número de copias virales (VCN), que puede tener lugar particularmente en el contexto de un alto virus relativo o unidades infecciosas (UI), por ejemplo, cuando las capas exteriores o superiores de las células se transducen preferencialmente.
- En algunos casos, la composición de entrada contiene por lo menos 1 millón de células por cm<sup>2</sup> del área superficial interna de la cavidad durante por lo menos una parte de dicha incubación, como durante la rotación de la composición de entrada en la cámara de centrífuga. En algunos casos, la composición de entrada contiene por lo menos 2 millones de células por cm<sup>2</sup>, 3 millones de células por cm<sup>2</sup>, 4 millones de células por cm<sup>2</sup>, 5 millones de células por cm<sup>2</sup>, 6 millones de células por cm<sup>2</sup>, 7 millones de células por cm<sup>2</sup>, 8 millones de células por cm<sup>2</sup>, 9 millones de células por cm<sup>2</sup>, 10 millones de células por cm<sup>2</sup> o 20 millones de células por cm<sup>2</sup> del área superficial interna de la cavidad durante por lo menos una parte de dicha incubación, como durante la rotación de la

composición de entrada en la cámara de centrífuga. En algunos casos, el área superficial interna de la cavidad durante por lo menos una parte de dicha incubación, como durante la rotación, es de por lo menos o aproximadamente  $1 \times 10^9 \mu\text{m}^2$  o es de por lo menos o aproximadamente  $1 \times 10^{10} \mu\text{m}^2$ .

5 En algunos casos, el número total de células en la composición de entrada durante por lo menos una parte de dicha incubación, como durante la rotación de la composición de entrada en la cámara de centrífuga, es de por lo menos  $10 \times 10^6$  células,  $20 \times 10^6$  células,  $30 \times 10^6$  células,  $40 \times 10^6$  células,  $50 \times 10^6$  células,  $60 \times 10^6$  células,  $70 \times 10^6$  células,  $80 \times 10^6$  células,  $100 \times 10^6$  células,  $200 \times 10^6$  células,  $300 \times 10^6$  células o  $400 \times 10^6$  células.

10 En algunos casos, los pasos de procesamiento en la cavidad cerrada de un sistema centrífugo también pueden usarse para procesar las células, tales como las células activadas, antes de la transducción. En algunos casos, el procesamiento puede incluir la dilución o concentración de las células a una concentración o número deseados. En algunos casos, los pasos de procesamiento pueden incluir una reducción de volumen para aumentar de ese modo la concentración de células como se desee. En algunos casos, el procesamiento incluye el intercambio de un medio en un medio aceptable o deseado para la transducción.

15 En algunos casos, la composición de entrada comprende una cierta proporción de copias de las partículas del vector viral o unidades infecciosas (UI) de las mismas, por número total de células (UI/célula) en la composición de entrada o número total de células a ser transducido. Por ejemplo, en algunos casos, la composición de entrada incluye aproximadamente o por lo menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 UI de las partículas del vector viral por una de las células.

20 En ciertos casos, la capacidad de usar una UI más alta en los presentes métodos proporciona ventajas en comparación con otros métodos. En condiciones por lo demás idénticas, el uso de una proporción UI/célula más alta lleva generalmente a una eficiencia de transducción más alta, o lo hace hasta un cierto nivel superior de UI/célula en el que el aumento correspondiente en la eficiencia puede estabilizarse. Sin embargo, con ciertos métodos disponibles, aumentar la UI/célula y, por lo tanto, la eficiencia de transducción también lleva a un aumento en el número de copias de vectores (VCN), que puede presentar riesgos de seguridad y puede no cumplir con los estándares regulatorios.

25 En algunos casos, con los métodos proporcionados, el VCN medio entre las células transducidas en la composición de salida, como las células que contienen el vector viral o las células que expresan una molécula codificada por el vector viral, no aumentan con un aumento de UI/célula en la composición de entrada. En algunos casos, en los métodos proporcionados, el VCN medio entre las células transducidas disminuye con una proporción de UI/célula aumentada en la composición de entrada.

30 En algunos casos, el título de las partículas del vector viral está entre o entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  UI/ml y  $1 \times 10^8$  UI/ml, como entre o entre aproximadamente  $5 \times 10^6$  UI/ml y  $5 \times 10^7$  UI/ml, como por lo menos  $6 \times 10^6$  UI/ml,  $7 \times 10^6$  UI/ml,  $8 \times 10^6$  UI/ml,  $9 \times 10^6$  UI/ml,  $1 \times 10^7$  UI/ml,  $2 \times 10^7$  UI/ml,  $3 \times 10^7$  UI/ml,  $4 \times 10^7$  UI/ml o  $5 \times 10^7$  UI/ml.

35 En algunos casos, la composición de entrada contiene una concentración de partículas de vector viral durante por lo menos una parte de dicha incubación, como durante la rotación de la composición de entrada en la cámara de centrífuga, que tiene una cierta proporción de copias de partículas del vector viral o unidades infecciosas (UI) de las mismas, por número total de células (UI/célula) en la composición de entrada o número total de células a transducir por volumen de líquido total de la composición de entrada presentes durante por lo menos una parte de dicha incubación, como durante la rotación, es decir, UI/célula/ml. En algunos casos, la composición de entrada incluye por lo menos 0,01 UI, 0,05 UI, 0,1 UI, 0,5 UI o 1 UI de las partículas del vector viral por una de las células por ml del volumen de líquido de la composición de entrada durante por lo menos una parte de dicha incubación, como durante la rotación.

40 En algunos casos, el paso de crear la composición de entrada (células y partículas de vectores virales) puede realizarse en la cámara de centrífuga. En algunos casos, el paso de crear la composición de entrada se realiza fuera de la cámara de centrífuga. Por tanto, el término "composición de entrada" no significa que toda la composición se recibe en el recipiente respectivo, por ejemplo, tubo, bolsa o cavidad, de una vez, o para excluir la introducción de partes de la composición desde diferentes recipientes o líneas. Las composiciones de entrada pueden incluir aquellas formadas al introducir dos composiciones diferentes en la cavidad de la cámara y mezclar las dos, creando de este modo la composición de entrada.

45 En algunos casos, la composición de entrada puede recibirse o transferirse de otro modo al recipiente en el que tiene lugar la incubación, como la rotación, desde el mismo recipiente o desde más de un recipiente separado. Por ejemplo, la composición de entrada puede recibirse en la cámara introduciendo una composición que contiene las células y otra composición que contiene las partículas del vector viral, que puede hacerse de forma secuencial o simultánea. Alternativamente, la composición de entrada que contiene las partículas del vector viral y las células se recibe en la cavidad u otro recipiente en el que se va a llevar a cabo la transducción.

En algunos casos, donde la transducción se lleva a cabo en la cavidad interna de la cámara de centrífuga, esto se logra permitiendo que solo una cierta parte de la cavidad incluya la composición de entrada de líquido. Esto puede lograrse, por ejemplo, introduciendo aire o gas en una parte de la cavidad, y/o incluyendo uno o más objetos sólidos en un espacio dentro de la cavidad, como un espacio interno. En algunos casos, esto puede minimizar o reducir el volumen de líquido total de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad durante la incubación, como durante la rotación, de dicha cámara de centrífuga por pulgada cuadrada del área superficial interna de la cavidad en comparación con la ausencia de gas en la cavidad y/o ausencia de uno o más objetos sólidos en el espacio de la cavidad. De esta manera, en comparación con otros métodos, en los que la difusión del virus a través de un gran volumen de líquido en comparación con el volumen de las células puede limitar la eficacia de la transducción, los métodos proporcionados pueden ser ventajosos. Por tanto, mientras que en algunos casos, la composición de entrada ocupa todo o sustancialmente todo el volumen de la cavidad interna durante por lo menos una parte de la incubación, en algunos casos, durante por lo menos una parte de la incubación, la composición de entrada ocupa solo un parte del volumen de la cavidad interna durante dicha incubación.

En algunos de tales casos, el volumen de la cavidad durante esta por lo menos una parte de la incubación puede incluir además un gas recibido en dicha cavidad por la una o más aberturas, por ejemplo, entrada, en la cavidad, tal como antes o durante dicha incubación. En algunos casos del método, el aire se esteriliza o es aire estéril. En algunos casos, el aire está libre o sustancialmente libre de contaminantes microbianos u otros agentes potencialmente patógenos.

En algunos casos, el suministro o la recepción de gas, como aire, puede efectuarse de cualquier manera que permita el paso de aire a la cavidad interna de la cámara de centrífuga como, en algunos aspectos, sin comprometer la esterilidad del sistema cerrado. En algunos casos, puede añadirse gas, como aire, a un recipiente en condiciones estériles, y el recipiente puede conectarse de manera estéril en una posición en el sistema para transferirlo a la cámara. En algunos casos, la adición de gas, como aire, al recipiente, como una bolsa, se efectúa en condiciones de flujo laminar, como en un armario o campana de seguridad biológica. En algunos casos, el gas, como el aire, se añade al recipiente junto con un volumen de líquido, como un volumen de líquido que contiene una composición de células y/o un volumen de líquido que contiene una composición de partículas de vectores virales. Por lo tanto, en algunos casos, el suministro o la recepción de gas, como aire, en la cavidad interna de la cámara se produce junto o simultáneamente con el suministro o la entrada de uno o ambos de las células o las partículas del vector viral que constituyen la composición de entrada.

En algunos casos, el suministro o la recepción de gas, como aire, en la cámara, se logra usando una jeringuilla que puede conectarse a cualquier conexión luer asociada con el sistema, y que está conectada operativamente a la cavidad interna de la cámara de centrífuga. En algunos casos, el aire se transfiere a la jeringuilla en condiciones estériles, como bajo flujo laminar. En algunos casos, la jeringuilla es una jeringuilla estéril como, en algunos aspectos, una jeringuilla que contiene un émbolo móvil que no está expuesto al entorno no estéril circundante. En algunos casos, la jeringuilla contiene un filtro en su extremo para efectuar la transferencia estéril de gas, como aire, dentro de la cavidad interna de la cámara.

En algunos casos, el suministro o la recepción de gas, como aire, en la cavidad interna de la cámara se logra mediante el uso de un filtro conectado operativamente a la cavidad interna de la cámara a través de una línea de tubos estéril. En algunos de tales casos, el filtro es un filtro estéril o microbiano como se describe con referencia a un sistema ejemplar, como en algunos aspectos, un filtro como se ejemplifica en la FIG. 7. En algunos casos, un dispositivo está conectado al filtro, tal como a través de una conexión luer, para transferir el aire. En algunos de tales casos, el dispositivo es una jeringuilla, bomba u otro dispositivo de infusión. En algunos casos, el gas es aire, y la entrada de aire a través del filtro es directamente del entorno circundante. En algunos casos, el filtro contiene una tapa, como una tapa no ventilada, que es separable o desmontable para controlar la transferencia de aire al filtro según se desee.

Por lo tanto, en algunos casos, los métodos incluyen proporcionar o recibir una composición de entrada líquida y un volumen de gas como aire, dentro de la cavidad interna de la cámara. El volumen de gas, como aire, que se proporciona o recibe es una función del volumen de la composición que contiene células y la composición que contiene partículas del vector viral que forman la composición de entrada. En algunos casos, el volumen de gas es la diferencia entre el volumen total de la cavidad interna y el volumen de líquido de la composición de entrada. En algunos casos, el volumen total de gas y líquido no es más de 200 ml, de tal manera que el volumen de gas proporcionado o recibido en la cavidad interna es la diferencia entre 200 ml y el volumen de líquido de la composición de entrada (células y partículas del vector viral).

En un aspecto ejemplar de los métodos proporcionados, el método de transducción incluye proporcionar a una cavidad interna de un sistema de cámara de centrífuga cerrada, en el que la cavidad interna tiene un área superficial de por lo menos aproximadamente  $1 \times 10^9 \mu\text{m}^2$  o por lo menos aproximadamente  $1 \times 10^{10} \mu\text{m}^2$ , una composición que contiene por lo menos o aproximadamente  $50 \times 10^6$  células en un volumen que no es de más de 100 ml. En algunos casos, la composición celular contiene por lo menos o aproximadamente  $100 \times 10^6$  células o por

lo menos o aproximadamente  $200 \times 10^6$  células en un volumen que no es de más de 50 ml, 40 ml, 30 ml, 20 ml, 10 ml o 5 ml. En algunos casos, antes de proporcionar las células a la cavidad interna, la composición de las células se diluye o se concentra a un volumen de no más de 100 ml, como no más de 50 ml, 40 ml, 30 ml, 20 ml, 10 ml o 5 ml. Además de la composición celular, el método también incluye proporcionar, en algunos aspectos, una composición que contiene partículas de vectores virales en una cantidad que es por lo menos 1 UI/célula en un volumen de tal manera que el volumen de líquido total, incluyendo de la composición que contiene células, es menor que el volumen máximo de la cavidad interna de la cámara de centrifuga, como no más de 200 ml, generando de este modo la composición de entrada. En algunos casos, la composición que contiene partículas del vector viral se proporciona en una cantidad que es por lo menos 1,6 UI/célula, 1,8 UI/célula, 2,0 UI/célula, 2,4 UI/célula, 2,8 UI/célula, 3,2 UI/célula o 3,6 UI/célula. En algunos casos, el volumen de líquido total de la composición de entrada es menor de 100 ml, menor de 90 ml, menor de 80 ml, menor de 60 ml, menor de 40 ml, menor de 20 ml. Opcionalmente, el método también puede incluir proporcionar gas, como aire hasta el volumen total de la cavidad interna, por ejemplo, de tal manera que el volumen total ocupado en la cavidad interna de la cámara de centrifuga sea de hasta o aproximadamente 200 ml.

En algunos casos, la composición que contiene células y la composición que contiene partículas de vector viral, y opcionalmente aire, pueden combinarse o mezclarse antes de proporcionar las composiciones a la cavidad. En algunos casos, la composición que contiene células y la composición que contiene partículas del vector viral, y opcionalmente aire, se proporcionan por separado y se combinan y mezclan en la cavidad. En algunos casos, puede proporcionarse una composición que contiene células, una composición que contiene partículas de vector viral, y opcionalmente aire, a la cavidad interna en cualquier orden. En cualquiera de tales casos, una composición que contiene células y partículas del vector viral es la composición de entrada una vez combinada o mezclada, tanto si se combina o se mezcla dentro o fuera de la cámara de centrifuga y/o tanto si las células y las partículas del vector viral se proporcionan a la cámara de centrifuga juntas o por separado, como simultánea o secuencialmente.

En algunos casos, la entrada del volumen de gas, como aire, se produce antes de la incubación, como la rotación, en el método de transducción. En algunos casos, la entrada del volumen de gas, como el aire, se produce durante la incubación, como la rotación, en el método de transducción.

En algunos casos, el volumen de líquido de las células o las partículas del vector viral que constituyen la composición de entrada, y opcionalmente el volumen de aire, puede ser un volumen predeterminado. El volumen puede ser un volumen es programado y/o controlado por los circuitos asociados con el sistema.

En algunos casos, la entrada de la composición de entrada, y opcionalmente gas, como aire, se controla manualmente, semiautomáticamente y/o automáticamente hasta que se haya recibido un volumen deseado o predeterminado en la cavidad interna de la cámara. En algunos casos, un sensor asociado con el sistema puede detectar líquido y/o gas que fluye hacia y desde la cámara de centrifuga, como a través de su color, caudal y/o densidad, y puede comunicarse con los circuitos asociados para detener o continuar la entrada según sea necesario hasta que se haya logrado la entrada de dicho volumen deseado o predeterminado. En algunos aspectos, un sensor que está programado o que solo puede detectar líquido en el sistema, pero no gas (por ejemplo, aire), puede permitir el paso de gas, como aire, al sistema sin detener la entrada. En algunos de tales casos, se puede colocar una pieza de tubo no transparente en la línea cerca del sensor mientras se desea la entrada de gas, como aire. En algunos casos, la entrada de gas, como el aire, puede controlarse manualmente.

En aspectos de los métodos proporcionados, la cavidad interna de la cámara de centrifuga se somete a rotación a alta velocidad. En algunos casos, la rotación se efectúa antes de, simultáneamente, posteriormente o intermitentemente con la entrada de la composición de entrada líquida y opcionalmente aire. En algunos casos, la rotación se efectúa después de la entrada de la composición de entrada líquida, y opcionalmente aire. En algunos casos, la rotación es por centrifugación de la cámara de centrifuga a una fuerza centrífuga relativa en la superficie interna de la pared lateral de la cavidad interna y/o en una capa superficial de las células de o aproximadamente de o por lo menos de o aproximadamente de 800 g, 1000 g, 1100 g, 1500, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2500 g, 3000 g, 3500 g o 4000 g. En algunos casos, la rotación es por centrifugación a una fuerza que es de más de o aproximadamente 1100 g, como de más de o aproximadamente 1200 g, de más de o aproximadamente 1400 g, de más de o aproximadamente 1600 g, de más de o aproximadamente 1800 g, de más de o aproximadamente 2000 g, de más de o aproximadamente 2400 g, de más de o aproximadamente 2800 g, de más de o aproximadamente 3000 g o de más de o aproximadamente 3200 g.

En algunos casos, el método de transducción incluye rotación o centrifugación de la composición de entrada, y opcionalmente aire, en la cámara de centrifuga durante más de o aproximadamente 5 minutos, como más de o aproximadamente 10 minutos, más de o aproximadamente 15 minutos, más de o aproximadamente 20 minutos, más de o aproximadamente 30 minutos, más de o aproximadamente 45 minutos, más de o aproximadamente 60 minutos, más de o aproximadamente 90 minutos o más de o aproximadamente 120 minutos. En algunos casos, la composición de entrada, y opcionalmente aire, se rota o centrifuga en la cámara de centrifuga durante más de 5 minutos, pero no más de 60 minutos, no más de 45 minutos, no más de 30 minutos o no más de 15 minutos.

En algunos casos, el método de transducción incluye rotación o centrifugación de la composición de entrada, y opcionalmente aire, en la cámara de centrífuga durante entre o entre aproximadamente 10 minutos y 60 minutos, 15 minutos y 60 minutos, 15 minutos y 45 minutos, 30 minutos y 60 minutos o 45 minutos y 60 minutos, cada uno inclusive, y a una fuerza en la superficie interna de la pared lateral de la cavidad interna y/o en una capa superficial de las células de por lo menos o de más de o aproximadamente 1000 g, 1100 g, 1200 g, 1400 g, 1500 g, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2400 g, 2800 g, 3200 g o 3600 g.

En algunos casos, el método incluye efectuar la extracción desde la cavidad interna de la cámara de centrífuga y una composición de salida, que es la composición resultante de células incubadas con partículas de vectores virales en condiciones que incluyen rotación o centrifugación en la cámara de centrífuga en cualquiera de los casos anteriores como se describen. En aspectos del método, la composición de salida incluye células transducidas con, o en las cuales la transducción se ha iniciado con, un vector viral. En algunos casos, la extracción de la composición de salida es a una bolsa de salida que está conectada operativamente como parte de un sistema cerrado con la cámara de centrífuga. En algunos casos, la extracción de la composición de salida es posterior a la rotación o centrifugación. En algunos casos, la extracción de la composición de salida es simultánea con o parcialmente simultánea con la rotación o la centrifugación, como en un proceso semicontinuo o continuo.

En algunos casos, el gas, como el aire, en la cavidad de la cámara es expulsado de la cámara. En algunos casos, el gas, como el aire, se expulsa a un recipiente que está conectado operativamente como parte del sistema cerrado con la cámara de centrífuga. En algunos casos, el recipiente es un recipiente libre o vacío. En algunos casos, el aire, como el gas, en la cavidad de la cámara se expulsa a través de un filtro que está conectado operativamente a la cavidad interna de la cámara a través de una línea de tubos estéril. En algunos casos, el aire se expulsa usando procesos manuales, semiautomáticos o automáticos. En algunos casos, el aire es expulsado de la cámara antes de, simultáneamente, intermitentemente o posteriormente con la extracción de la composición de salida que contiene células incubadas y partículas del vector viral, como células en las que se ha iniciado la transducción o células se han transducido con un vector viral, de la cavidad de la cámara.

En algunos casos, la transducción y/u otra incubación se realiza como o como parte de un proceso continuo o semicontinuo. En algunos casos, un proceso continuo implica la entrada continua de las células y las partículas del vector viral, por ejemplo, la composición de entrada (ya sea como una composición preexistente única o introduciendo continuamente en el mismo recipiente, por ejemplo, cavidad, y por lo tanto mezclando, sus partes), y/o la extracción o expulsión continua de líquido, y opcionalmente expulsando gas (por ejemplo, aire) del recipiente, durante por lo menos una parte de la incubación, por ejemplo, mientras se centrifuga. En algunos casos, la entrada continua y la extracción continua se llevan a cabo por lo menos en parte simultáneamente. En algunos casos, la entrada continua se produce durante parte de la incubación, por ejemplo, durante parte de la centrifugación, y la extracción continua se produce durante una parte separada de la incubación. Las dos pueden alternarse. Por tanto, la entrada y la extracción continuas, mientras se lleva a cabo la incubación, pueden permitir que se procese un volumen total mayor de muestra, por ejemplo, transducida.

En algunos casos, la incubación es parte de un proceso continuo, el método incluye, durante por lo menos una parte de la incubación, efectuar la entrada continua de dicha composición de entrada en la cavidad durante la rotación de la cámara y durante una parte de la incubación, efectuando la extracción continua de líquido y, opcionalmente, expulsando gas (por ejemplo, aire), de la cavidad a través de por lo menos una abertura durante la rotación de la cámara.

En algunos casos, la incubación semicontinua se lleva a cabo alternando entre la entrada efectiva de la composición en la cavidad, la incubación, la extracción de líquido de la cavidad y, opcionalmente, la expulsión de gas (por ejemplo, aire) de la cavidad, como a un recipiente de salida, y luego la entrada de una composición posterior (por ejemplo, segunda, tercera, etc.) que contiene más células y otros reactivos para procesar, por ejemplo, partículas de vectores virales, y repetir el proceso. Por ejemplo, en algunos casos, la incubación es parte de un proceso semicontinuo, el método incluyendo, antes de la incubación, efectuar la entrada de la composición de entrada en la cavidad a través de dicha por lo menos una abertura, y posteriormente a la incubación, efectuar extracción de fluido desde la cavidad; efectuar la entrada de otra composición de entrada que comprende células y las partículas del vector viral en dicha cavidad interna; e incubar la otra composición de entrada en dicha cavidad interna en condiciones en las que dichas células en dicha otra composición de entrada se transducen con dicho vector. El proceso puede continuar de manera iterativa durante varias rondas adicionales. A este respecto, los métodos semicontinuos o continuos pueden permitir la producción de un volumen y/o número de células incluso mayor.

En algunos casos, una parte de la incubación de transducción se realiza en la cámara de centrífuga, que se realiza en condiciones que incluyen rotación o centrifugación.

En algunos casos, el método incluye una incubación en la que una parte adicional de la incubación de las células y las partículas del vector viral se lleva a cabo sin rotación o centrifugación, que generalmente se lleva a cabo después de por lo menos la parte de la incubación que incluye rotación o centrifugación de la cámara. En

algunos de tales casos, la incubación adicional se efectúa bajo condiciones que dan como resultado la integración del vector viral en un genoma huésped de una o más de las células. Está dentro del nivel de un experto en la técnica evaluar o determinar si la incubación ha dado como resultado la integración de partículas de vectores virales en un genoma huésped, y por lo tanto determinar empíricamente las condiciones para una incubación adicional. En algunos casos, la integración de un vector viral en un genoma huésped puede evaluarse midiendo el nivel de expresión de una proteína recombinante, como una proteína heteróloga, codificada por un ácido nucleico contenido en el genoma de la partícula del vector viral después de la incubación. Pueden usarse una serie de métodos bien conocidos para evaluar el nivel de expresión de moléculas recombinantes, como la detección por métodos basados en la afinidad, por ejemplo, métodos basados en inmunoafinidad, por ejemplo, en el contexto de proteínas de la superficie celular, como por citometría de flujo. En algunos ejemplos, la expresión se mide mediante la detección de un marcador de transducción y/o constructo informador. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica una proteína de superficie truncada se incluye dentro del vector y se usa como un marcador de expresión y/o mejora del mismo.

En algunos casos, la incubación adicional se lleva a cabo en la cámara de centrifuga, pero sin rotación. En algunos casos, la incubación adicional se lleva a cabo fuera de la cámara de centrifuga. En algunos casos, la incubación adicional se efectúa a temperaturas mayores que la temperatura ambiente, como de más de o de más de aproximadamente 25° C, como generalmente de más de o de más de aproximadamente 32° C, 35° C o 37° C. En algunos casos, la incubación adicional se efectúa a una temperatura de o de aproximadamente 37° C ±2° C, como a una temperatura de aproximadamente 37° C. En algunos casos, la incubación adicional es durante un tiempo comprendido entre 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30 horas o 12 horas y 24 horas, inclusive.

En algunos casos, la incubación adicional se produce en un sistema cerrado. En algunos casos, después de la extracción de la composición de salida desde la cámara, como en un recipiente (por ejemplo, una bolsa), el recipiente que contiene la composición de salida se incuba durante una parte adicional de tiempo. En algunos casos, el recipiente, como la bolsa, se incuba a una temperatura de aproximadamente 37° C ±2° C durante un tiempo comprendido entre 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30 horas o 12 horas y 24 horas, inclusive.

En algunos casos, los métodos efectúan la transducción de un cierto número o porcentaje de las células en la composición de entrada y/o salida (transducida), o un subconjunto de las mismas. Por ejemplo, en algunos casos, por lo menos el 2,5%, por lo menos el 5%, por lo menos el 6%, por lo menos el 8%, por lo menos el 10%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, o por lo menos el 75% de las células totales (o de un tipo de célula objetivo particular, como las células T) en la composición de entrada y/o en la composición de salida (por ejemplo, transducida), se transducen con dicho vector viral y/o expresan el producto génico recombinante codificado de ese modo. En algunos casos, los métodos de transducción dan como resultado una composición de salida en la que por lo menos el 2,5%, por lo menos el 5%, por lo menos el 6%, por lo menos el 8%, por lo menos el 10%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, o por lo menos el 75% de las células totales, como células T, en la composición se transducen con el vector viral y/o expresan el producto génico recombinante codificado de ese modo.

En algunos casos, los métodos son capaces de lograr por lo menos una eficiencia de transducción particular en ciertas condiciones. Por ejemplo, en algunos casos, donde la composición de entrada incluye el virus y las células en una proporción de o de aproximadamente 1 unidad infecciosa (UI) por una de las células a 10 UI por una de las células, como de o aproximadamente 1 unidad infecciosa (UI) por una de las células, o de o aproximadamente 2 UI por una de las células, de o aproximadamente 5 UI por una de las células, o de o aproximadamente 10 UI por una de las células, el método es capaz de producir una composición transducida en la que por lo menos el 10%, por lo menos el 25%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50% o por lo menos el 75% de las células en dicha composición transducida generada por el método comprenden, por ejemplo, han sido transducidas con, el vector viral recombinante. La transducción de las células puede detectarse detectando la presencia de ácido nucleico recombinante, por ejemplo, transgén, incluido en el vector o producto del mismo en la célula. En algunos casos, el producto se detecta en la superficie de la célula, lo que indica que la célula se ha transducido con éxito. En algunos casos, la detección de la transducción implica la detección de un marcador de la transducción, como otro transgén o producto incluido con el propósito de marcar células transducidas, y/u otro marcador de selección.

En algunos casos, la composición de salida resultante de los métodos de transducción incluye un número promedio o medio particular de copias del vector transducido por célula (número de copias del vector (VCN)). El VCN puede expresarse en términos del número de copias en una sola célula. Alternativamente, puede expresarse como un número medio sobre una población o composición celular total, como la composición de salida o transducida (incluyendo cualquier célula no transducida dentro de la composición, que no incluiría ninguna copia del vector). Alternativamente, el VCN puede expresarse en términos de número de copias medio solo entre las células transducidas. En algunos casos, entre todas las células en la composición transducida o de salida producida por los métodos, el VCN medio no es de más de 10, 5, 4, 2,5, 1,5, o 1. En algunos casos, entre las células en la composición transducida o de salida que contiene el vector viral recombinante o expresa el producto génico

recombinante, el VCN medio no es de más de o de aproximadamente 4, 3, 2, 2,5, 1,5, o 1.

También se proporcionan composiciones producidas por cualquiera de los métodos anteriores. En algunos casos, las composiciones contienen por lo menos  $1 \times 10^7$  células o  $5 \times 10^7$  células, como por lo menos  $1 \times 10^8$  células,  $2 \times 10^8$  células,  $4 \times 10^8$  células,  $6 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$  células o  $1 \times 10^9$  células, en las que por lo menos una pluralidad de células se transducen con el vector viral recombinante. En algunos casos, las células son células T.

En algunos casos, mediante la puesta en práctica de los métodos proporcionados en la presente, es posible producir una composición de salida que contiene una pluralidad de células transducidas en gran número, como, en algunos aspectos, un número que puede lograr una dosificación terapéuticamente efectiva de Células T para su uso en inmunoterapia adoptiva. En algunos casos, esto puede lograrse no solo por la capacidad de transducir células a gran escala, sino también, en algunos aspectos, repitiendo el proceso de manera continua o semicontinua.

Por el contrario, los métodos existentes en la técnica en los que la transducción se realiza a una escala más pequeña, como en placas, requiere la expansión a gran escala de las células después de la transducción para lograr el número de células necesarias para obtener una dosificación terapéuticamente eficaz. La expansión de las células, como las células T, con uno o más agentes de estimulación puede activar las células y/o alterar el fenotipo de las células, como resulta en la generación de células efectoras con un fenotipo de células T agotado. Por ejemplo, la activación o estimulación de las células T puede dar como resultado un cambio en el estado de diferenciación o de activación de las células T que puede dar como resultado y/o llevar a la persistencia reducida in vivo cuando se administran células modificadas genéticamente a un sujeto. Entre los cambios en el estado de diferenciación que pueden producirse se incluyen, en algunos casos, la pérdida de un fenotipo sin tratar, la pérdida de fenotipos de células T de memoria y/o la generación de células efectoras con un fenotipo de células T agotado. El agotamiento de las células T puede llevar a una pérdida progresiva de las funciones de las células T y/o al agotamiento de las células (Yi et al. (2010) Immunology, 129: 474-481). El agotamiento de las células T y/o la falta de persistencia de las células T es una barrera para la eficacia y los resultados terapéuticos de la terapia con células adoptivas; los ensayos clínicos han revelado una correlación entre un grado mayor y/o más largo de exposición a las células que expresan el receptor de antígeno (por ejemplo, CAR) y los resultados del tratamiento.

En algunos casos, en los métodos proporcionados en la presente no es necesario estimular y/o activar células posteriores a la transducción en la misma medida que es necesario en otros métodos conocidos en la técnica. En algunos casos, después de la transducción, las células en la composición no están sujetas a expansión en presencia de un agente de estimulación (por ejemplo, una citoquina, como IL-2) y/o no se incuban a una temperatura de más de o aproximadamente  $30^\circ\text{C}$  o de más de o aproximadamente  $37^\circ\text{C}$  durante más de 24 horas. En algunos casos, por lo menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de las células T en la composición o las células T transducidas en la composición de salida comprenden una expresión superficial alta de CD69 o TGF-beta-II. En algunos casos, por lo menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de las células T o células T transducidas en la composición no comprenden expresión superficial de CD62L y/o comprenden expresión alta de CD25, ICAM, GM-CSF, IL-8 y/o IL-2.

En algunos casos, las células modificadas, como las células transducidas con los vectores virales que codifican productos recombinantes para expresarse en las células, de la composición de salida producida por el método anterior, o por un método que incluye un paso de procesamiento adicional, como para generar una composición formulada, muestra una mayor persistencia cuando se administra in vivo a un sujeto. En algunos casos, la persistencia de las células proporcionadas, como el receptor, por ejemplo, células que expresan CAR, en el sujeto tras la administración, es mayor en comparación con la que se lograría mediante métodos de transducción alternativos, como los que implican la administración de células modificadas genéticamente por métodos que implican la transducción a menor escala en los que las células T se activan y/o estimulan para expandirse antes y/o después de la transducción para lograr una cantidad de células que es una dosis terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, en algunos aspectos, la persistencia de las células proporcionadas, como las células producidas por los métodos proporcionados, es mayor en comparación de la que se lograría mediante la administración de una población de receptor recombinante genéticamente modificado que expresa (por ejemplo, CAR) en los que por lo menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% tienen un nivel más bajo de extracción de CD69 o TGF-beta II. En algunos casos, la persistencia de las células proporcionadas, como las células producidas por los métodos proporcionados, es mayor en comparación con la que se lograría mediante la administración de una población de receptor recombinante modificado genéticamente que expresa (por ejemplo CAR) en la que por lo menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% muestran expresión de superficie de CD62L y/o comprenden expresión superficial baja de CD25, ICAM, GM-CSF, IL-8 y/o IL-2.

En algunos casos, la persistencia se incrementa por lo menos o aproximadamente por lo menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o más.

En algunos casos, el grado o extensión de persistencia de las células administradas puede detectarse o cuantificarse después de la administración a un sujeto. Por ejemplo, en algunos aspectos, se usa PCR cuantitativa



(qPCR) para evaluar la cantidad de células que expresan el receptor recombinante (por ejemplo, células que expresan CAR) en la sangre u suero u órgano o tejido (por ejemplo, sitio de la enfermedad) del sujeto. En algunos aspectos, la persistencia se cuantifica como copias de ADN o plásmido que codifica el receptor, por ejemplo, CAR, por microgramo de ADN, o como el número de células que expresan el receptor, por ejemplo que expresan CAR, por microlitro de la muestra, por ejemplo, de sangre o suero, o por el número total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o glóbulos blancos o células T por microlitro de la muestra. En algunos casos, también pueden realizarse ensayos de citometría de flujo que detectan células que expresan el receptor generalmente usando anticuerpos específicos para los receptores. También pueden usarse ensayos basados en células para detectar el número o porcentaje de células funcionales, como células capaces de unirse y/o neutralizar y/o inducir respuestas, por ejemplo, respuestas citotóxicas, contra células de la enfermedad o afección o expresar el antígeno reconocido por el receptor. En cualquiera de tales casos, el grado o nivel de expresión de otro marcador asociado con el receptor recombinante (por ejemplo, células que expresan CAR) puede usarse para distinguir las células administradas de las células endógenas en un sujeto.

En algunos casos, al minimizar la activación y/o estimulación de las células T, los casos proporcionados pueden dar como resultado células T modificadas genéticamente que son más potentes para su uso en métodos de inmunoterapia adoptiva, debido, en algunos aspectos, a una persistencia aumentada. En algunos casos, la potencia aumentada y/o la persistencia aumentada de las células proporcionadas, como las células producidas por cualquiera de los métodos proporcionados, permite métodos de administración de células a dosificaciones más bajas. Tales métodos pueden minimizar la toxicidad que puede producirse por los métodos de inmunoterapia adoptiva.

#### Otros eventos de procesamiento celular

En algunos casos, además de y/o alternativamente a los pasos de transducción, los métodos de procesamiento de los métodos proporcionados incluyen otros pasos y métodos de procesamiento, como el aislamiento, separación, selección, cultivo (por ejemplo, estimulación de células, por ejemplo, para inducir su proliferación y/o la activación), lavado, suspensión, dilución, concentración y/o formulación de las células. En algunos casos, por lo menos una parte de uno o más de otros pasos de procesamiento y/o por lo menos una parte de una pluralidad de los pasos se llevan a cabo en su totalidad o en parte dentro de la cavidad de una cámara de centrífuga, como la misma o diferente cámara de centrífuga como se usa en los métodos de transducción. En algunos casos, todos o una parte de uno o más de otros pasos de procesamiento se llevan a cabo en un sistema cerrado que contiene una cámara centrífuga, como en un sistema cerrado estéril.

En algunos casos, los métodos incluyen uno o más de (a) lavar una muestra biológica que contiene células (por ejemplo, una muestra de sangre completa, una muestra de capa leucocitaria, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una muestra de células T no fraccionadas, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis o un producto de leucaféresis) en una cavidad de una cámara, (b) aislar, por ejemplo, seleccionar de la muestra un subconjunto o población de células deseada (por ejemplo, células T CD4+ o CD8+) en una cavidad de una cámara, por ejemplo, por incubación de las células con una selección o reactivo de inmunofluorescencia para la separación basada en inmunofluorescencia; c) incubar las células aisladas, como las células seleccionadas, con partículas de vectores virales, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente y d) formular las células transducidas, como en un tampón farmacéuticamente aceptable, crioprotector u otro medio adecuado. En algunos casos, los métodos pueden incluir además (e) estimular células en una cavidad de una cámara exponiendo las células a condiciones de estimulación, induciendo de este modo a que proliferen las células. En algunos casos, el paso de estimular las células se realiza antes, durante y/o después de la incubación de células con las partículas de vectores virales. En algunos casos, también pueden llevarse a cabo uno o más pasos adicionales de lavado o pasos de suspensión, como para dilución, concentración y/o intercambio de tampón de células, antes o después de cualquiera de los pasos anteriores.

Por tanto, en algunos casos, los métodos llevan a cabo uno, más, o todos los pasos en la preparación de células para uso clínico, por ejemplo, en terapia celular adoptiva, sin exponer las células a condiciones no estériles y sin la necesidad de usar una sala o armario estéril. En algunos casos de dicho proceso, las células se aíslan, separan o seleccionan, estimulan, transducen, lavan y formulan, todo dentro de un sistema cerrado. En algunos casos, los métodos se llevan a cabo de manera automatizada. En algunos casos, uno o más de los pasos se llevan a cabo aparte del sistema de cámara de centrífuga.

#### Muestras

En algunos casos, los pasos de procesamiento incluyen el aislamiento de células o composiciones de las mismas a partir de muestras biológicas, como las obtenidas o derivadas de un sujeto, como uno que tiene una enfermedad o afección particular o con necesidad de una terapia celular o al que se le administrará terapia celular. En algunos aspectos, el sujeto es un humano, como un sujeto que es un paciente con necesidad de una intervención terapéutica particular, como la terapia celular adoptiva para la cual se están aislando, procesando y/o manipulando las células. Por consiguiente, las células en algunos casos son células primarias, por ejemplo, células humanas primarias. Las muestras incluyen muestras de tejido, fluido y otras muestras tomadas directamente del sujeto, así

5 como muestras resultantes de uno o más pasos de procesamiento, como separación, centrifugación, ingeniería genética (por ejemplo transducción con vector viral), lavado y/o incubación. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra que se procesa. Las muestras biológicas incluyen, pero no están limitadas a, fluidos corporales, como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos, incluyendo las muestras procesadas derivadas de los mismos.

10 En algunos aspectos, la muestra es sangre o una muestra derivada de sangre, o es o se deriva de un producto de aféresis o leucaféresis. Las muestras ejemplares incluyen sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, ganglio linfático, tejido linfóide asociado al intestino, tejido linfóide asociado a la mucosa, bazo, otros tejidos linfoides, hígado, pulmón, estómago, intestino, colon, riñón, páncreas, mama, hueso, próstata, cuello uterino, testículos, ovarios, amígdalas u otro órgano, y/o células derivadas de los mismos. Las muestras incluyen, en el contexto de la terapia celular, por ejemplo, terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alogénicas.

15 En algunos casos, el aislamiento de las células o poblaciones incluye uno o más pasos de preparación y/o separación de células basados en la no afinidad. En algunos ejemplos, las células se lavan, centrifugan y/o incuban en presencia de uno o más reactivos, por ejemplo, para eliminar componentes no deseados, enriquecer los componentes deseados, lisar o eliminar células sensibles a reactivos particulares. En algunos ejemplos, las células se separan en base a una o más propiedades, como la densidad, las propiedades adherentes, el tamaño, la sensibilidad y/o la resistencia a componentes particulares. En algunos ejemplos, las células de la sangre circulante de un sujeto se obtienen, por ejemplo, mediante aféresis o leucaféresis. Las muestras pueden contener linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y/o plaquetas.

25 En algunos casos, los métodos proporcionados incluyen el procesamiento, total o parcial, de una o más de las muestras en un sistema cerrado, como en una cámara de centrifuga. En algunos casos, el paso de procesamiento puede implicar el lavado de la muestra, por ejemplo, muestra que contiene células sanguíneas, del sujeto, por ejemplo, para eliminar la fracción de plasma y/o reemplazar las células en un tampón o medio apropiado para pasos de procesamiento posteriores y/o realizar métodos de separación celular basados en la densidad, como la preparación de glóbulos blancos a partir de sangre periférica mediante la lisis de los glóbulos rojos y la centrifugación a través de un gradiente de Percoll o Ficoll. Pueden realizarse ejemplos de tales pasos de procesamiento usando una cámara de centrifuga junto con uno o más sistemas asociados con un sistema de procesamiento celular, como una cámara centrifuga producida y vendida por Biosafe SA, incluyendo aquellas para su uso con los sistemas de procesamiento celular Sepax® o Sepax 2®.

35 *Selección basada en afinidad*

40 Los pasos de procesamiento (por ejemplo, llevados a cabo en la cámara de centrifuga) pueden incluir el aislamiento de células de poblaciones y/o composiciones mixtas, como usando uno de varios pasos de selección que incluyen métodos de separación basados en la densidad o basados en otras propiedades físicas y selección basada en afinidad. En algunos casos, los métodos incluyen la selección en la que toda o una parte de la selección se lleva a cabo en la cavidad interna de la cámara de centrifuga, por ejemplo, bajo rotación centrifuga. En algunos casos, la incubación de células con reactivos de selección, como reactivos de selección basados en inmunofluorescencia, se realiza en una cámara de centrifuga. Tales métodos pueden ofrecer ciertas ventajas en comparación con otros métodos de selección disponibles.

50 Por ejemplo, la selección basada en inmunofluorescencia puede depender de una interacción energética favorable entre las células que se están separando y la molécula que se une específicamente al marcador en la célula, por ejemplo, el anticuerpo u otro compañero de unión en la superficie sólida, por ejemplo, partícula. En ciertos métodos disponibles para la separación basada en la afinidad usando partículas como perlas, las partículas y las células se incuban en un recipiente, como un tubo o una bolsa, mientras se agitan o mezclan, con una proporción de densidad celular a partícula (por ejemplo, perla) constante para ayudar a promover interacciones energéticamente favorecidas. Dichos enfoques pueden no ser ideales para su uso en la producción a gran escala, por ejemplo, en el sentido de que pueden requerir el uso de grandes volúmenes para mantener una proporción óptima o deseada de células a partículas mientras se mantiene el número deseado de células. Por consiguiente, tales enfoques pueden requerir el procesamiento en un modo o formato por lotes, que puede requerir más tiempo, número de pasos y manejo, aumentando el coste y el riesgo de error por el usuario.

60 En algunos casos, realizando tales pasos de selección o partes de los mismos (por ejemplo, incubación con partículas recubiertas con anticuerpos, por ejemplo, perlas magnéticas) en la cavidad de la cámara de centrifuga, el usuario puede controlar ciertos parámetros, como el volumen de varias soluciones, la adición de solución durante el procesamiento y la cadencia de la misma, lo que puede proporcionar ventajas en comparación con otros métodos disponibles. Por ejemplo, la capacidad de disminuir el volumen de líquido en la cavidad durante la incubación puede aumentar la concentración de las partículas (por ejemplo, reactivo de perlas) usadas en la selección y, por tanto, el potencial químico de la solución, sin afectar al número total de células en la cavidad. Esto a su vez puede mejorar

las interacciones en parejas entre las células que se procesan y las partículas usadas para la selección. En algunos casos, llevar a cabo el paso de incubación en la cámara, por ejemplo, cuando se asocia con los sistemas, circuitos, y control como se describe en la presente, permite al usuario efectuar la agitación de la solución en los momentos deseados durante la incubación, lo que también puede mejorar la interacción.

5 En algunos casos, por lo menos una parte del paso de selección se realiza en una cámara de centrífuga, que incluye la incubación de células con un reactivo de selección. En algunos aspectos de tales procesos, un volumen de células se mezcla con una cantidad de un reactivo de selección basado en afinidad deseado que es mucho menor que el empleado normalmente cuando se realizan selecciones similares en un tubo o recipiente para la selección del mismo número de células y/o volumen de células de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos casos, se emplea una cantidad de reactivo o reactivos de selección que es/no es más del 5%, no más del 10%, no más del 15%, no más del 20%, no más del 25%, no más del 50%, no más del 60%, no más del 70% o no más del 80% de la cantidad de los mismos reactivos de selección empleados para la selección de las células en una incubación basada en tubos o recipientes para el mismo número de células y/o el mismo volumen de células de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 La incubación con un reactivo o reactivos de selección, por ejemplo, como parte de los métodos de selección que pueden realizarse en la cavidad de la cámara, incluye el uso de uno o más reactivos de selección para la selección de uno o más tipos de células diferentes en base a la expresión o presencia dentro o sobre la célula de una o más moléculas específicas, como marcadores de superficie, por ejemplo, proteínas de superficie, marcadores intracelulares o ácido nucleico. En algunos casos, puede usarse cualquier método conocido que use un reactivo o reactivos de selección para la separación en base a tales marcadores. En algunos casos, el reactivo o reactivos de selección dan como resultado una separación que es una separación basada en afinidad o inmunofinidad. Por ejemplo, la selección en algunos aspectos incluye la incubación con un reactivo o reactivos para la separación de células y poblaciones celulares en base a la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, típicamente marcadores de superficie celular, por ejemplo, por incubación con un anticuerpo o compañero de unión que se une específicamente a tales marcadores, seguido generalmente por pasos de lavado y la separación de las células que se han unido al anticuerpo o el compañero de unión de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o compañero de unión.

30 En algunos casos, para la selección, por ejemplo, selección de células basada en inmunofinidad, las células se incuban en la cavidad de la cámara en una composición que también contiene el tampón de selección con un reactivo de selección, como una molécula que se une específicamente a un marcador de superficie en una célula que se desea enriquecer y/o agotar, pero no en otras células de la composición, como un anticuerpo, que opcionalmente está acoplado a un andamiaje como un polímero o superficie, por ejemplo, perla, por ejemplo, perla magnética, como perlas magnéticas acopladas a anticuerpos monoclonales específicos para CD4 y CD8. En algunos casos, como se describe, el reactivo de selección se añade a las células en la cavidad de la cámara en una cantidad que es sustancialmente menor que (por ejemplo, no es de más del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50 %, 60%, 70% u 80% de la cantidad) en comparación con la cantidad del reactivo de selección que se usa típicamente o que sería necesario para lograr una eficiencia de selección igual o similar de la misma cantidad de células o el mismo volumen de células cuando la selección se realiza en un tubo con agitación o rotación. En algunos casos, la incubación se realiza con la adición de un tampón de selección a las células y el reactivo de selección para lograr un volumen objetivo con la incubación del reactivo de, por ejemplo, 10 ml a 200 ml, como por lo menos o aproximadamente por lo menos o aproximadamente 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml, 100 ml, 150 ml o 200 ml. En algunos casos, el tampón de selección y el reactivo de selección se mezclan previamente antes de la adición a las células. En algunos casos, el tampón de selección y el reactivo de selección se añaden por separado a las células. En algunos casos, la incubación de selección se lleva a cabo con condiciones de mezcla periódicas suaves, que pueden ayudar a promover interacciones energéticamente favorecidas y, por lo tanto, permiten el uso de menos reactivo de selección general a la vez que se logra una alta eficiencia de selección.

50 En algunos casos, la duración total de la incubación con el reactivo de selección es de aproximadamente 5 minutos a 6 horas, como de 30 minutos a 3 horas, por ejemplo, por lo menos o aproximadamente por lo menos 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos o 180 minutos.

55 En algunos casos, la incubación generalmente se lleva a cabo en condiciones de mezcla, como en presencia de giro, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente baja, como una velocidad menor que la usada para sedimentar las células, como desde o desde aproximadamente 600 rpm a 1700 rpm (por ejemplo a o aproximadamente 600 rpm, 1000 rpm o 1500 rpm o 1700 rpm), como en un RCF en la muestra o pared de la cámara u otro recipiente de desde o desde aproximadamente 80 g a 100 g (por ejemplo a o aproximadamente o por lo menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g, o 100 g). En algunos casos, el giro se lleva a cabo usando intervalos repetidos de un giro a una velocidad tan baja seguida de un período de descanso, como un giro y/o descanso durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 segundos, como un giro a aproximadamente 1 o 2 segundos seguido de un descanso durante aproximadamente 5, 6, 7 u 8 segundos.

65 En algunos casos, dicho proceso se lleva a cabo dentro del sistema completamente cerrado en el que la

5 cámara es integral. En algunos casos, este proceso (y en algunos aspectos también uno o más pasos adicionales, como un paso de lavado previo que lava una muestra que contiene las células, como una muestra de aféresis) se lleva a cabo de manera automatizada, de tal manera que las células, el reactivo y otros componentes se introducen y se expulsan de la cámara en los momentos apropiados y se efectúa la centrifugación, para completar el paso de lavado y unión en un único sistema cerrado usando un programa automatizado.

10 En algunos casos, después de la incubación y/o mezcla de las células y el reactivo y/o reactivos de selección, las células incubadas se someten a una separación para seleccionar las células en base a la presencia o ausencia del reactivo o reactivos particulares. En algunos casos, la selección adicional se realiza fuera de la cámara de centrífuga. En algunos casos, la separación se realiza en el mismo sistema cerrado en el que está presente la cámara de centrífuga y en el que se realizó la incubación de células con el reactivo de selección. En algunos casos, después de la incubación con los reactivos de selección, las células incubadas, incluyendo las células en las que se ha unido el reactivo de selección, se extraen desde la cámara de centrífuga, como transfiriéndose fuera de la cámara de centrífuga, a un sistema para la separación de células basada en inmunofluorescencia. En algunos casos, el sistema para la separación basada en inmunofluorescencia es o contiene una columna de separación magnética. En algunos casos, antes de la separación, pueden realizarse uno o más pasos de procesamiento en la cámara, como el lavado.

20 Tales pasos de separación pueden basarse en una selección positiva, en la que las células que se han unido a los reactivos, por ejemplo, anticuerpo o compañero de unión, se retienen para un uso posterior, y/o selección negativa, en la que las células no se han unido al reactivo, por ejemplo, anticuerpo o compañero de unión, se retienen. En algunos ejemplos, ambas fracciones se retienen para su uso posterior. En algunos aspectos, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no hay anticuerpos disponibles que identifiquen específicamente un tipo de célula en una población heterogénea, de tal manera que la separación se realiza mejor en base a los marcadores expresados por células distintas de la población deseada.

25 La separación no necesita dar como resultado un enriquecimiento o eliminación del 100% de una población de células particular o células que expresan un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o el enriquecimiento de células de un tipo particular, como las que expresan un marcador, se refiere al aumento del número o porcentaje de dichas células, pero no es necesario que dé como resultado una ausencia completa de células que no expresan el marcador. De igual manera, la selección negativa, la eliminación o el agotamiento de las células de un tipo particular, como las que expresan un marcador, se refiere a la disminución del número o porcentaje de dichas células, pero no necesariamente da como resultado la eliminación completa de todas esas células.

30 En algunos ejemplos, se llevan a cabo múltiples rondas de pasos de separación, donde la fracción seleccionada positiva o negativamente de un paso se somete a otro paso de separación, como una selección positiva o negativa posterior. En algunos ejemplos, un solo paso de separación puede agotar las células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, como incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión, cada uno específico para un marcador dirigido a la selección negativa. De igual manera, pueden seleccionarse positivamente simultáneamente múltiples tipos de células incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión expresados en los varios tipos de células. En cualquiera de dichos ejemplos, por lo menos una parte de la selección o los pasos de selección adicionales se realiza en una cámara de centrífuga, que incluye la incubación de células con un reactivo de selección, como se ha descrito anteriormente.

40 Por ejemplo, en algunos aspectos, subpoblaciones específicas de células T, como células positivas o que expresan altos niveles de uno o más marcadores de superficie, por ejemplo, células T CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, y/o CD45RO+, se aíslan mediante técnicas de selección positivas o negativas. En algunos casos, tales células se seleccionan por incubación con uno o más anticuerpos o compañero de unión que se une específicamente a tales marcadores. En algunos casos, el anticuerpo o compañero de unión puede conjugarse, como directa o indirectamente, a un soporte o matriz sólido para efectuar la selección, como una perla magnética o una perla paramagnética. Por ejemplo, las células T CD3+, CD28+ pueden seleccionarse positivamente usando perlas magnéticas conjugadas CD3/CD28 (por ejemplo, expansor de células T CD3/CD28 DYNABEADS® M-450 y/o perlas ExpACT®).

50 En algunos casos, los pasos del proceso incluyen además una selección negativa y/o positiva de las células incubadas, como el uso de un sistema o aparato que puede realizar una selección basada en afinidad. En algunos casos, el aislamiento se lleva a cabo mediante enriquecimiento para una población celular particular mediante selección positiva, o agotamiento de una población celular particular, mediante selección negativa. En algunos casos, la selección positiva o negativa se logra incubando células con uno o más anticuerpos u otro agente de unión que se une específicamente a uno o más marcadores de superficie expresados o expresados (marcador+) a un nivel relativamente más alto (marcador alto) en las células seleccionadas positiva o negativamente, respectivamente.

60 En algunos casos, las células T se separan de una muestra de PBMC mediante selección negativa de marcadores expresados en células no T, como células B, monocitos u otros glóbulos blancos, como CD14. En algunos aspectos, se usa un paso de selección de CD4+ o CD8+ para separar las células T CD4+ auxiliares y CD8+

citotóxicas. Tales poblaciones de CD4+ y CD8+ pueden clasificarse adicionalmente en subpoblaciones mediante selección positiva o negativa para marcadores expresados o expresados a un grado relativamente más alto en una o más subpoblaciones de células T no tratadas, de memoria y/o efectoras.

5 En algunos casos, las células CD8+ se enriquecen o agotan adicionalmente de células madre sin tratar, de memoria central, de memoria efectora y/o de memoria central, como mediante selección positiva o negativa en base a los antígenos de superficie asociados con la subpoblación respectiva. En algunos casos, el enriquecimiento para células T de memoria central (TCM) se lleva a cabo para aumentar la eficacia, como para mejorar la supervivencia a largo plazo, la expansión y/o el injerto después de la administración, que en algunos aspectos es particularmente robusto en tales subpoblaciones. Ver Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. En algunos casos, combinar células T CD8+ enriquecidas con TCM y células T CD4+ aumenta aún más la eficacia.

15 En los casos, las células T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L+ y CD62L- de linfocitos de sangre periférica CD8+. Las PBMC pueden enriquecerse o agotarse de las fracciones CD62L-CD8+ y/o CD62L+CD8+, como usando anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L.

20 En algunos casos, el enriquecimiento para las células T de memoria central (TCM) se basa en la expresión superficial positiva o alta de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y/o CD 127; en algunos aspectos, se basa en la selección negativa para células que expresan o expresan altamente CD45RA y/o granzima B. En algunos aspectos, el aislamiento de una población de CD8+ enriquecida para células TCM se lleva a cabo mediante el agotamiento de las células que expresan CD4, CD14, CD45RA y la selección positiva o enriquecimiento para las células que expresan CD62L. En un aspecto, el enriquecimiento de las células T de memoria central (TCM) se lleva a cabo comenzando con una fracción negativa de células seleccionadas en base a la expresión de CD4, que se somete a una selección negativa en base a la expresión de CD14 y CD45RA, y una selección positiva basada en CD62L. Dichas selecciones en algunos aspectos se llevan a cabo simultáneamente y en otros aspectos se llevan a cabo secuencialmente, en cualquier orden. En algunos aspectos, el mismo paso de selección basado en la expresión de CD4 usado en la preparación de la población o subpoblación de células CD8+, también se usa para generar la población o subpoblación de células CD4+, de tal manera que tanto las fracciones positivas como las negativas de la separación basada en CD4 se retienen y usan en pasos posteriores de los métodos, opcionalmente después de uno o más pasos de selección positiva o negativa adicionales.

35 En un ejemplo particular, una muestra de PBMC u otra muestra de glóbulos blancos se somete a selección de células CD4+, donde se retienen tanto las fracciones positivas como las negativas. La fracción negativa se somete luego a una selección negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA o CD19, y una selección positiva basada en un marcador característico de las células T de memoria central, como CD62L o CCR7, donde se llevan a cabo las selecciones positivas y negativas en cualquier orden.

40 Las células auxiliares T CD4+ pueden clasificarse en células sin tratar, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos de CD4+ pueden obtenerse mediante métodos estándar. En algunos casos, los linfocitos T CD4+ sin tratar son células T CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ o CD4+. En algunos casos, las células CD4+ de memoria central son CD62L+ y CD45RO+. En algunos casos, las células efectoras CD4+ son CD62L- y CD45RO-.

45 En un ejemplo, para enriquecer las células CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, y CD8. En algunos casos, el anticuerpo o compañero de unión está unido a un soporte o matriz sólida, como una perla magnética o una perla paramagnética, para permitir la separación de las células para la selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, en algunos casos, las células y las poblaciones celulares se separan o aíslan usando técnicas de separación inmunomagnéticas (afinidadmagnéticas) (revisado en Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Editado por: S. A. Brooks and U. Schumacher© Humana Press Inc., Totowa, NJ).

55 En algunos aspectos, la muestra incubada o la composición de las células a separar se incuban con un reactivo de selección que contiene material pequeño, magnetizable o con respuesta magnética, como partículas o micropartículas con respuesta magnética, como perlas paramagnéticas (por ejemplo, Dynalbeads o perlas MACS®). El material que responde magnéticamente, por ejemplo, partículas, generalmente está unido directa o indirectamente con un compañero de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que se une específicamente a una molécula, por ejemplo, marcador de superficie, presente en la célula, células o población de células que se desea separar, por ejemplo, que se desea seleccionar negativa o positivamente.

65 En algunos casos, la partícula o perla magnética comprende un material magnéticamente sensible unido a un miembro de unión específico, como un anticuerpo u otro compañero de unión. Se conocen muchos materiales magnéticamente sensibles conocidos para su uso en métodos de separación magnética, por ejemplo, los descritos en Molday, Patente de Estados Unidos N° 4.452.773, y en la Especificación de Patente Europea EP 452342 B.

También pueden usarse partículas coloidales, como las descritas en Owen, Patente de Estados Unidos N° 4.795.698, y Liberti et al., Patente de Estados Unidos N° 5.200.084.

5 La incubación generalmente se lleva a cabo en condiciones por las cuales los anticuerpos o compañeros de unión, o moléculas, como anticuerpos secundarios u otros reactivos, que se unen específicamente a dichos anticuerpos o compañeros de unión, que están unidos a la partícula o perla magnética, se unen específicamente a las moléculas de la superficie celular si están presentes en las células dentro de la muestra.

10 En ciertos casos, las partículas magnéticamente sensibles están recubiertas con anticuerpos primarios u otros compañeros de unión, anticuerpos secundarios, lectinas, enzimas o estreptavidina. En ciertos casos, las partículas magnéticas se unen a las células a través de un recubrimiento de anticuerpos primarios específicos para uno o más marcadores. En ciertos casos, las células, en lugar de las perlas, se marcan con un anticuerpo primario o un compañero de unión, y luego se añaden partículas magnéticas recubiertas de anticuerpo secundario específico del tipo celular u otro compañero de unión (por ejemplo, estreptavidina). En ciertos casos, se usan partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina junto con anticuerpos biotinilados primarios o secundarios.

20 En algunos aspectos, la separación se logra en un procedimiento en el que la muestra se coloca en un campo magnético, y aquellas células que tienen partículas magnéticamente sensibles o magnetizables unidas a las mismas serán atraídas al imán y separadas de las células no marcadas. Para la selección positiva, se retienen las células que se sienten atraídas por el imán; para la selección negativa, las células que no son atraídas (células no marcadas) se retienen. En algunos aspectos, se realiza una combinación de selección positiva y negativa durante el mismo paso de selección, donde las fracciones positivas y negativas se retienen y se procesan o se someten a pasos de separación adicionales.

25 En algunos casos, la selección basada en afinidad es a través de clasificación celular activada magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). La clasificación celular activada magnéticamente (MACS), por ejemplo, los sistemas CliniMACS son capaces de seleccionar células de alta pureza que tienen partículas magnetizadas unidas a las mismas. En ciertos casos, MACS opera en un modo en el que las especies no objetivo y objetivo se eluyen secuencialmente después de la aplicación del campo magnético externo. Es decir, las células unidas a partículas magnetizadas se mantienen en su sitio mientras las especies no unidas se eluyen. Luego, después de completar este primer paso de elución, las especies que quedaron atrapadas en el campo magnético y se les impidió eluir se liberan de alguna manera de tal manera que puedan eluirse y recuperarse. En ciertos casos, las células no objetivo se marcan y agotan de la población heterogénea de células.

35 En algunos casos, los pasos de procesamiento incluyen la extracción de la cámara de centrifuga de células incubadas con uno o más reactivos de selección. En algunos casos, las células pueden expresarse posteriormente y/o continuamente con uno o más pasos de lavado, que pueden, en algunos aspectos, realizarse en la cámara de centrifuga.

40 En algunos casos, las partículas magnéticamente sensibles se dejan unidas a las células que se incubarán, cultivarán y/o manipularán con posterioridad; en algunos aspectos, las partículas se dejan unidas a las células para la administración a un paciente. En algunos casos, las partículas magnetizables o magnéticamente sensibles se eliminan de las células. Los métodos para eliminar partículas magnetizables de las células son conocidos e incluyen, por ejemplo, el uso de anticuerpos no marcados competitivos, partículas magnetizables o anticuerpos conjugados con conectores escindibles, etc. En algunos casos, las partículas magnetizables son biodegradables.

#### *Congelación y crioconservación*

50 En algunos casos, las células, como las células seleccionadas, se suspenden en una solución de congelación, por ejemplo, después de un paso de lavado para eliminar plasma y plaquetas. En algunos aspectos pueden usarse cualquiera de una variedad de soluciones y parámetros de congelación conocidos. Un ejemplo implica el uso de PBS que contiene 20% de DMSO y 8% de albúmina de suero humano (HSA), u otros medios adecuados de congelación celular. Esto luego se diluye 1:1 con medios para que la concentración final de DMSO y HSA sea del 10% y 4%, respectivamente.

55 En algunos casos, las células, como las células seleccionadas, pueden transferirse a medios de crioconservación usando una cámara de centrifuga junto con uno o más sistemas asociados con un sistema de procesamiento celular, como una cámara de centrifuga producida y vendida por Biosafe SA, incluidos los que se usan con los sistemas de procesamiento de células Sepax® o Sepax 2®. En algunos casos, la transferencia al medio de crioconservación está asociada con uno o más pasos de procesamiento que pueden implicar el lavado de la muestra, por ejemplo, muestra celular seleccionada, como eliminar los medios de selección y/o reemplazar las células en un tampón o medio de crioconservación apropiado para su posterior congelación.

65 En algunos casos, las células se congelan, por ejemplo, se crioconservan, ya sea antes, durante o después de dichos métodos de procesamiento. En algunos casos, el paso de congelación y la descongelación subsiguiente

elimina granulocitos y, en cierta medida, monocitos en la población celular. Generalmente, las células se congelan a  $-80^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $1^{\circ}\text{C}$  por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

##### 5 *Cultivo y estimulación.*

En algunos casos, los pasos de procesamiento (por ejemplo, los llevados a cabo en la cámara y/o sistema cerrado) incluyen cultivo, estimulación y/o activación de células, como incubación y/o cultivo de células. Por ejemplo, en algunos casos, se proporcionan métodos para estimular las células aisladas, como poblaciones de células seleccionadas. En algunos casos, los pasos de procesamiento incluyen la incubación de una composición que contiene las células, como células seleccionadas, donde por lo menos una parte de la incubación está en una cámara de centrífuga y/u otro recipiente, por ejemplo, en condiciones de estimulación. La incubación puede ser anterior o en conexión con la ingeniería genética, como la ingeniería genética resultante de los casos del método de transducción descrito anteriormente. En algunos casos, la estimulación da como resultado la activación y/o la proliferación de las células, por ejemplo, antes de la transducción.

En algunos casos, los pasos de procesamiento incluyen incubaciones de células, como células seleccionadas, en las que los pasos de incubación pueden incluir cultivo, cultivación, estimulación, activación y/o propagación de células. En algunos casos, las composiciones o células se incuban en presencia de condiciones de estimulación o un agente de estimulación. Tales condiciones incluyen aquellas diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de las células en la población, para imitar la exposición al antígeno y/o cebar las células para la ingeniería genética, como la introducción de un receptor de antígeno recombinante.

En algunos casos, las condiciones para la estimulación y/o activación pueden incluir uno o más medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, por ejemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, como citoquinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células.

En algunos casos, las condiciones o agentes de estimulación incluyen uno o más agentes, por ejemplo, ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo de TCR. En algunos aspectos, el agente enciende o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en una célula T, como los agentes adecuados para suministrar una señal primaria, por ejemplo, para iniciar la activación de una señal inducida por ITAM, como los específicos para un componente de TCR, y/o un agente que promueve una señal coestimuladora, como una específica para un receptor coestimulador de células T, por ejemplo, anti-CD3, anti-CD28 o anti-41-BB, por ejemplo, unido a un soporte sólido como una perla, y/o una o más citoquinas. Entre los agentes de estimulación están las perlas anti-CD3/anti-CD28 (por ejemplo, expansor de células T CD3/CD28DYNABEADS® M-450 y/o las perlas ExpACT®). Opcionalmente el método de expansión puede comprender además el paso de añadir anticuerpo anti-CD3 y/o anti CD28 al medio de cultivo. En algunos casos, los agentes de estimulación incluyen IL-2 y/o IL-15, por ejemplo, una concentración de IL-2 de por lo menos aproximadamente 10 unidades/ml. En algunos casos, la incubación se lleva a cabo de acuerdo con técnicas como las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 6.040.177 de Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9):651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82, y/o Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

En algunos casos, las células T se expanden mediante la adición a la composición de células alimentadoras, como células mononucleares de sangre periférica no divisorias (PBMC), (por ejemplo, de tal manera que la población resultante de células contenga por lo menos aproximadamente 5, 10, 20, o 40 o más células alimentadoras de PBMC para cada linfocito T en la población inicial a expandir); e incubar el cultivo (por ejemplo, durante un tiempo suficiente para expandir el número de células T). En algunos aspectos, las células alimentadoras no divisorias pueden comprender células alimentadoras PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunos casos, las PBMC se irradian con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads para evitar la división celular. En algunos aspectos, las células alimentadoras se añaden al medio de cultivo antes de la adición de las poblaciones de células T.

En algunos casos, las condiciones de estimulación generalmente incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 25 grados Celsius, generalmente por lo menos aproximadamente 30 grados, y generalmente a aproximadamente 37 grados Celsius. Opcionalmente, la incubación puede comprender además la adición de células linfoblastoides transformadas por EBV no divisorias (LCL) como células alimentadoras. Las LCL pueden irradiarse con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 6000 a 10.000 rads. Las células alimentadoras de LCL en algunos aspectos se proporcionan en cualquier cantidad adecuada, como una proporción de células alimentadoras de LCL a linfocitos T iniciales de por lo menos aproximadamente 10:1.

En casos, las células T específicas de antígeno, como las células T CD4+ y/o CD8+ específicas de

antígeno, se obtienen estimulando linfocitos T no tratados o específicos de antígeno con antígeno. Por ejemplo, pueden generarse líneas o clones de células T específicas de antígeno para antígenos de citomegalovirus aislando células T de sujetos infectados y estimulando las células in vitro con el mismo antígeno.

5 En algunos casos, por lo menos una parte de la incubación con una o más condiciones de estimulación o agentes de estimulación, como cualquiera de los descritos anteriormente, se realiza en una cámara de centrifuga. En algunos casos, por lo menos una parte de la incubación realizada en una cámara de centrifuga incluye mezclar con un reactivo o reactivos para inducir estimulación y/o activación. En algunos casos, las células, como las células seleccionadas, se mezclan con una condición de estimulación o agente de estimulación en la cámara de centrifuga.  
10 En algunos aspectos de tales procesos, un volumen de células se mezcla con una cantidad de una o más condiciones o agentes de estimulación que es mucho menor de lo que normalmente se emplea cuando se realizan estimulaciones similares en una placa de cultivo celular u otro sistema.

15 En algunos casos, el agente de estimulación se añade a las células en la cavidad de la cámara en una cantidad que es sustancialmente menor que (por ejemplo, no es más del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50 %, 60%, 70% u 80% de la cantidad) en comparación con la cantidad del agente de estimulación que se usa típicamente o que sería necesario para lograr aproximadamente la misma eficiencia de selección o una similar del mismo número de células o el mismo volumen de células cuando la selección se realiza sin mezclar en una cámara de centrifuga, por ejemplo, en un tubo o bolsa con agitación o rotación periódica. En algunos casos, la incubación se realiza con la adición de un tampón de incubación a las células y un agente de estimulación para lograr un volumen objetivo con la incubación del reactivo de, por ejemplo, 10 ml a 200 ml, como por lo menos o de aproximadamente por lo menos o de aproximadamente o de 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml, 100 ml, 150 ml o 200 ml. En algunos casos, el tampón de incubación y el agente de estimulación se mezclan previamente antes de la adición a las células. En algunos casos, el tampón de incubación y el agente de estimulación se añaden por separado a las células. En algunos casos, la incubación por estimulación se lleva a cabo con una condición de mezcla suave periódica, que puede ayudar a promover interacciones energéticamente favorecidas y, por lo tanto, permite el uso de menos agente de estimulación general a la vez que se logra la estimulación y activación de las células.  
20  
25

30 En algunos casos, la duración total de la incubación con el agente de estimulación es de o de aproximadamente 1 hora y 72 horas, 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30 horas o 12 horas y 24 horas, como por lo menos o aproximadamente por lo menos 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas o 72 horas. En algunos casos, la duración total de la incubación en la cámara de centrifuga es de o de aproximadamente 5 minutos a 6 horas, como de 30 minutos a 3 horas, por ejemplo, por lo menos o aproximadamente por lo menos 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos o 180 minutos. En algunos casos, una parte adicional de la incubación puede realizarse fuera de la cámara de centrifuga.  
35

40 En algunos casos, la incubación generalmente se lleva a cabo en condiciones de mezcla, como en presencia de giro, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente baja, como una velocidad inferior a la utilizada para sedimentar las células, como desde o desde aproximadamente 600 rpm a 1700 rpm (por ejemplo a o aproximadamente a 600 rpm, 1000 rpm o 1500 rpm o 1700 rpm), como en un RCF en la muestra o pared de la cámara u otro recipiente de o de aproximadamente 80 g a 100 g (por ejemplo de o aproximadamente de o por lo menos de 80 g, 85 g, 90 g, 95 g, o 100 g). En algunos casos, el giro se lleva a cabo usando intervalos repetidos de un giro a una velocidad así de baja seguida de un período de descanso, como un giro y/o descanso durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 segundos, como un giro a aproximadamente 1 o 2 segundos seguido de un descanso durante aproximadamente 5, 6, 7 u 8 segundos.  
45

50 En algunos casos, las células se incuban en una cámara de centrifuga con un agente o agentes de estimulación de células que es/son un agente de unión celular, tal como un reactivo de unión a antígeno, como un anticuerpo, que es capaz de inducir señalización intracelular. y/o proliferación celular. En algunos casos, las células se incuban, incluso se mezclan con, perlas anti-CD3/anti-CD28 en una cámara de centrifuga de acuerdo con aspectos de los procesos en los métodos proporcionados.

55 En algunos casos, los pasos de procesamiento incluyen la extracción de la cámara de centrifuga de células incubadas, como mezcladas con una o más condiciones de estimulación o agentes de estimulación. En algunos casos pueden realizarse uno o más pasos de procesamiento adicionales en la cámara, como lavado, que puede ser anterior, posterior y/o continuo con la incubación por estimulación. En algunos casos, el lavado se realiza antes de la estimulación, como en células seleccionadas o descongeladas, para eliminar y reemplazar los medios con un medio adecuado para la estimulación y el cultivo de células.

60 En algunos casos, las células extraídas de la cámara de centrifuga que se han incubado, como mezcladas con una o más condiciones de estimulación o agentes de estimulación, se incuban adicionalmente fuera de la cámara. En algunos casos, la incubación adicional se efectúa a temperaturas mayores que la temperatura ambiente, como de más de o de más de aproximadamente 25° C, como generalmente de más de o de más de aproximadamente 32° C, 35° C o 37° C. En algunos casos, la incubación adicional se efectúa a una temperatura de aproximadamente 37° C ± 2° C, como a una temperatura de aproximadamente 37° C. En algunos casos, la incubación  
65



adicional es durante un tiempo de entre o de aproximadamente entre 12 horas y 96 horas, como por lo menos o por lo menos aproximadamente 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas o 96 horas.

En algunos casos, la incubación adicional se produce en un sistema cerrado. En algunos casos, después de la extracción desde la cámara de las células incubadas, como mezcladas, con una o más condiciones de estimulación o agentes de estimulación, como en un recipiente (por ejemplo, una bolsa), el recipiente que contiene las células se incuba durante una parte de tiempo adicional. En algunos casos, el recipiente, como la bolsa, se incuba a una temperatura de o de aproximadamente  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo de entre o aproximadamente entre 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30<sup>o</sup> horas o 12 horas y 24 horas, inclusive.

*Formulación*

En algunos casos, los pasos del proceso (por ejemplo, llevados a cabo en la cámara de centrífuga y/o sistema cerrado) pueden incluir la formulación de células, como la formulación de células modificadas genéticamente que resultan de los pasos de procesamiento de transducción proporcionados y/o uno o más otros pasos de procesamiento como se describe. En algunos casos, los métodos proporcionados asociados con la formulación de células incluyen el procesamiento de células transducidas, como células transducidas y/o expandidas usando los pasos de procesamiento descritos anteriormente, en un sistema cerrado, como en o asociado con una cámara de centrífuga.

En algunos casos, las células se formulan en un tampón farmacéuticamente aceptable, que puede, en algunos aspectos, incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el procesamiento incluye el intercambio de un medio en un medio o tampón de formulación que sea farmacéuticamente aceptable o deseado para la administración a un sujeto. En algunos casos, los pasos de procesamiento pueden implicar lavar las células transducidas y/o expandidas para reemplazar las células en un tampón farmacéuticamente aceptable que puede incluir uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales. Ejemplos de tales formas farmacéuticas, incluyendo los portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, pueden ser cualquiera de las descritas a continuación junto con formas aceptables para administrar las células y composiciones a un sujeto. La composición farmacéuticamente aceptable en algunos casos contiene las células en cantidades eficaces para tratar o prevenir la enfermedad o afección, como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz.

En algunos casos, el tampón de formulación contiene un crioprotector. En algunos casos, las células se formulan con una solución de crioprotector que contiene del 1,0% al 30% de solución de DMSO, como una solución de DMSO del 5% al 20% o una solución de DMSO del 5% al 10%. En algunos casos, la solución de crioprotector es o contiene, por ejemplo, PBS que contiene 20% de DMSO y 8% de albúmina de suero humano (HSA), u otros medios de congelación celular adecuados. En algunos casos, la solución de crioprotector es o contiene, por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 7,5% de DMSO. En algunos casos, los pasos de procesamiento pueden implicar lavar las células transducidas y/o expandidas para reemplazar las células en una solución de crioprotector.

En algunos casos, el procesamiento puede incluir la dilución o concentración de las células a una concentración o número deseado, como composiciones de forma de dosis unitaria que incluyen el número de células para administración en una dosis dada o fracción de la misma. En algunos casos, los pasos de procesamiento pueden incluir una reducción de volumen para aumentar de ese modo la concentración de células como se desee. En algunos casos, los pasos de procesamiento pueden incluir una adición de volumen para disminuir de este modo la concentración de células como se desee.

En algunos casos, el procesamiento incluye la adición de un volumen de un tampón de formulación a células transducidas y/o expandidas. En algunos casos, el volumen del tampón de formulación es de o de aproximadamente 10 ml a 1000 ml, como por lo menos o aproximadamente por lo menos o aproximadamente o 50 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml, 800 ml, 900 ml o 1000 ml.

Pueden realizarse ejemplos de tales pasos de procesamiento usando una cámara de centrífuga junto con uno o más sistemas o kits asociados con un sistema de procesamiento celular, como una cámara de centrífuga producida y vendida por Biosafe SA, incluyendo aquellas para uso con los sistemas de procesamiento de células Sepax ® o Sepax 2®.

En algunos casos, el método incluye efectuar la extracción desde la cavidad interna de la cámara de centrífuga una composición formulada, que es la composición resultante de células formuladas en un tampón de formulación, como un tampón farmacéuticamente aceptable, en cualquiera de los casos como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, la extracción de la composición formulada es a un recipiente, como una bolsa que está conectada operativamente como parte de un sistema cerrado con la cámara de centrífuga. En algunos casos, el recipiente, como la bolsa, está conectado a un sistema en una línea de salida o posición de salida como se ejemplifica en los sistemas ejemplares representados en la FIG. 5 o la FIG. 7.

En algunos casos, el sistema cerrado, como el asociado con un sistema de procesamiento celular, como la cámara de centrífuga, incluye un kit de salida de múltiples puertos que contiene un colector de tubos de múltiples vías asociado en cada extremo de una línea de tubos con un puerto al cual puede conectarse uno o una pluralidad de recipientes para la extracción de la composición formulada. En algunos aspectos, un número deseado o una pluralidad de recipientes de salida, por ejemplo, bolsas, pueden conectarse de manera estéril a uno o más, generalmente dos o más, como por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más de los puertos de la salida de múltiples puertos. Por ejemplo, en algunos casos, pueden unirse uno o más recipientes, por ejemplo, bolsas a los puertos, o a no todos los puertos. Por tanto, en algunos casos, el sistema puede efectuar la extracción de la composición de salida en una pluralidad de bolsas de salida.

En algunos aspectos, las células pueden expresarse en una o más de la pluralidad de bolsas de salida en una cantidad para la administración de dosificación, como para una administración de dosificación unitaria individual o administración de dosificación múltiple. Por ejemplo, en algunos casos, las bolsas de salida pueden contener cada una el número de células para la administración en una dosis dada o fracción de la misma. Por tanto, cada bolsa, en algunos aspectos, puede contener una dosis unitaria individual para la administración o puede contener una fracción de una dosis deseada, de tal manera que más de una de la pluralidad de bolsas de salida, como dos de las bolsas de salida, o 3 de las bolsas de salida, juntas, constituyen una dosis para la administración.

Por tanto, los recipientes, por ejemplo, bolsas, contienen generalmente las células a ser administradas, por ejemplo, una o más dosis unitarias de las mismas. La dosis unitaria puede ser una cantidad o número de células a administrar al sujeto o dos veces el número (o más) de las células a ser administradas. Puede ser la dosis más baja o la dosis más baja posible de las células que se administrarían al sujeto.

En algunos casos, cada uno de los recipientes, por ejemplo, bolsas, comprende individualmente una dosis unitaria de las células. Por tanto, en algunos casos, cada uno de los recipientes comprende el mismo número o aproximadamente o sustancialmente el mismo número de células. En algunos casos, la dosis unitaria incluye menos de aproximadamente  $1 \times 10^8$ , menos de aproximadamente  $5 \times 10^7$ , menos de aproximadamente  $1 \times 10^6$  o menos de aproximadamente  $5 \times 10^5$  de células, por kg del sujeto a tratar y/o del cual se han derivado las células. En algunos casos, cada dosis unitaria contiene por lo menos o aproximadamente por lo menos  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  o  $1 \times 10^8$  células modificadas, células totales, células T o PBMC. En algunos casos, el volumen de la composición celular formulada en cada bolsa es de 10 ml a 100 ml, como por lo menos o aproximadamente por lo menos 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml o 100 ml.

En algunos casos, una o más de la pluralidad de bolsas de salida pueden usarse para pruebas, como para evaluar la eficiencia de transducción. Por ejemplo, la eficiencia de la transducción en algunos aspectos puede evaluarse midiendo el nivel de expresión de una proteína recombinante, como una proteína heteróloga, codificada por un ácido nucleico contenido en el genoma de la partícula del vector viral después de la transducción usando casos de los métodos proporcionados. Por tanto, en algunos casos, el nivel de expresión de las moléculas recombinantes puede evaluarse mediante cualquiera de una serie de métodos bien conocidos como métodos basados en afinidad, por ejemplo métodos basados en inmunoafinidad, por ejemplo, en el contexto de proteínas de la superficie celular, como por citometría de flujo. En algunos aspectos, las células contenidas en uno o más de la pluralidad de recipientes, por ejemplo, bolsas, se prueban para determinar el nivel de expresión de moléculas recombinantes mediante la detección de un marcador de transducción y/o constructo informador. En otros casos, la expresión se evalúa usando un ácido nucleico que codifica una proteína de superficie truncada incluida dentro del vector como marcador.

En algunos casos, todos o sustancialmente todos de una pluralidad de recipientes a los que se extraen las células contienen el mismo número de células y a la misma o sustancialmente la misma concentración. En algunos casos, antes de extraer las células a uno de una pluralidad de recipientes, se ceban las líneas de tubos.

#### IV. Células y composiciones

Entre las células que se usarán en los métodos, como los pasos de procesamiento, por ejemplo, la transferencia de ácidos nucleicos virales, por ejemplo, transducción, se encuentran células, poblaciones celulares y composiciones.

Las células generalmente son células de mamífero, y típicamente son células humanas. En algunos casos, las células se derivan de la sangre, la médula ósea, la linfa o los órganos linfoides. En algunos aspectos, las células son células del sistema inmune, como células de inmunidad innata o adaptativa, por ejemplo, células mieloides o linfoides, incluyendo linfocitos, típicamente células T y/o células NK. Otras células ejemplares incluyen células madre, como células madre multipotentes y pluripotentes, incluyendo las células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las células son típicamente células primarias, como las aisladas directamente de un sujeto y/o aisladas de un sujeto y congeladas. En algunos casos, las células incluyen uno o más subconjuntos de células T u otros tipos de células como poblaciones de células T completas, células CD4+, células CD8+ y subpoblaciones de las mismas,

como las definidas por la función, estado de activación, madurez, potencial de diferenciación, expansión, recirculación, localización y/o capacidades de persistencia, especificidad de antígeno, tipo de receptor de antígeno, presencia en un órgano o compartimento particular, perfil de secreción de marcador o citoquina, y/o grado de diferenciación. Con referencia al sujeto a tratar, las células pueden ser alogénicas y/o autólogas. En algunos casos, los métodos incluyen aislar células del sujeto, prepararlas, procesarlas, cultivarlas y/o diseñarlas, y reintroducirlas en el mismo sujeto, antes o después de la crioconservación que, en algunos aspectos, se puede lograr en un sistema cerrado que usa uno o más de los pasos de procesamiento proporcionados.

Entre los subtipos y subpoblaciones de células T y/o de células T CD4+ y/o CD8+ se encuentran las células T sin tratar ( $T_N$ ), las células T efectoras ( $T_{EFF}$ ), las células T de memoria y subtipos de las mismas, como las células T de memoria de células madre ( $T_{SCM}$ ), T de memoria central ( $T_{CM}$ ), T de memoria efectora T ( $T_{EM}$ ) o T de memoria efectora diferenciadas terminalmente, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células T inmaduras, células T maduras, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T invariantes asociadas a la mucosa (MAIT), células T reguladoras de origen natural y adaptativas (Treg), células T auxiliares, como células TH1, células TH2, células TH3, células TH17, células TH9, células TH22, células T auxiliares foliculares, células T alfa/beta y células T delta/gamma.

En algunos casos, las células son células asesinas naturales (NK). En algunos casos, las células son monocitos o granulocitos, por ejemplo, células mieloides, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y/o basófilos.

#### V. Partículas de vectores virales, vectores virales y productos recombinantes codificados

Los métodos de transducción generalmente implican la transducción con vectores virales, como los que codifican productos recombinantes para ser expresados en las células. El término "vector", como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está unida. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico auto-replicativa, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están operativamente enlazados. Dichos vectores se denominan en la presente "vectores de expresión". Los vectores incluyen vectores virales, como vectores retrovirales, por ejemplo vectores lentivirales o gammaretrovirales, que tienen un genoma que lleva otro ácido nucleico y son capaces de insertarse en un genoma huésped para la propagación del mismo.

En algunos casos, un vector viral se transfiere a una célula en un vehículo que es una partícula del vector viral, que incluye un virión que encapsula y/o empaqueta un genoma de vector viral. En algunos de tales casos, el genoma del vector viral incluye típicamente secuencias además del ácido nucleico que codifica la molécula recombinante que permite que el genoma se empaquete en la partícula del virus.

En algunos casos, el vector viral contiene un ácido nucleico recombinante, como un ácido nucleico que codifica una molécula recombinante y/o heteróloga, como una proteína recombinante o heteróloga. En algunos casos, como en aspectos de los métodos proporcionados, la transducción con los vectores virales produce una composición de salida, células de la cual han sido transducidas y expresan productos recombinantes o genéticamente modificados de tales ácidos nucleicos. En algunos casos, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, normalmente no están presentes en una célula o muestra obtenida de la célula, como una obtenida de otro organismo o célula, que por ejemplo, no se encuentra ordinariamente en las células que se transducen y/o un organismo del que se deriva dicha célula. En algunos casos, los ácidos nucleicos no son de origen natural, como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza, incluido uno que comprende combinaciones quiméricas de ácidos nucleicos que codifican varios dominios de múltiples tipos de células diferentes.

En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células usando virus recombinantes o partículas de vectores virales como, por ejemplo, vectores derivados del virus simio 40 (SV40), adenovirus, virus adenoasociados (AAV). En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células, como las células T, usando vectores lentivirales recombinantes o vectores retrovirales, como los vectores retrovirales gamma (ver, por ejemplo, Koste et al. (2014) Gene Therapy 3 de abril de 2014 doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 29 de noviembre de 2011 (11):550-557.

En algunos casos, el vector retroviral tiene una secuencia de repetición terminal larga (LTR), por ejemplo, un vector retroviral derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), virus de células madre embrionarias murinas (MESV), virus de células madre murinas (MSCV), virus formador de foco de bazo (SFFV) o virus adenoasociado (AAV). La mayoría de los vectores retrovirales se derivan de los retrovirus murinos. En algunos casos, los retrovirus incluyen los derivados de cualquier fuente de células de ave o mamífero. Los retrovirus típicamente son anfotrópicos, lo que significa que son capaces de infectar células huésped de varias especies, incluidos los humanos. En un caso, el gen a expresar reemplaza las secuencias retrovirales gag, pol y/o env. Se han descrito una serie de sistemas retrovirales ilustrativos (por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.219.740; 6.207, 453; 5.219.740; Miller y Rosman (1989) BioTechniques 7:980-

990; Miller, A.D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180: 849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; y Boris-Lawrie y Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Developp.* 3: 102-109.

5 Los vectores virales generalmente incluyen ácidos nucleicos recombinantes como transgenes que codifican productos recombinantes para ser expresados por las células. Los productos recombinantes incluyen receptores recombinantes, que incluyen receptores de antígeno como receptores de antígeno no TCR funcionales, por ejemplo, receptores de antígeno quimérico (CAR), y otros receptores de unión a antígeno como receptores de células T transgénicos (TCR). También entre los receptores hay otros receptores quiméricos.

10 Los de receptores de antígenos ejemplares, incluyendo CAR, y los métodos para diseñar e introducir tales receptores en las células, incluyen los descritos, por ejemplo, en los números de publicación de solicitud de patente internacional WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, números de publicación de la patente de Estados Unidos US2002131960, US2013287748, US20130149337, Patentes de Estados Unidos N° 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 15 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353, y 8.479.118. y el número de solicitud de patente europea EP2537416, y/o los descritos por Sadelain et al., *Cancer Discov.* abril 2013I; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, octubre 2012; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, marzo 2012 18(2): 160-75. En algunos aspectos, los receptores de antígeno incluyen un CAR como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.446.190, y los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO/2014055668 Al. Los ejemplos de CAR incluyen los CAR como se divulgan en cualquiera de las publicaciones mencionadas anteriormente, como la WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, Patente de Estados Unidos N° 7.446.190, Patente de Estados Unidos N° 8.389.282, Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; y Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177). Ver también las WO2014031687, US 8.339.645, US 20 7.446.179, US 2013/0149337, la Patente de Estados Unidos N° 7.446.190 y Patente de Estados Unidos N° 8.389.282. Los receptores quiméricos, como los CAR, generalmente incluyen un dominio de unión a antígeno extracelular, como una parte de una molécula de anticuerpo, generalmente una región de cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) y/o región de cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) del anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo scFv.

30 En algunos casos, la parte de anticuerpo del receptor recombinante, por ejemplo, CAR, incluye además por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina como una región bisagra, por ejemplo, una región bisagra IgG4, y/o una región CH1/CL y/o Fc. En algunos casos, la región o parte constante es de una IgG humana, como IgG4 o IgG1. En algunos aspectos, la parte de la región constante sirve como una región espaciadora entre el componente de reconocimiento de antígeno, por ejemplo, scFv y el dominio transmembrana. El espaciador puede tener una longitud que proporcione una capacidad de respuesta aumentada de la célula después de la unión al antígeno, en comparación con la ausencia del espaciador. Los espaciadores ejemplares, por ejemplo, regiones bisagra, incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente internacional número WO2014031687. En algunos ejemplos el espaciador tiene o tiene aproximadamente 12 aminoácidos de longitud o no tiene más de 12 aminoácidos de longitud. Los espaciadores ejemplares incluyen aquellos que tienen por lo menos aproximadamente 40 10 a 229 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 200 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 175 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 150 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 125 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 100 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 75 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 50 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 40 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 30 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 20 aminoácidos o aproximadamente de 10 a 15 aminoácidos, e incluyendo cualquier número entero entre los puntos 45 finales de cualquiera de los intervalos enumerados. En algunos casos, una región espaciadora tiene aproximadamente 12 aminoácidos o menos, aproximadamente 119 aminoácidos o menos, o aproximadamente 229 aminoácidos o menos. Los espaciadores ejemplares incluyen la bisagra IgG4 sola, la bisagra IgG4 unida a los dominios CH2 y CH3, o la bisagra IgG4 unida al dominio CH3.

50 Este dominio de reconocimiento de antígeno generalmente está enlazado a uno o más componentes de señalización intracelular, como componentes de señalización que imitan la activación a través de un complejo receptor de antígeno, como un complejo TCR, en el caso de un CAR, y/o señal a través de otro receptor de superficie celular. Por tanto, en algunos casos, el componente de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo) está enlazado a uno o más dominios de señalización transmembrana e intracelular. En algunos casos, el dominio transmembrana está fusionado con el dominio extracelular. En un caso, se usa un dominio transmembrana que está naturalmente asociado con uno de los dominios en el receptor, por ejemplo, CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se selecciona o modifica por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana superficial para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

60 El dominio transmembrana en algunos casos se deriva de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio en algunos aspectos se deriva de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana incluyen aquellas derivadas de (es decir, comprenden por lo menos la(s) región(es) transmembrana) de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, 65 CDS, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154. Alternativamente, el dominio

transmembrana en algunos casos es sintético. En algunos aspectos, el dominio transmembrana sintético comprende predominantemente residuos hidrófobos como leucina y valina. En algunos aspectos, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. En algunos casos, el enlace es por conectores, espaciadores y/o dominios transmembrana.

5 Entre los dominios de señalización intracelular están aquellos que imitan o aproximan una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador, y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo. En algunos casos, está presente un conector oligo- o polipéptido corto, por ejemplo, un conector de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, como uno que contiene glicinas y serinas, por ejemplo, doblete de glicina-serina, y forma un enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del CAR.

10 El receptor, por ejemplo, el CAR, incluye generalmente por lo menos un componente o componentes de señalización intracelular. En algunos casos, el receptor incluye un componente intracelular de un complejo TCR, como una cadena TCR CD3 que media la activación de células T y la citotoxicidad, por ejemplo, la cadena zeta CD3. Por tanto, en algunos aspectos, la parte de unión al antígeno está conectada a uno o más módulos de señalización celular. En algunos casos, los módulos de señalización celular incluyen el dominio transmembrana CD3, los dominios de señalización intracelular CD3 y/u otros dominios transmembrana CD. En algunos casos, el receptor, por ejemplo, CAR, incluye además una parte de una o más moléculas adicionales como el receptor Fc  $\gamma$ , CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, en algunos aspectos, el CAR u otro receptor quimérico incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3- $\zeta$ ) o receptor Fc  $\gamma$  y CD8, CD4, CD25 o CD16.

15 En algunos casos, tras la ligadura del CAR u otro receptor quimérico, el dominio citoplasmático o el dominio de señalización intracelular del receptor activa por lo menos una de las funciones o respuestas efectoras normales de la célula inmune, por ejemplo, células T diseñadas para expresar el CAR. Por ejemplo, en algunos contextos, el CAR induce una función de una célula T, como la actividad citolítica o la actividad T-auxiliar, como la secreción de citoquinas u otros factores. En algunos casos, una parte truncada de un dominio de señalización intracelular de un componente receptor de antígeno o molécula coestimuladora se usa en lugar de una cadena inmunoestimuladora intacta, por ejemplo, si transduce la señal de función efectora. En algunos casos, el dominio o dominios de señalización intracelular incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de células T (TCR), y en algunos aspectos también las de los co-receptores que en el contexto natural actúan en concierto con dichos receptores para iniciar la transducción de señales después del acoplamiento del receptor al antígeno.

20 En el contexto de un TCR natural, la activación completa generalmente requiere no solo señalización a través del TCR, sino también una señal coestimuladora. Por tanto, en algunos casos, para promover la activación completa, también se incluye en el CAR un componente para generar una señal secundaria o coestimuladora. En otros casos, el CAR no incluye un componente para generar una señal coestimuladora. En algunos aspectos, se expresa en la misma célula un CAR adicional y proporciona el componente para generar la señal secundaria o coestimuladora.

25 La activación de células T se describe en algunos aspectos como mediada por dos clases de secuencias de señalización citoplasmáticas: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias). En algunos aspectos, el CAR incluye uno o ambos de dichos componentes de señalización.

30 En algunos aspectos, el CAR incluye una secuencia de señalización citoplasmática primaria que regula la activación primaria del complejo TCR. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen las derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CDS, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunos casos, las moléculas de señalización citoplasmática en el CAR contienen uno o más dominios de señalización citoplasmática, una parte de la misma o una secuencia derivada de zeta CD3.

35 En algunos casos, el CAR incluye un dominio de señalización y/o una parte transmembrana de un receptor coestimulador, como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. En algunos aspectos, el mismo CAR incluye los componentes activadores y coestimuladores.

40 En algunos casos, el dominio de activación está incluido dentro de un CAR, mientras que el componente coestimulador es proporcionado por otro CAR que reconoce otro antígeno. En algunos casos, los CAR incluyen CAR activadores o estimuladores, CAR coestimuladores, ambos expresados en la misma célula (ver WO2014/055668). En algunos aspectos, las células incluyen uno o más CAR estimuladores o activadores y/o un CAR coestimulador. En algunos casos, las células incluyen además CAR inhibidores (iCAR, ver Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (diciembre de 2013), como un CAR que reconoce un antígeno distinto del asociado con y/o específico para la

enfermedad o afección por la cual una señal activadora suministrada a través del CAR dirigido a la enfermedad se disminuye o inhibe mediante la unión del CAR inhibitor a su ligando, por ejemplo, para reducir los efectos fuera del objetivo.

5 En ciertos casos, el dominio de señalización intracelular comprende una transmembrana CD28 y un dominio de señalización enlazado a un dominio intracelular CD3 (por ejemplo, CD3-zeta). En algunos casos, el dominio de señalización intracelular comprende dominios coestimuladores CD28 y CD 137 (4-1BB, TNFRSF9) quiméricos, enlazados a un dominio intracelular zeta CD3.

10 En algunos casos, el CAR abarca uno o más, por ejemplo, dos o más dominios coestimuladores y un dominio de activación, por ejemplo, dominio de activación primaria, en la parte citoplasmática. Los CAR ejemplares incluyen componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 y 4-1BB.

15 En algunos casos, el CAR u otro receptor de antígeno incluye además un marcador, como un marcador de superficie celular, que puede usarse para confirmar la transducción o modificación de la célula para expresar el receptor, como una versión truncada de un receptor de superficie celular, como EGFR truncado (tEGFR). En algunos aspectos, el marcador incluye todo o parte (por ejemplo, forma truncada) de CD34, un NGFR o receptor del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, tEGFR). En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el marcador está enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica una secuencia conectora, como una secuencia conectora escindible, por ejemplo, T2A. Ver WO2014031687.

20 En algunos casos, el marcador es una molécula, por ejemplo, proteína de la superficie celular, que no se encuentra de manera natural en las células T o no se encuentra de manera natural en la superficie de las células T, o una parte de las mismas.

25 En algunos casos, la molécula es una molécula no propia, por ejemplo, una proteína no propia, es decir, una que no es reconocida como "propia" por el sistema inmune del huésped al que se transferirán las células adoptivamente.

30 En algunos casos, el marcador no cumple ninguna función terapéutica y/o no produce otro efecto que el de ser usado como marcador para ingeniería genética, por ejemplo, para seleccionar células modificadas con éxito. En otros casos, el marcador puede ser una molécula terapéutica o una molécula que ejerza de otro modo algún efecto deseado, como un ligando para que una célula se encuentre in vivo, tal como una molécula de punto de control coestimulante o inmune para potenciar y/o amortiguar las respuestas de las células tras la transferencia adoptiva y el  
35 encuentro con el ligando.

40 En algunos casos, los CAR se denominan CAR de primera, segunda y/o tercera generación. En algunos aspectos, un CAR de primera generación es uno que únicamente proporciona una señal inducida por la cadena CD3 tras unirse al antígeno; en algunos aspectos, un CAR de segunda generación es uno que proporciona dicha señal y señal coestimuladora, como una que incluye un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador como CD28 o CD 137; en algunos aspectos, un CAR de tercera generación es uno que incluye múltiples dominios coestimuladores de diferentes receptores coestimuladores.

45 En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye una parte extracelular que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunos aspectos, el receptor de antígeno quimérico incluye una parte extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento y un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv y el dominio intracelular contiene un ITAM. En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular incluye un dominio de señalización de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD-ζ).  
50 En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio transmembrana que enlaza el dominio extracelular y el dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, el dominio transmembrana contiene una parte transmembrana de CD28. En algunos casos, El receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de células T. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de células T es CD28 o 41BB.

55 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos, y no están limitados a una longitud mínima. Los polipéptidos, incluyendo los receptores proporcionados y otros polipéptidos, por ejemplo, conectores o péptidos, pueden incluir residuos de aminoácidos que incluyen residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación y fosforilación. En algunos aspectos, los  
60 polipéptidos pueden contener modificaciones con respecto a una secuencia nativa o natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debido a amplificación por PCR.

65 Los receptores recombinantes, como los CAR, expresados por las células administradas al sujeto

generalmente reconocen o se unen específicamente a una molécula que se expresa, se asocia y/o es específica para la enfermedad o afección o las células de la misma que se están tratando. Tras la unión específica a la molécula, por ejemplo, antígeno, el receptor generalmente suministra una señal inmunoestimuladora, como una señal transducida por ITAM, en la célula, promoviendo de este modo una respuesta inmune dirigida a la enfermedad o afección. Por ejemplo, en algunos casos, las células expresan un CAR que se une específicamente a un antígeno expresado por una célula o tejido de la enfermedad o afección o asociado con la enfermedad o afección.

En algunos contextos, la sobreexpresión de un factor estimulante (por ejemplo, una linfocina o una citoquina) puede ser tóxica para un sujeto. Por tanto, en algunos contextos, el vector viral se introduce en los segmentos de genes celulares que hacen que las células sean susceptibles a la selección negativa in vivo, como tras la administración en inmunoterapia adoptiva. Por ejemplo, en algunos aspectos, después de la transducción de las células con dichos segmentos de genes, las células se eliminan como resultado de un cambio en la condición in vivo del sujeto al que se administran. El fenotipo seleccionable negativo puede resultar de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. Los genes seleccionables negativos incluyen el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple tipo I (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell II: 223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen de la hipoxantina fosforibosiltransferasa celular (HPRT), el gen de la adenina fosforibosiltransferasa celular (APRT), la citosina desaminasa bacteriana, (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

Entre los ácidos nucleicos adicionales que pueden incluirse en el vector viral para la transducción y expresión en las células están aquellos productos codificadores que mejoran la eficacia de la terapia, como promoviendo la viabilidad y/o función de las células transferidas; proporcionan un marcador genético para la selección y/o evaluación de las células, como para evaluar la supervivencia o localización in vivo, y/o mejorar la seguridad, por ejemplo, haciendo que la célula sea susceptible a la selección negativa in vivo como se describe por Lupton S.D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6(1991); y Riddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992); ver también las publicaciones de PCT/US91/08442 y PCT/US94/05601 de Lupton et al. que describen el uso de genes de fusión bifuncionales seleccionables derivados de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo. Ver, por ejemplo, Riddell et al., Patente de Estados Unidos N° 6.040.177, en las columnas 14-17.

## VI. Métodos y composiciones terapéuticas

En algunos aspectos, los productos de los métodos se usan en métodos de tratamiento, por ejemplo, métodos terapéuticos, como para administrar las células y composiciones a sujetos en terapia celular adoptiva. También se proporcionan tales métodos y usos de células procesadas y producidas por los métodos, y composiciones farmacéuticas y formulaciones para su uso en las mismas. Los métodos proporcionados generalmente implican administrar las células o composiciones, por ejemplo, composición de salida y/o composiciones formuladas, a sujetos.

En algunos casos, las células expresan receptores recombinantes, como los CAR, u otros receptores de antígenos, como TCR transgénicos, por ejemplo, los transferidos en los métodos de transducción proporcionados en la presente. Dichas células generalmente se administran a sujetos que tienen una enfermedad o afección específicamente reconocida por el receptor. En un caso, las células expresan un receptor recombinante o un receptor quimérico, como un receptor de antígeno, por ejemplo, un CAR o un TCR, que se une específicamente a un ligando asociado con la enfermedad o afección o se expresa por una célula o tejido del mismo. Por ejemplo, en algunos casos, el receptor es un receptor de antígeno y el ligando es un antígeno específico y/o asociado con la enfermedad o afección. La administración generalmente produce una mejora en uno o más síntomas de la enfermedad o afección y/o trata o previene la enfermedad o afección o un síntoma de la misma. Entre las enfermedades, afecciones y trastornos se encuentran los tumores, incluidos los tumores sólidos, tumores malignos hematológicos y melanomas, incluyendo los tumores localizados y metastásicos, enfermedades infecciosas, como la infección con un virus u otro patógeno, por ejemplo, VIH, VHC, VHB, CMV y enfermedades parasitarias, y enfermedades autoinmunes e inflamatorias. En algunos casos, la enfermedad o afección es un tumor, cáncer, tumor maligno, neoplasia u otra enfermedad o trastorno proliferativo. Dichas enfermedades incluyen, pero no están limitadas a, leucemia, linfoma, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica (CLL), ALL, linfoma no de Hodgkin, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, linfoma folicular refractario, linfoma de células del manto, linfoma de células B indolente, tumores malignos de células B, cánceres de colon, pulmón, hígado, mama, próstata, ovario, piel, melanoma, hueso y cáncer de cerebro, cáncer de ovario, cánceres epiteliales, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de páncreas, linfoma de Hodgkin, carcinoma cervical, cáncer colorrectal, glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, meduloblastoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial, y/o mesotelioma.

En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección infecciosa como, pero no limitado a, infecciones virales, retrovirales, bacterianas y protozoarias, inmunodeficiencia, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), adenovirus, poliomavirus BK. En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección autoinmune o inflamatoria, como artritis, por ejemplo, artritis reumatoide (AR), diabetes tipo I, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, esclerodermia, enfermedad tiroidea

autoinmune, enfermedad de Grave, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, asma, y/o una enfermedad o afección asociada con trasplantes.

5 En algunos casos, el antígeno asociado con la enfermedad o trastorno al que se dirigen las células o composiciones se selecciona del grupo que consiste del receptor huérfano de tirosina quinasa ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA y antígeno de superficie de hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3 o 4, FBP, receptor de acetilcolina fetal e, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión de células L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, ROR1, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, ephrinB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 y MAGE A3, CE7, tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, tal como ciclina A1 (CCNA1), y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos.

15 En algunos casos, las células o composiciones se administran en una cantidad que es eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o afección, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz. Por tanto, en algunos casos, los métodos de administración incluyen la administración de las células y composiciones en cantidades eficaces. La eficacia terapéutica o profiláctica en algunos casos se monitoriza mediante la evaluación periódica de los sujetos tratados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se repite hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles y pueden determinarse otros regímenes de dosificación.

25 Como se usa en la presente, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo como "tratar" o "tratando") se refiere a la mejora o reducción completa o parcial de una enfermedad o afección o trastorno, o un síntoma, efecto adverso o resultado, o fenotipo asociado con el mismo. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no están limitados a, la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado de la enfermedad, y remisión o pronóstico mejorado. Los términos no implican la curación completa de una enfermedad o la eliminación completa de cualquier síntoma o efecto(s) sobre todos los síntomas o resultados.

35 Como se usa en la presente, "retrasar el desarrollo de una enfermedad" significa diferir, obstaculizar, ralentizar, retrasar, estabilizar, suprimir y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (como el cáncer). Este retraso puede ser de diferentes períodos de tiempo, dependiendo del historial de la enfermedad y/o del individuo que está siendo tratado. Como es evidente para un experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, abarcar la prevención, ya que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, puede retrasarse un cáncer en etapa tardía, como el desarrollo de metástasis.

40 "Prevenir", como se usa en la presente, incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o recurrencia de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no se le ha diagnosticado la enfermedad. En algunos casos, las células y composiciones proporcionadas se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para retrasar la progresión de una enfermedad.

45 Como se usa en la presente, "suprimir" una función o actividad es reducir la función o actividad cuando se compara con otras condiciones por lo demás iguales, excepto por una condición o parámetro de interés, o alternativamente, en comparación con otra condición. Por ejemplo, las células que suprimen el crecimiento tumoral reducen la tasa de crecimiento del tumor en comparación con la tasa de crecimiento del tumor en ausencia de las células.

50 Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, células o composición, en el contexto de la administración, se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones/cantidades y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado deseado, como un resultado terapéutico o profiláctico.

55 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica o células, se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado, como para el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno y/o efecto farmacocinético o farmacodinámico del tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto, y las poblaciones de células administradas.

60 Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

65



Los métodos para la administración de células para la terapia celular adoptiva son conocidos y pueden usarse en conexión con los métodos y composiciones proporcionados. Por ejemplo, los métodos de terapia de células T adoptivas se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0170238 de Gruenberg et al; la Patente de Estados Unidos N° 4.690.915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85). Ver, por ejemplo, Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10):928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338.

En algunos casos, la terapia celular, por ejemplo, la terapia celular adoptiva, por ejemplo, la terapia adoptiva de células T, se lleva a cabo mediante transferencia autóloga, en la que las células se aíslan y/o preparan de otro modo a partir del sujeto que va a recibir la terapia celular, o de una muestra derivada de dicho sujeto. Por tanto, en algunos aspectos, las células se derivan de un sujeto, por ejemplo, un paciente, que necesita un tratamiento y las células, y después del aislamiento y el procesamiento, las células se administran al mismo sujeto.

En algunos casos, la terapia celular, por ejemplo, terapia celular adoptiva, por ejemplo, terapia adoptiva de células T, se lleva a cabo mediante transferencia alogénica, en la que las células se aíslan y/o preparan de otro modo a partir de un sujeto que no es un sujeto que va a recibir o quién finalmente recibe la terapia celular, por ejemplo, un primer sujeto. En tales casos, las células se administran luego a un sujeto diferente, por ejemplo, un segundo sujeto, de la misma especie. En algunos casos, el primer y el segundo sujetos son genéticamente idénticos. En algunos casos, el primer y el segundo sujetos son genéticamente similares. En algunos casos, el segundo sujeto expresa la misma clase de HLA o supertipo que el primer sujeto.

Las células pueden administrarse mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante infusión en bolo, mediante inyección, por ejemplo, inyecciones intravenosas o subcutáneas, inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección trans-septal, inyección subescleral, inyección intracoroidea, inyección intracameral, inyección subconjuntival, inyección subconjuntival, inyección de sub-Tenon, inyección retrobulbar, inyección peribulbar o administración yuxtasccleral posterior. En algunos casos, se administran por vía parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, por administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. En algunos casos, una dosis dada se administra mediante una única administración de bolo de las células, mediante múltiples administraciones de bolo de las células o mediante la administración por infusión continua de las células.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada puede depender del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de células o receptores recombinantes, la gravedad y el curso de la enfermedad, si las células se administran con propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del sujeto y la respuesta a las células, y la discreción del médico tratante. En algunos casos, las composiciones y las células se administran adecuadamente al sujeto de una vez o durante una serie de tratamientos.

En algunos casos, las células se administran como parte de un tratamiento combinado, como simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, otra intervención terapéutica, como un anticuerpo o célula o receptor o agente modificado, como un agente citotóxico o terapéutico. Las células en algunos casos se coadministran con uno o más agentes terapéuticos adicionales o en conexión con otra intervención terapéutica, ya sea simultánea o secuencialmente en cualquier orden. En algunos contextos, las células se coadministran con otra terapia lo suficientemente cercana en el tiempo como para que las poblaciones celulares mejoren el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunos casos, las células se administran antes del uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, las células se administran después del uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, el uno o más agentes adicionales incluyen una citoquina, como IL-2, por ejemplo, para mejorar la persistencia.

Una vez que las células se han administrado al sujeto (por ejemplo, humano), la actividad biológica de las poblaciones celulares en algunos aspectos se mide por cualquiera de varios métodos conocidos. Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de las células al antígeno, in vivo, por ejemplo, imagenología, o ex vivo, por ejemplo, por ELISA o citometría de flujo. En ciertos casos, la capacidad de las células para destruir células objetivo puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, como ensayos de citotoxicidad descritos en, por ejemplo, Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7):689-702 (2009), y Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). En ciertos casos, la actividad biológica de las células también puede medirse analizando la extracción y/o secreción de ciertas citoquinas, como CD 107a, IFN $\gamma$ , IL-2 y TNF. En algunos aspectos, la actividad biológica se mide evaluando el resultado clínico, como la reducción de la carga tumoral. En algunos aspectos, se evalúan los resultados tóxicos, persistencia y/o expansión de las células, y/o la presencia o ausencia de una respuesta inmune del huésped.

En ciertos casos, las células se modifican de varias maneras, de tal manera que se incrementa su eficacia terapéutica o profiláctica. Por ejemplo, los CAR o TCR modificados expresados por la población puede conjugarse directa o indirectamente a través de un conector con una fracción objetivo. La práctica de conjugar compuestos, por ejemplo, el CAR o TCR, a fracciones objetivo es conocida en la técnica. Ver, por ejemplo, Wadwa et al., J. Drug

Targeting 3: 1 1 1 (1995), y la patente de Estados Unidos 5.087.616.

También se proporcionan composiciones o formulaciones farmacéuticas para su uso en tales métodos, que en algunos casos se formulan en relación con los métodos de procesamiento proporcionados, como en el sistema cerrado en el que se llevan a cabo otros pasos de procesamiento, como de manera automatizada o parcialmente automatizada.

En algunos casos, las células y composiciones se administran a un sujeto en forma de una composición o formulación farmacéutica, como una composición que comprende las células o poblaciones de células y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto para el cual se administraría la formulación.

Las composiciones farmacéuticas en algunos casos comprenden adicionalmente otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorrubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinorelbina, vincristina, etc. En algunos casos, los agentes se administran en forma de una sal, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen aquellas derivadas de ácidos minerales como ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos como ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y arilsulfónico, por ejemplo, ácido *p*-toluenosulfónico.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, pero no está limitado a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

En algunos aspectos, la elección del portador está determinada en parte por la célula particular y/o por el método de administración. En consecuencia, hay una variedad de formulaciones adecuadas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. En algunos aspectos, se usa una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o mezclas de los mismos están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 2% en peso de la composición total. Los portadores se describen, por ejemplo, por Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980). Los portadores farmacéuticamente aceptables generalmente no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no están limitados a: tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y *m*-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos como polietilenglicol (PEG).

Los agentes tamponantes en algunos aspectos están incluidos en las composiciones. Los agentes tamponantes adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio, y varios otros ácidos y sales. En algunos aspectos, se usa una mezcla de dos o más agentes tamponantes. El agente tamponante o mezclas de los mismos están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 4% en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Los métodos ejemplares se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21<sup>a</sup> ed. (1 de mayo de 2005).

Las formulaciones pueden incluir soluciones acuosas. La formulación o composición también puede contener más de un ingrediente activo útil para la indicación, enfermedad o afección particular que se está tratando con las células, preferiblemente aquellas con actividades complementarias a las células, donde las actividades respectivas no se afectan negativamente entre sí. Tales ingredientes activos están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. Por tanto, en algunos casos, la composición farmacéutica incluye además otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorrubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina y/o vincristina.

La composición farmacéutica en algunos casos contiene las células en cantidades eficaces para tratar o

prevenir la enfermedad o afección, como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz. La eficacia terapéutica o profiláctica en algunos casos se monitoriza mediante la evaluación periódica de los sujetos tratados. La dosificación deseada puede administrarse mediante una única administración en bolo de las células, mediante múltiples administraciones en bolo de las células o mediante la administración por infusión continua de las células.

5 Las células y composiciones pueden administrarse usando técnicas de administración, formulaciones y/o dispositivos estándar. La administración de las células puede ser autóloga o heteróloga. Por ejemplo, pueden obtenerse células inmunosensibles o progenitoras de un sujeto y administrarse al mismo sujeto o un sujeto compatible diferente. Las células inmunosensibles derivadas de sangre periférica o su progenie (por ejemplo, 10 derivadas in vivo, ex vivo o in vitro) pueden administrarse mediante inyección localizada, incluyendo la administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene una célula inmunosensible modificada genéticamente), generalmente se formulará en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, emulsión).

15 Las formulaciones incluyen aquellas para administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o por supositorio. En algunos casos, las poblaciones celulares se administran parenteralmente. El término "parenteral", como se usa en la presente, incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. En algunos casos, las 20 células se administran al sujeto usando administración sistémica periférica mediante inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

25 Las composiciones en algunos casos se proporcionan como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que en algunos aspectos pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas son normalmente más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. Adicionalmente, las composiciones líquidas son algo más convenientes de administrar, especialmente por inyección. Las composiciones viscosas, por otro lado, pueden formularse dentro del intervalo de viscosidad apropiado para proporcionar períodos de contacto más largos con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender 30 portadores, que pueden ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos.

35 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando las células en un solvente, como en una mezcla con un portador, diluyente o excipiente adecuado como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes tamponantes del pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes y/o colores, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Los textos estándar pueden ser consultados en algunos aspectos para 40 preparar preparaciones adecuadas.

45 Pueden añadirse varios aditivos que mejoran la estabilidad y la esterilidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol y ácido sórbico. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

50 Las formulaciones que se usarán para la administración in vivo son generalmente estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Entre los pasos de procesamiento puede incluirse la formulación de tales composiciones.

55 Como se usa en la presente, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, "un" o "uno" significa "por lo menos uno" o "uno o más". Se entiende que los aspectos y variaciones descritos en la presente incluyen "que consiste" y/o "que consiste esencialmente de" aspectos y variaciones.

60 A lo largo de esta divulgación, se presentan varios aspectos de la materia divulgada en un formato de intervalos. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalos es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la materia divulgada. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese intervalo declarado está comprendido dentro de la materia divulgada. Los límites 65 superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más

pequeños, y también están incluidos en la materia divulgada, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también están incluidos en la materia divulgada. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

5 El término "aproximadamente" como se usa en la presente se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) casos que están dirigidos a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción que se refiere a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

10 Como se usa en la presente, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos, sustancias o compuestos, incluyendo las células. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

15 Como se usa en la presente, una afirmación de que una célula o población de células es "positiva" para un marcador particular se refiere a la presencia detectable sobre o en la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la presencia de expresión de superficie detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectar dicho anticuerpo, en donde la tinción es detectable por citometría de flujo en un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada llevando a cabo el mismo procedimiento con un control coincidente con isotipo en condiciones por lo demás idénticas y/o a un nivel sustancialmente similar al de la célula que se sabe que es positiva para el marcador, y/o a un nivel sustancialmente más alto que para una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

25 Como se usa en la presente, una afirmación de que una célula o población de células es "negativa" para un marcador particular se refiere a la ausencia de presencia sustancial detectable en la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la ausencia de expresión de superficie detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectar dicho anticuerpo, en donde la tinción no se detecta mediante citometría de flujo a un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada llevando a cabo el mismo procedimiento con un control coincidente con el isotipo en condiciones por lo demás idénticas, y/o a un nivel sustancialmente más bajo que el de la célula que se sabe que es positiva para el marcador, y/o a un nivel sustancialmente similar en comparación al de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

35 **EJEMPLOS**

Los siguientes ejemplos se incluyen solo con propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

40 **Ejemplo 1: Transducción viral de células T humanas primarias en una cámara de centrifuga**

Este ejemplo demuestra la transducción de células T humanas primarias aisladas con un vector viral recombinante que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), con transducción iniciada bajo fuerza centrífuga en una cámara de centrifuga cilíndrica sustancialmente rígida, de acuerdo con un caso proporcionado en la presente. Las células T se aislaron mediante selección positiva de una muestra de producto de aféresis humana.

Las células resultantes se activaron usando un reactivo anti-CD3/CD28. Para el inicio de la transducción, las células se incubaron con una partícula viral que contiene un genoma de vector viral que codifica un CAR anti-CD19 en varias condiciones después de la activación.

50 Bajo un conjunto de condiciones ("Sepax"), la transducción se inició incubando las células en una cavidad de una cámara de centrifuga (Biosafe SA, A200), bajo centrifugación en una unidad de procesamiento Sepax® 2 (Biosafe SA). Una composición líquida de 50 ml que contenía  $50 \times 10^6$  de las células aisladas se combinó en un paquete de transferencia de 300 ml con un stock de líquido de 50 ml que contenía las partículas del vector viral. Usando el sistema Sepax® para mover el pistón de la cámara, la composición se introdujo en la cavidad de la cámara de centrifuga. También se introdujeron 100 ml de aire, aumentando de este modo el volumen de la cavidad a 200 ml y dando como resultado una disminución en la proporción del volumen de líquido en la cavidad con respecto al área superficial interna de la cavidad. La cámara se hizo girar aumentando a una velocidad de aproximadamente 4600 rpm en la unidad Sepax® 2, correspondiente a una fuerza g relativa (fuerza centrífuga relativa (RCF)) en la pared lateral interna de la cavidad de procesamiento de la cámara de aproximadamente 600. La duración del giro a esta velocidad fue de 60 minutos.

65 Para otro conjunto de condiciones ("VueLife"), una composición que contenía  $25 \times 10^6$  células y el mismo stock de partículas virales del vector a una proporción volumétrica de 1:1 se incubaron en 50 ml en una bolsa de centrifuga, en un adaptador de centrifuga Cl-50, y se giraron a una fuerza centrífuga relativa aproximada (RCF) en

las células de aproximadamente 1000 g durante 60 minutos. Se usó una bolsa con un volumen menor en comparación con la cámara de centrífuga para permitir la centrifugación a una fuerza centrífuga relativa en la célula de 1000 g. Los controles incluyeron una muestra "no transducida" (misma concentración de células incubadas durante el mismo tiempo en una placa de 24 pocillos sin virus sin centrifugación y una muestra de control "sin giro" ("0xg") (misma concentración de células/virus incubados durante el mismo tiempo en la misma placa sin centrifugación). En cada conjunto de condiciones, se incluyó un policitió. Después del giro (o incubación "sin giro" comparable), las composiciones se incubaron durante 24 horas a 37 grados C para la transducción completa.

Las células se expandieron y la eficiencia de transducción para cada una de las condiciones respectivas se calculó el día 6 después del aislamiento como porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión de superficie del CAR codificado (como se detecta por citometría de flujo usando un anticuerpo específico para el CAR). Los resultados se muestran en la FIG. 1A. Como se muestra, se observó una mayor eficiencia de transducción después del inicio de la transducción incubando células en la cavidad de la cámara de centrífuga bajo rotación, en comparación con la bolsa centrífuga (VueLife®) y los controles. La FIG. 1B muestra expansión celular (como lo indica el número de duplicaciones de población) durante el período de seis días.

**Ejemplo 2: Transducción de células T humanas primarias en una cámara de centrífuga a diferentes proporciones de volumen de líquido a área de superficie**

La eficacia de la transducción después del inicio de la transducción en la cámara de centrífuga se evaluó en varias condiciones, usando el mismo número de células y unidades infecciosas de virus, y diferentes proporciones de volumen de líquido a área de superficie interna de la cavidad de la cámara. Las células fueron generalmente preparadas y estimuladas como se describe en el Ejemplo 1. Todas las condiciones de inicio de la transducción usaron una proporción UI: célula de 2:1 y un número total de 100 x 10<sup>6</sup> células.

Para una primera muestra ("5.1 ml/pulgada cuadrada", que se refiere a 5,1:1 ml de líquido por pulgada cuadrada de superficie de la cavidad interna usada en esta condición), se combinaron 100 x 10<sup>6</sup> células, en un volumen de líquido de 100 ml, con 100 ml de una composición líquida que contenía las partículas del vector viral. Para una segunda muestra ("2,5 ml/pulgada cuadrada", que se refiere a 2,5 ml de líquido por pulgada cuadrada de superficie de la cavidad usada en esta condición), se combinaron 50 ml de una composición líquida con el mismo número de células con 50 ml de una composición líquida que contenía las partículas del vector viral. En cada caso, se incluyó un policitió para una concentración final durante la centrifugación de 10 µg/ml. Las composiciones líquidas respectivas (y para la segunda muestra, 100 ml de aire) se extrajeron e incubaron en la cavidad de retención de líquido de la cámara. En cada caso, la cámara se hizo girar (aumentando) en la unidad de procesamiento Sepax® 2 a unas rpm de aproximadamente 4600, correspondiente a un RCF en la pared lateral de la cavidad interna de aproximadamente 600 g durante 60 minutos. Las muestras se incubaron luego durante 24 horas adicionales a 37 grados, para completar la transducción.

Las células se expandieron y se calculó la eficiencia de la transducción en el día 6 después del aislamiento, determinando el porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> Células con expresión superficial del CAR, detectadas como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la FIG. 2. Como se muestra, para el inicio de la transducción en la cámara de centrífuga usando el mismo número de células y unidades infecciosas de virus, se observó una mayor eficiencia de transducción cuando se usa una proporción más baja de volumen de líquido de la composición en la cavidad al área de superficie interna de la cavidad.

**Ejemplo 3: Transducción de células T humanas primarias en una cámara de centrífuga**

Otro estudio comparó la eficiencia de transducción en varias condiciones, incluyendo la transducción en una cámara de centrífuga de acuerdo con los casos de los métodos proporcionados, usando varias proporciones de volumen de líquido a área de superficie de la cavidad. Las células T humanas se aislaron de un producto de aféresis y se estimularon como se ha descrito anteriormente.

Después de la estimulación, se incubaron 80 x 10<sup>6</sup> células en condiciones variables, incluyendo la transducción con un vector viral que codifica un CAR. Se incluyó un policitió en todas las muestras.

Para condiciones en las cuales se inició la transducción en la cámara de centrífuga, se incubaron 80 x 10<sup>6</sup> células con virus que contenía el vector en la cavidad de la cámara, a una proporción de 2 UI de virus por célula. La incubación se llevó a cabo mientras se centrifugaba la cámara usando el sistema de procesamiento Sepax® 2 a un RCF en la pared lateral interna de la cavidad de aproximadamente 600 g durante 60 minutos. Bajo un conjunto de condiciones ("Sepax (0,1 UI/célula/ml)", con 0., ml de volumen de líquido por pulgada cuadrada de superficie de la cavidad interna), para la centrifugación, las células y el virus se introdujeron en la cavidad de la cámara en un volumen de líquido total de 20 ml; también se introdujeron 180 ml de aire en la cavidad. Bajo otro conjunto de condiciones ("Sepax (0,01 UI/célula/ml)", con 5,1 ml de volumen de líquido por pulgada cuadrada de superficie de la cavidad interna), se introdujeron la misma cantidad de células y unidades infecciosas de virus en un volumen de líquido de 200 ml.

En condiciones separadas, "1000 g en placa", la transducción de células se inició en presencia de virus (2 UI/célula) en una placa de 24 pocillos, con centrifugación a un RCF en las células de aproximadamente 1000 g durante 60 minutos. También se usaron un control negativo "no transducido" (incubación en una placa de 24 pocillos sin virus o centrifugación) y un control "sin giro" (incubación con virus a una proporción de 2 unidades infecciosas (UI) por célula sin centrifugación en la misma placa de 24 pocillos). Las células se incubaron durante 24 horas a 37 grados C para completar la transducción.

Las células se expandieron y se calculó la eficiencia de transducción para cada muestra como porcentaje de células CD3<sup>+</sup> que expresan el CAR en su superficie, como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Los resultados se muestran en la FIG. 3. Como se muestra, la transducción se observó después del inicio de la transducción bajo rotación en la cámara de centrífuga y en la placa de 24 pocillos en comparación con las condiciones de control. Para el inicio de la transducción en la cámara de centrífuga, se observó una mayor eficiencia de transducción con una proporción más baja de volumen de líquido con respecto al área de superficie interna de la cavidad de la cámara.

#### **Ejemplo 4: Evaluación del número de copias del vector (VCN) después de la transducción en una cámara de centrífuga**

El número de copias del vector viral integrado (VCN) se evaluó después de la transducción iniciada bajo ciertas condiciones en el estudio descrito en el Ejemplo 3. Se determinó el VCN por célula para el vector retroviral derivado de SGF por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). El VCN medio se determinó mediante qPCR específico para el genoma viral entre todas las células en la composición después de la transducción ("VCN/célula"), y por separado entre las células transducidas (células que expresan el transgén) solo ("VCN/CAR<sup>+</sup>"). Los resultados se presentan en la FIG. 4. En el gráfico mostrado en la FIG. 4, la etiqueta "Sepax 20" se refiere a un volumen de líquido de 20 ml usado en la cavidad de la cámara durante el inicio de la transducción; los resultados así etiquetados son del mismo estudio y condición etiquetada como "Sepax (0,1 UI/célula/ml)" en el Ejemplo 3 (para el cual se determinó que la eficiencia de transducción era del 25%). De manera similar, la etiqueta "Sepax 200" se refiere a un volumen de líquido de 200 ml utilizado en la cavidad de la cámara durante el inicio de la transducción; los resultados así etiquetados son del mismo estudio y las condiciones etiquetadas como "Sepax (0.01 UI/célula/ml)" en el Ejemplo 3 (para el cual se determinó que la eficiencia de transducción era del 7%). Como se muestra, cuando se inició la transducción iniciando la transducción de células en la cámara de centrífuga sustancialmente rígida cilíndrica bajo rotación, la eficiencia de transducción aumentada no se asoció con un número de copias de vector aumentado. En este estudio, las condiciones que producen una eficiencia de transducción aumentada también produjeron una disminución del número medio de copias del vector por célula.

#### **Ejemplo 5: Transducción usando un sistema de procesamiento Sepax® 2**

En un proceso ejemplar, las células T se transducen con una partícula de vector viral de forma automatizada en una cámara de centrífuga integral a un sistema de un solo uso y al sistema de procesamiento Sepax® 2 (Biosafe SA). La cámara es integral a un sistema cerrado estéril y desechable, que es un kit de procesamiento de un solo uso vendido por Biosafe SA para su uso en medicina regenerativa. El kit está configurado para incluir una serie de líneas de tubos que conectan la cámara a una serie de recipientes, con una configuración general mostrada en la FIG. 5 y/o la FIG. 7. La cámara (1) incluye una pared final (13) que incluye una abertura de entrada/salida (6), una pared lateral rígida (14) y un pistón (2), que definen colectivamente una cavidad interna (7) del cámara. El sistema está configurado para incluir varios recipientes etiquetados: Bolsa de salida, Bolsa de residuos, Bolsa de entrada, y dos bolsas de diluyente (Bolsa de diluyente 1 y Bolsa de diluyente 2), y varios conectores, incluyendo llaves de paso y válvulas. Se incluyen abrazaderas (5) para bloquear el flujo entre diferentes partes del sistema a través de las líneas de tubos. En algunos casos, el sistema incluye un filtro estéril de conexión luer macho (15) con una tapa de conexión luer hembra (16), a través de la cual puede extraerse gas, por ejemplo, aire, de manera estéril, cuando se libera/retira la tapa. El sistema se coloca en asociación con la unidad de procesamiento Sepax® 2, que incluye una centrífuga y un armario para alojar los componentes.

En el proceso ejemplar, la Bolsa de entrada contiene una composición que contiene las células a transducir. La Bolsa de diluyente 1 contiene partículas de vectores virales, policitación y medio. En algunos casos, se incluye aire en la bolsa con las partículas del vector. Por ejemplo, en un caso alternativo, puede conectarse un recipiente con aire y/o medio adicional en esta posición en lugar de y/o además de la composición del virus.

Un usuario indica a la unidad de procesamiento a través de una interfaz de usuario que debe ejecutarse un nuevo programa e introduce varios parámetros en el sistema, incluyendo un Volumen Inicial (entre 20-900 ml), un Volumen Final (entre 20-220 ml), un Volumen Intermedio (entre 10-100 ml), un Volumen de Dilución (entre 50-220 ml), una fuerza g (entre 100-1600 o entre 200-3200 g) (RCF en la pared lateral interna del cavidad de procesamiento de la cámara) y un Tiempo de Sedimentación (entre 120 y 3600 segundos). El usuario indica al sistema que el proceso debe iniciarse, introduce información de identificación para el sujeto del que se derivan las células e indica al sistema que la entrada está completa, lo que le indica al sistema que lleve a cabo una prueba del kit del sistema cerrado.

Con todas las válvulas de llave de paso respectivas en la posición cerrada, las abrazaderas bloquean el movimiento del fluido entre los tubos y la Bolsa de Diluyente 1, Bolsa de residuos, Bolsa de Entrada y Bolsa de Salida (para la recogida del producto que contiene las células), respectivamente, están abiertas y se inicia un programa automatizado por la comunicación con el sistema por parte del usuario.

En respuesta, el sistema provoca, de manera automatizada, el movimiento de líquido y/o gas entre los varios componentes del sistema cerrado al hacer que la apertura y cierre de las válvulas y el movimiento del pistón varíen el volumen de la cavidad. Provoca el reposicionamiento de una llave de paso para permitir el flujo entre la Bolsa de Entrada y la cavidad interna de la cámara, a través de la abertura de entrada/salida y bajando el pistón dentro de la cámara de centrífuga, aumentando de este modo el volumen de la cavidad y extrayendo un volumen (el Volumen Inicial definido por el usuario) de la composición de las células y las partículas del vector viral desde la Bolsa de Entrada a la cavidad de procesamiento, a través de una entrada/salida en la pared final de la cámara.

El sistema hace que la centrífuga gire la cámara durante 120 segundos a 500 g, provoca la purga de 20 ml de volumen de la cavidad a la Bolsa de Entrada para enjuagarla, y extrae el volumen de nuevo dentro de la cavidad. El sistema hace que la centrífuga gire la cámara durante 180 segundos a 500 g, provocando sedimentación. El sistema reposiciona las llaves de paso para permitir el flujo de fluido y/o gas entre la cavidad y la Bolsa de Residuos y efectúa la extracción de fluido de la cavidad hacia la Bolsa de Residuos, dejando el Volumen Intermedio definido por el usuario en la cavidad.

El sistema provoca la rotación de la llave de paso para bloquear el movimiento del fluido entre el tubo y la bolsa de residuos. El sistema provoca la entrada de una composición líquida que contiene partículas de vectores virales y, si corresponde, aire (colectivamente, al Volumen de Diluyente definido por el usuario) desde la Bolsa de Diluyente 1 a la cavidad de la cámara. Estos pasos efectúan colectivamente la entrada de una composición de entrada que contiene células para transducir y partículas de vectores virales y, en algunos casos, aire, en la cavidad. En algunos casos, el volumen total de la cavidad es de 200 ml, por ejemplo, incluyendo un volumen de líquido de 200 ml o incluyendo menos de 200 ml de volumen de líquido y el resto del volumen de la cavidad incluye aire.

La centrifugación de la cámara se lleva a cabo durante el Tiempo de Sedimentación definido por el usuario a la fuerza g definida por el usuario, lo que da como resultado el inicio de la transducción de células en la composición de entrada con partículas virales de vectores. En un caso alternativo, un volumen de aire y/o medio se introduce en la cavidad desde otra bolsa en la posición de las Bolsas de Diluyente 1 y 2, antes de la centrifugación. En un caso alternativo, se extrae aire antes de la centrifugación a través del filtro de conexión luer (15), por ejemplo, cuando el usuario abre la abrazadera (5) bloqueando el movimiento del fluido entre el filtro (15) y las líneas de tubos y la cavidad (7) y liberando la tapa hembra (16), permitiendo que el aire que queda en la cámara pase a través del filtro desde el entorno. En algunos casos, el movimiento del aire es automatizado por el sistema, por ejemplo, en base a un volumen de entrada de aire adicional definido por el usuario introducido en el sistema y el usuario indica al sistema que el aire puede ser introducido al volumen de aire definido. En algunos casos, aire, si lo hay, se libera a través de la línea de tubos y el filtro sin tapan (15) mediante un proceso similar después de la centrifugación.

Cuando el sistema lo solicita, el usuario cierra el movimiento de bloqueo de la abrazadera de fluido entre la Bolsa de Diluyente 1 y las líneas de tubos y abre el movimiento de bloqueo de la abrazadera de fluido entre la Bolsa de Diluyente 2 y las líneas de tubos. El sistema provoca el movimiento del fluido desde la Bolsa de Diluyente 2 hacia la cavidad de procesamiento abriendo la válvula de la llave de paso apropiada y el movimiento del pistón para extraer a la cavidad un volumen de fluido desde la Bolsa de Diluyente 2 igual a la cantidad requerida para producir un volumen de líquido total en la cámara igual al Volumen Final definido por el usuario. Luego, el sistema provoca la mezcla del líquido en la cavidad durante 60 segundos y luego transfiere el fluido en la cavidad interna a la Bolsa de Salida, que contiene de este modo una composición de salida con células a las que se han unido las partículas virales y/o infectado con el vector viral. Estas células luego se incuban generalmente para la finalización de la transducción, por ejemplo, a 37 grados C, durante por ejemplo 24 horas.

**Ejemplo 6: Evaluación del crecimiento celular y la viabilidad a diferentes fuerzas centrífugas**

Se evaluó el efecto de la fuerza centrífuga sobre las células durante la centrifugación usada para iniciar la transducción de células en una cámara de acuerdo con ciertos casos proporcionados. La expansión celular y la viabilidad celular se evaluaron tras la exposición a diferentes fuerzas centrífugas.

Las células T se aislaron y se estimularon esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. En el día 4, varias, cada una conteniendo individualmente las células, se introdujeron en una cavidad de una cámara de centrífuga en una unidad de procesamiento Sepax® 2 (Biosafe SA) y se sometieron a centrifugación a varias fuerzas centrífugas. Específicamente, las muestras se centrifugaron durante 60 minutos en una cámara (A-200F) integral a un kit de un solo uso usando el sistema de procesamiento Sepax® 2 a aproximadamente 4600 rpm, aproximadamente 6000 rpm y aproximadamente 7400 rpm, respectivamente), que logró un RCF en la superficie interna de la pared lateral de la cavidad de aproximadamente 600 g, 1000 g y 1600 g, respectivamente. Como

control, se extrajo una muestra de las células por separado en la cavidad de la centrífuga, pero no se giró (condición de 0 g). En cada caso, después del giro (o incubación sin giro), las células se incubaron a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> hasta el día 10. En varios puntos a lo largo del proceso, se monitorizó la expansión celular (duplicación de la población en comparación con el número de células en el día 0) y la viabilidad. Específicamente, estas mediciones se tomaron los días 0, 3, 4, 5, 6, 7 y 10. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

Como se muestra en la FIG. 6A y la FIG. 6B, respectivamente, se observó que la centrifugación a varias velocidades no tenía un efecto sustancial sobre la expansión celular ("duplicaciones de la población") o la viabilidad durante los 10 días. Los resultados demuestran que las células T podrían tolerar la centrifugación a fuerzas centrífugas relativas de por lo menos hasta o aproximadamente 1600 g, como se mide en la pared lateral de la cavidad de la cámara, lo que corresponde a aproximadamente la misma fuerza media sobre las células en la superficie celular: interfaz líquida, en condiciones usadas para el inicio de la transducción en los casos proporcionados en la presente, sin cambios sustanciales detectables en expansión o viabilidad.

**Ejemplo 7: Paso del proceso de transducción usando inicio de la transducción en cámara de centrífuga generalmente cilíndrica**

Este ejemplo describe los parámetros generales de un paso del proceso de transducción que se usó en los estudios descritos en los Ejemplos 8-10. La transducción de células con un vector viral recombinante que codifica un receptor de antígenos quimérico (CAR) se inició en una cámara de centrífuga de acuerdo con los casos proporcionados.

Las células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> se aislaron mediante selección positiva de una muestra de producto de aféresis humana. Las células aisladas se crioconservaron y descongelaron a 37° C. Las células descongeladas se activaron usando perlas CD3/CD28 en presencia de IL-2 (100 UI/ml) durante 72 horas a 37° C antes del inicio de la transducción. En algunos casos, varios aspectos de los pasos de preparación, aislamiento y/o activación de aféresis también se llevaron a cabo en la cavidad de una cámara de centrífuga de acuerdo con los casos proporcionados, en asociación con el sistema Sepax® 2, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 11.

En preparación para la transducción, una cámara de procesamiento centrífuga (1) (A-200F), integral a un kit desechable estéril de un solo uso vendido por Biosafe SA para uso de medicina regenerativa, esencialmente como se representa en la FIG. 7, se colocó en asociación con una unidad de procesamiento SEPAX® 2, que por lo tanto podría proporcionar a la cámara de centrífuga la fuerza y el desplazamiento axial (que permite el control de las dimensiones de la cavidad interna). (Patente de Estados Unidos N° 6.733.433).

Para iniciar la transducción, se llevaron a cabo los siguientes pasos.

Para generar una composición que contiene partículas de vectores virales para la mezcla estéril con las células activadas en la cámara de centrífuga, se transfirieron asépticamente medio completo (que contienen medio de células hematopoyéticas libres de suero suplementado con suero humano al 5% e IL-2, y un policatión en una cantidad suficiente para una concentración final durante el inicio de la transducción de 10 µg/ml), partículas de vectores virales en el número indicado o el número relativo de unidades infecciosas (UI) (por ejemplo, 1,8 UI/célula o 3,6 UI/célula) y, cuando correspondía, aire, a una bolsa de centrífuga, que en última instancia se conectaría de manera estéril con el kit en una posición de Bolsa de Diluyente para la entrada como se describe a continuación.

Una bolsa de cultivo que contenía las células activadas se conectó de manera estéril con el kit desechable de un solo uso a través de una línea tubos en la posición de la "Bolsa de Entrada" mostrada en la FIG. 5 y la FIG. 7. Se ejecutó un protocolo automatizado de "dilución" en la unidad de procesamiento Sepax® 2. De este modo, a través del movimiento del pistón, el número deseado de células (como se indica en los estudios individuales descritos, por ejemplo, 50 x 10<sup>6</sup>, 100 x 10<sup>6</sup> o 200 x 10<sup>6</sup> células) se transfirió de la bolsa de cultivo a una bolsa de producto en la posición "Bolsa de Salida" mostrada en la FIG. 5 y FIG. 7, a través de la cavidad de la cámara.

Para generar una composición de entrada con células y virus (y, cuando corresponda, aire) para la entrada en la cámara y la transducción, la bolsa de producto que contenía el número deseado de células activadas se conectó de manera estéril en la posición de la Bolsa de Entrada como se muestra en la FIG. 5 y la FIG. 7. La bolsa de centrífuga que contiene las partículas virales, los medios y opcionalmente aire se conectó de manera estéril en la posición de la Bolsa de Diluyente 1 mostrada en las figuras. Se ejecutó un ciclo de lavado automatizado en el Sepax® 2, lo que facilitó la extracción de la composición que contenía las células en la cavidad de la cámara, el giro de la composición en el Sepax® 2 a un RCF aproximado en la pared interna de la cavidad de 500 g para sedimentar las células, y la eliminación del volumen apropiado de líquido requerido para lograr un volumen deseado, por ejemplo, 10 ml. El contenido de la bolsa de centrífuga en la posición de la Bolsa de Diluyente 1, incluyendo las partículas virales, los medios, el policatión y, cuando corresponda, el aire, se introdujo en la cavidad de la cámara con las células. Este proceso efectuó por tanto una reducción de volumen de la composición celular y combinó las células de volumen reducido con la composición que contenía virus y, cuando corresponde, aire. El volumen resultante de 200 ml (que contenía las células, el virus y, opcionalmente, el aire) se transfirió luego a una bolsa de



centrífuga en la posición "Bolsa de Salida" del kit como se muestra en la FIG. 5 y la FIG. 7.

Para iniciar la transducción, la bolsa de centrífuga que contenía 200 ml de virus, células y aire, cuando correspondía, se retiró y se conectó de manera estéril en la posición de la Bolsa de Entrada del kit. Una bolsa que contenía medio completo se conectó de manera estéril al kit en una posición de "Bolsa de Diluyente". Se conectó de manera estéril una bolsa de cultivo celular al sistema en la posición "Bolsa de Salida". El usuario indicó a través de la interfaz que se debe ejecutar un protocolo automatizado en el sistema para iniciar la transducción. Específicamente, el programa provocó la transferencia del volumen de 200 ml que contenía células, virus y, donde se indicó, aire, a través de las líneas de tubos a la cavidad de la cámara mediante el movimiento del pistón. El programa continuó con la centrifugación de los contenidos en la cavidad de la cámara (volumen total 200 ml) a la fuerza indicada, para iniciar la transducción de células con las partículas del vector viral. En algunos casos, se usó un tacómetro láser de mano para verificar revoluciones por minuto (rpm) en varios puntos de ajuste en la unidad Sepax® usando métodos conocidos. Excepto donde se indica específicamente, el centrifugado se llevó a cabo a la velocidad indicada durante 1 hora (3600 s), con tiempo de aceleración y deceleración adicionales. Después del giro y cuando se solicitó por el sistema, el usuario cerró la abrazadera permitiendo el movimiento del fluido entre la cavidad y la Bolsa de Entrada y abrió el movimiento de bloqueo de la abrazadera del fluido entre la cavidad y la bolsa del producto en la posición de la Bolsa de Salida. Tras la entrada del usuario, el programa continuó efectuando el movimiento del líquido desde la cámara a la bolsa de salida.

Cuando correspondía, para la expulsión de aire, cuando lo solicitó el sistema, el usuario abrió el movimiento de bloqueo de la abrazadera de fluido entre la cavidad de la cámara y el filtro, y el programa provocó la extracción de aire a través del filtro.

Luego se ejecutó un programa de dilución en el sistema Sepax® 2, con el movimiento de bloqueo de la abrazadera de fluido entre la bolsa de diluyente con el medio y la cámara abierta y el programa provocando movimiento (al abrir la(s) llave(s) de paso y el movimiento del pistón) de la cantidad adecuada de líquido desde esa bolsa a la cámara, mezclándola durante 60 segundos y luego transfiriendo el fluido desde la cavidad de procesamiento a la bolsa de salida, siendo la cantidad apropiada la necesaria para lograr un Volumen Final definido por el usuario de 200 ml, dada la presencia de aire durante la centrifugación, si lo hay.

La bolsa de cultivo en la posición de Bolsa de Salida contenía de este modo una composición de salida con células que contenían partículas virales unidas y/o inoculadas con el genoma viral. Las células se incubaron luego en la bolsa durante ~24 horas a 37 grados C, 5% de CO<sub>2</sub>, para la finalización de la transducción. Durante el inicio y la finalización de la transducción, las partículas del vector viral inocularon las células y sus genomas se integraron en los genomas celulares, como lo indican las carias medidas para la eficiencia de la transducción y el número de copias en los ejemplos individuales.

#### **Ejemplo 8: Inicio de la transducción en una cámara de centrífuga con volumen constante y número de partículas virales y diferentes concentraciones celulares**

Las composiciones con varios números de células y unidades infecciosas (UI) de partículas virales, en volumen de líquido constante, se sometieron al proceso de transducción descrito en el Ejemplo 7. En cada caso, antes del inicio de la transducción, las células se recogieron, lavaron, aislaron, crioconservaron y activaron como se describe en el Ejemplo 11.

#### **Ejemplo 8A.**

El inicio de la transducción y el cultivo adicional para completar la transducción se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 7, con los siguientes detalles.

En dos condiciones separadas en dos estudios separados, el proceso de inicio de la transducción se llevó a cabo a un volumen de líquido total de 70 ml (el volumen restante de 130 ml de la cavidad durante el giro conteniendo aire). Las condiciones separadas se llevaron a cabo en  $200 \times 10^6$  células y  $100 \times 10^6$  células, respectivamente. Se usó el mismo número total de unidades de partículas de vectores virales que contenían vectores que codifican CAR anti-CD19, dando como resultado 1,8 UI/célula y 3,6 UI/célula para las dos condiciones, respectivamente. Durante el programa de transducción, el giro de 3600 segundos fue a aproximadamente 7400 rpm, correspondiente a un RCF de aproximadamente 1600 g en la pared lateral de la cavidad de procesamiento.

Después de la incubación de ~24 horas, las células se expandieron en un sistema de biorreactor con perfusión. La eficiencia de transducción para las composiciones respectivas se calculó el día 6 como el porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión superficial del CAR codificado, detectado como se describe en el Ejemplo 1, y se comparó con una población de células no transducidas como control ("no transducido"). Los resultados se muestran en la FIG. 8A. Como se muestra, con el mismo volumen total y número total de unidades infecciosas durante la incubación bajo rotación, se observó una mayor eficiencia de transducción para la afección usando un número menor de  $100 \times 10^6$  células en la cavidad durante la incubación.

**Ejemplo 8B.**

En otro estudio, el inicio de la transducción y el cultivo adicional para completar la transducción se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 7, con los siguientes detalles.

En tres condiciones separadas, el proceso de inicio de la transducción se llevó a cabo en un volumen de líquido total de 70 ml (el volumen restante de 130 ml de la cavidad durante el giro conteniendo aire). Las condiciones separadas se llevaron a cabo en  $200 \times 10^6$  células,  $100 \times 10^6$  células y  $50 \times 10^6$  células, respectivamente. Se usó el mismo número total de unidades de partículas de vectores virales que contienen vectores que codifican CAR anti-CD19, que era el número de unidades necesarias para dar como resultado 1,8 UI/célula para la afección con  $200 \times 10^6$  células. Durante el programa de transducción, el giro de 3600 segundos se realizó en el sistema Sepax® 2 a aproximadamente 7400 rpm, correspondiente a un RCF de aproximadamente 1600 g en la pared lateral de la cavidad de procesamiento.

Después de la incubación de ~24 horas, las células se expandieron en un sistema de biorreactor con perfusión. La eficiencia de transducción para las composiciones respectivas se calculó el día 6 como porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión superficial del CAR codificado, detectado como se describe en el Ejemplo 1, y se comparó con una población de células no transducidas como control ("no transducido"). Los resultados se muestran en la FIG. 8B. Como se muestra, con el mismo volumen total y número total de unidades infecciosas durante la incubación bajo rotación, se observó una mayor eficiencia de transducción para la afección usando un número menor de  $100 \times 10^6$  células en la cavidad durante la incubación.

El número de copias del vector (VCN) también se evaluó en células transducidas el día 6, como se describe en el Ejemplo 4, con el VCN medio determinado entre las células transducidas (células que contienen ácido nucleico de vector viral SGF+ en su genoma). También se evaluaron un control celular no transducido ("PD UnTD") y células de control positivo ("Control positivo de 2 copias"). Los resultados se presentan en la FIG. 8C.

**Ejemplo 9: Inicio de la transducción en una cámara de centrifuga con varios volúmenes y unidades de partículas de vectores virales**

Las composiciones con un número creciente de unidades infecciosas (UI) de partículas virales y volúmenes de líquido (con un número constante ( $100 \times 10^6$ ) de células) se sometieron al proceso de transducción descrito en el Ejemplo 7, con los siguientes detalles. En cada caso, antes del inicio de la transducción, las células se recogieron, lavaron, aislaron, crioconservaron y activaron como se describe en el Ejemplo 11.

En el proceso descrito en el Ejemplo 7, la composición que contenía las partículas virales, los medios y el aire que se extrajo de la posición de la Bolsa de Diluyente para combinar con las células a través del protocolo de dilución, incluyó volúmenes de líquido de 60, 90 y 120 ml, respectivamente, para las diferentes condiciones (con la composición que contiene 10 ml de células, lo que da como resultado un volumen de líquido de 70, 100 y 130 ml, respectivamente, para las condiciones individuales), con el resto del volumen total de 200 ml introducido en la cámara para girar estando compuesto de aire. Cada uno de estos volúmenes de líquido incluía  $6 \times 10^6$  IU partículas de vector viral por ml de volumen de líquido, dando como resultado un aumento de IU e IU/célula para cada condición. La velocidad para el giro de 3600 segundos se realizó a aproximadamente 7400 rpm, correspondiente a un RCF de aproximadamente 1600 g en la pared interna de la cavidad en la unidad Sepax®. También se usó un control no transducido ("simulado").

Después de la incubación de ~24 horas, las células se expandieron en un sistema de biorreactor con perfusión. La eficiencia de transducción para las composiciones respectivas se calculó el día 6 como porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión superficial del CAR codificado, detectado como se describe en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la FIG. 9A. Como se muestra, para la misma cantidad de células, una cantidad creciente de virus con el correspondiente aumento de volumen dio como resultado una mayor eficiencia de transducción en este estudio.

El número medio de copias del vector (VCN) por célula transducida (células que expresan el transgén) también se determinó en el día 6 para cada condición por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) como se describe en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la FIG. 9B.

**Ejemplo 10: Efecto del tiempo de centrifugación sobre la eficiencia de transducción usando una cámara de centrifuga**

$100 \times 10^6$  células se sometieron a transducción como se describe en el Ejemplo 7, con varias duraciones usadas para la incubación bajo centrifugación. Específicamente, el volumen total de líquido usado para la centrifugación en la cavidad de procesamiento de la cámara fue de 70 ml (con los 130 ml restantes del volumen total de 200 ml compuestos de aire). Las partículas del vector viral que contienen un vector que codifica un CAR anti-

CD19 se incluyeron en este volumen a una proporción de 3,6 UI/célula. En cada caso, antes del inicio de la transducción, las células se recogieron, lavaron, aislaron, crioconservaron y activaron como se describe en el Ejemplo 11.

5 El giro para el inicio de la transducción se llevó a cabo a aproximadamente 7400 rpm, que corresponde a una fuerza centrífuga relativa de aproximadamente 1600 g sobre la pared lateral interna de la cámara de procesamiento. La duración del giro a esta velocidad fue de 10 minutos para una condición y de 60 minutos para la otra.

10 Después de la incubación de ~24 horas, las células se expandieron en un sistema de biorreactor con perfusión. La eficiencia de transducción para las composiciones respectivas se calculó el día 6 como porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> con expresión superficial de la CAR codificada detectada como se describe en el Ejemplo 1. También se evaluó un control no transducido ("no transducido"). Los resultados se muestran en la FIG. 10. Como se muestra, en este estudio, se observó una mayor eficiencia de transducción después del inicio de la transducción de  $100 \times 10^6$  células en la cavidad de procesamiento de la cámara de centrifuga bajo centrifugación durante 60 minutos en comparación con 10 minutos.

### **Ejemplo 11: Preparación de células modificadas genéticamente**

20 Este ejemplo describe un proceso ejemplar que se ha llevado a cabo para preparar, a partir de una muestra biológica, células T modificadas genéticamente transducidas con un ácido nucleico codificado por un vector viral, de acuerdo con ciertos casos proporcionados en la presente. Como se describe en ejemplos individuales, antes de los pasos de transducción llevados a cabo en los estudios descritos en varios ejemplos en la presente, se llevaron a cabo algunos de los pasos de este proceso, por ejemplo, pasos de recogida, lavado, crioconservación, selección y activación, como se describe en este ejemplo.

25 Se llevaron a cabo varios pasos del proceso dentro de la cavidad de procesamiento de una cámara de centrifuga que tiene una pared lateral rígida, generalmente cilíndrica, y un pistón capaz de moverse dentro de la cámara para variar el volumen de la cavidad (la cavidad de procesamiento de una cámara de centrifuga Sepax® contenida dentro de un kit de un solo uso). Específicamente, los pasos realizados en la cámara incluyeron lavado celular, dilución/intercambio de tampones, pasos para la selección basada en afinidad (por ejemplo, incubación con agentes de unión inmunoespecíficos), inicio de la transducción, formulación y pasos para la activación/expansión (por ejemplo, incubación con agente(s) estimulador(es)).

#### **35 1. Recogida de muestras y leucaféresis**

Se obtuvo una muestra de leucaféresis humana enriquecida en células mononucleares de una muestra de sangre completa de un sujeto usando un sistema de recogida de leucaféresis. La muestra de leucaféresis se almacenó sellada a 2-8° C, durante no más de aproximadamente 48 horas.

#### **40 2. Lavado de leucaféresis**

45 La muestra de leucaféresis se transfirió de manera estéril a un paquete de transferencia. Las células de la muestra de leucaféresis se lavaron y se volvieron a suspender en un tampón para usar en la selección basada en afinidad, el tampón conteniendo PBS, EDTA y albúmina de suero humano. El lavado se realizó dentro de un kit desechable estéril de un solo uso vendido por Biosafe SA para su uso en medicina regenerativa, que incluía una cámara de centrifuga (1), esencialmente como se muestra en la FIG. 7. El paquete de transferencia que contenía las células y una bolsa que contenía el tampón ese conectaron de manera estéril al kit, que fue colocado en asociación con una unidad de procesamiento SEPAX® 2. El lavado y la resuspensión se llevaron a cabo usando un protocolo de lavado de células estándar en la unidad, con las células retenidas en la cavidad de procesamiento (7) de la cámara de centrifuga al final del protocolo, para la incubación posterior con reactivos para la selección basada en afinidad (ver 3).

#### **55 3. Selección basada en afinidad**

60 Para la selección basada en inmunofinidad positiva de células T, se continuó el mismo programa automatizado para incubar las células lavadas en el tampón de selección con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos monoclonales específicos para CD4 y CD8. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente en la misma cámara de centrifuga (1) en la que se retuvieron las células después del lavado (ver 2) descrito anteriormente. Específicamente, las perlas se mezclaron en tampón de selección en un paquete de transferencia, que luego se conectó de manera estéril en una posición de Bolsa de Diluyente del kit de un solo uso usado para el paso de lavado. Se ejecutó un programa en la unidad Sepax® 2 que provocó que la mezcla de perlas y el tampón de selección se introdujeran en la cámara con las células lavadas, y el contenido de la cámara (volumen total de líquido 100 ml) se mezcló durante 30 minutos, mediante un proceso semicontinuo. La mezcla se llevó a cabo a intervalos repetidos, cada uno incluyendo una centrifugación de duración corta (aproximadamente 1 segundo) a baja velocidad

(aproximadamente 1700 rpm), seguido por un corto periodo de reposo (aproximadamente 6 segundos).

Al final del programa, la unidad Sepax® 2 provocó la sedimentación de las células y la expulsión del exceso de tampón/perlas en una bolsa en la posición de Bolsa de Residuos, lavado de las células sedimentadas y resuspensión en el tampón de selección. El lavado se llevó a cabo en el Sepax® a un RCF en la pared interna de la cavidad de aproximadamente 200 g, durante 180 segundos. El programa provocó que las células lavadas se recogieran en un paquete de transferencia colocado en la posición de la bolsa de salida en el kit ejemplar que se muestra en la FIG. 7, cuyo contenido podría transferirse a través de líneas de tubos a una columna para separación magnética, dentro de un sistema cerrado. Por tanto, el lavado celular y la incubación con el reactivo de selección basado en afinidad se llevó a cabo completamente dentro del mismo sistema estéril cerrado, pasando líquido y células hacia y desde la cavidad de la cámara de centrifuga. La capacidad de controlar y ajustar volúmenes de líquido y mezclar las células bajo rotación en la cámara permitió usar sustancialmente menos reactivo de selección por célula procesada en comparación con la incubación en un tubo con agitación o rotación.

Luego, las células se pasaron del paquete de transferencia, a través de un sistema cerrado y estéril de líneas de tubos y una columna de separación, en presencia de un campo magnético usando métodos estándar, para separar las células que se habían unido a reactivos específicos de CD4 y/o CD8. Estas células marcadas magnéticamente se recogieron en un paquete de transferencia para procesamiento adicional.

#### 4. Crioconservación

El paquete de transferencia con las células seleccionadas marcadas se conectó de manera estéril a un kit desechable de un solo uso vendido por Biosafe AS para medicina regenerativa para su uso con el sistema Sepax® 2. El kit era esencialmente como se muestra en la FIG. 7, excepto que dos puertos, a diferencia de uno, estaban presentes en la posición a la que está unida la Bolsa de Salida en el sistema ejemplar mostrado en la FIG. 7, con una bolsa colectora conectada de manera estéril en cada puerto; dos puertos, en oposición a uno, estaban presentes en la posición a la que se conecta la bolsa de entrada en la FIG. 7; y un único puerto, en oposición a dos, estaban presentes en la posición de las Bolsas de Diluyente 1 y 2 en la FIG. 7. Se realizó un ciclo de lavado estándar en la unidad Sepax® 2 para reducir el volumen de las células lavadas. Se conectó de manera estéril una bolsa con criomedio al kit y se ejecutó un protocolo de dilución dos veces para transferir el criomedio a la composición celular y expulsar la composición resultante a las dos bolsas de crioconservación de salida. Las células en las bolsas de crioconservación se crioconservaron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso posterior.

#### 5. Descongelación y activación

Se descongelaron las células crioconservadas. Las células descongeladas se activaron usando un reactivo(s) anti CD3/CD28, generalmente a 37° C, durante un período de tiempo como se indica para estudios individuales. Antes de la incubación con el reactivo, las células se lavaron y se volvieron a suspender en medio completo usando el sistema Sepax® 2, usando un programa de lavado celular estándar y en un kit esencialmente como se muestra en la FIG. 7. En el mismo kit, las células se combinaron con el reactivo(s) anti-CD3/28 en la cavidad de la cámara mediante la mezcla con intervalos de centrifugación a baja velocidad y reposo como se describe para la incubación de perlas para selección durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, el material incubado se transfirió a través de la unidad Sepax® 2 a una bolsa de cultivo celular de salida, que luego se incubó a 37° C durante el resto del período de activación.

#### 6. Transducción

La transducción se llevó a cabo en la cámara de centrifuga integral al kit, colocada en asociación con la unidad de procesamiento Sepax®, como se describe en el Ejemplo 7, con detalles específicos dados en ejemplos particulares.

#### 7. Expansión

En algunos casos, después de la transducción, las células se incubaron adicionalmente, generalmente a 37 grados C, para permitir la expansión.

#### 8. Lavado, formulación

En algunos casos, las células expandidas y/o transducidas se lavaron, diluyeron y/o formularon adicionalmente para pruebas, almacenamiento y/o administración. En algunos ejemplos, las células expandidas y/o transducidas se lavaron en la cámara integral a un kit de un solo uso para su uso con el sistema Sepax® 2, por ejemplo, como se describe para la crioconservación. En algunos casos, una bolsa que contenía células lavadas se conectó de manera estéril a un kit tal como se muestra en la FIG. 7, o un kit de este tipo con una pluralidad de puertos disponibles para la conexión de recipientes, por ejemplo, bolsas, en la posición de la Bolsa de Salida que se muestra en la FIG. 7.

Un ejemplo de dicho kit de salida de múltiples puertos se muestra en la FIG. 11, que muestra una pluralidad de puertos (17), a uno o más de los cuales puede conectarse un recipiente, como una bolsa, para la recogida de la composición de salida. La conexión puede ser mediante soldadura estéril del número deseado de recipientes, dependiendo por ejemplo, del número deseado de formas de dosificación unitarias de las células para producir mediante un método dado. Para generar el kit mostrado en la FIG. 11, un colector de tubos multidireccional con una pluralidad de puertos (en el ejemplo mostrado en la FIG. 11, ocho) se soldó de manera estéril a una línea de salida de un kit de un solo uso vendido por Biosafe AS para su uso en medicina regenerativa. Un número deseado de pluralidad de bolsas de salida se conectó de manera estéril a uno o más, generalmente dos o más, de estos puertos. En algunos ejemplos, tales bolsas se unieron a menos de todos los puertos. Se colocaron abrazaderas (5) en las líneas de tubos evitando el movimiento del fluido en las bolsas individuales hasta que se deseó. Una bolsa que contenía el líquido deseado, como formulación, ensayo y/o medio de crioconservación, se conectó de manera estéril al kit y se ejecutó un protocolo de dilución en la unidad Sepax® 2 una pluralidad de veces, con el usuario abriendo y cerrando las abrazaderas respectivas llevando al número apropiado de bolsas, generando de este modo una composición de salida en la formulación deseada, dividida en el número deseado de bolsas. En algunos casos, se recogió una única dosis unitaria de células en cada una de las bolsas consideradas, en una formulación para administración a un sujeto, como el sujeto del que se deriva el producto de la leucaféresis.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de transducción, que comprende incubar, en una cavidad interna de una cámara de centrífuga, una composición de entrada que comprende células y partículas virales que contienen un vector recombinante, en donde:

la cámara de centrífuga comprende:

una pared final, una pared lateral sustancialmente rígida que se extiende desde dicha pared final, y por lo menos una abertura, en donde por lo menos una parte de dicha pared lateral rodea dicha cavidad interna y dicha por lo menos una abertura es capaz de permitir la entrada de líquido en dicha cavidad interna y la extracción de líquido de dicha cavidad; y  
 un miembro móvil capaz de moverse dentro de la cámara para variar el volumen interno de la cavidad interna, por lo que la cavidad interna es una cavidad de volumen variable definida por dicha pared final, dicha pared lateral sustancialmente rígida, y dicho miembro móvil; y

la cámara de centrífuga es rotatoria alrededor de un eje de rotación y rota alrededor de dicho eje de rotación durante por lo menos una parte de la incubación; y  
 el método genera una composición de salida que comprende una pluralidad de células transducidas con el vector viral.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha rotación comprende rotación a una fuerza centrífuga relativa en una superficie interna de la pared lateral de la cavidad y/o en una capa superficial de las células que es de por lo menos o aproximadamente 600 g, 1000 g, o 1600 g.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde:

el volumen de líquido medio de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad durante dicha incubación no es de más de aproximadamente 5 mililitros (ml) por pulgada cuadrada (por 6,4516 cm cuadrados) del área de superficie interna de la cavidad durante dicha incubación;  
 el volumen de líquido máximo de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad en cualquier momento durante dicha incubación no es de más de aproximadamente 5 ml por pulgada cuadrada (por 6,4516 cm cuadrados) del área de superficie interna máxima de la cavidad;  
 el volumen de líquido máximo de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad durante dicha incubación no es de más de aproximadamente 2,5 mililitros (ml) por pulgada cuadrada (por 6,4516 cm cuadrados) del área de superficie interna de la cavidad durante dicha incubación; o  
 el volumen de líquido máximo de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad en cualquier momento durante dicha incubación no es de más de aproximadamente 2,5 ml por pulgada cuadrada (por 6,4516 cm cuadrados) del área de superficie interna máxima de la cavidad.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:

el número de dichas células en dicha composición de entrada es de o aproximadamente del número de dichas células suficientes para formar una monocapa sobre la superficie de dicha cavidad durante la rotación de dicha cámara de centrífuga a una fuerza de o aproximadamente 1000 g o de o aproximadamente 2000 g en una superficie interna de dicha pared lateral y/o capa superficial de las células; y/o  
 el número de dichas células en dicha composición de entrada no es de más de 1,5 veces o 2 veces el número de dichas células suficiente para formar una monocapa sobre la superficie de dicha cavidad durante la rotación de dicha cámara centrífuga a una fuerza de o aproximadamente 1000 g o de o aproximadamente 2000 g en una superficie interna de dicha pared lateral y/o en una capa de superficie de las células; y/o  
 la composición de entrada en la cavidad comprende por lo menos o aproximadamente  $1 \times 10^6$  de dichas células,  $5 \times 10^6$  de dichas células,  $1 \times 10^7$  de dichas células o  $1 \times 10^8$  de dichas células; y/o  
 la composición de entrada comprende por lo menos o aproximadamente 1 unidad infecciosa (IU) de partículas virales por una de dichas células.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde:

el volumen de líquido total máximo de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad en cualquier momento durante dicha incubación no es de más de 2 veces, no más de 10 veces, o no más de 100 veces, el volumen total de dichas células en dicha cavidad o el volumen medio de la composición de entrada a lo largo del curso de la incubación no es de más de 2, 10, o 100 veces el volumen total de las células en la cavidad; o  
 el volumen de líquido en la composición de entrada no es de más de 20ml, no más de 40 ml, o no más de 100 ml o no más de 200 ml.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde durante por lo menos una parte de la incubación en

la cámara o durante la rotación de la cámara, el volumen de líquido de la composición de entrada ocupa solo una parte del volumen de la cavidad interna de la cámara, el volumen de la cavidad durante dicha por lo menos una parte o durante dicha rotación comprende además un gas, dicho gas introducido en dicha cavidad a través de dicha por lo menos una abertura, antes o durante dicha incubación.

5  
7. El método de la reivindicación 6, en donde la entrada de gas en la cámara de centrífuga efectúa el movimiento del miembro móvil para aumentar el volumen de la cavidad interna de la cámara, disminuyendo de este modo el volumen de líquido total de dicha composición de entrada presente en dicha cavidad durante la rotación de dicha cámara de centrífuga por pulgada cuadrada (por 6,4516 cm cuadrados) del área de superficie interna de la cavidad en comparación con la ausencia de gas en la cámara.

10  
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde:

15 la cavidad interna de la cámara de centrífuga tiene un área de superficie interna de por lo menos o aproximadamente  $1 \times 10^9 \mu\text{m}^2$  o por lo menos  $1 \times 10^{10} \mu\text{m}^2$ ;  
el número de células en la composición de entrada es de por lo menos  $1 \times 10^7$  células, y las partículas virales están presentes en la composición de entrada a aproximadamente o por lo menos 1 unidad infecciosa (IU) por una de dichas células;  
20 la composición de entrada comprende un volumen de líquido que es menor que el volumen máximo de la cavidad interna de la cámara de centrífuga y  
la cavidad interna comprende gas a un volumen que es hasta el resto del volumen máximo de la cavidad interna de la cámara de centrífuga.

25  
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde una parte adicional de la incubación se lleva a cabo fuera de la cámara de centrífuga y/o sin rotación, dicha parte adicional llevada a cabo después de la por lo menos una parte llevada a cabo en la cámara y/o con rotación; y opcionalmente en donde la incubación y/o la parte adicional de la incubación se lleva a cabo durante un tiempo que no es de más de 24 horas, las células en la composición de entrada no se han sometido a una temperatura de más de 30° C durante más de 24 horas, y/o la incubación y/o la parte adicional de la incubación no se realiza en presencia de un agente de estimulación.

30  
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde:

35 la composición de salida que contiene las células transducidas comprende por lo menos o aproximadamente  $1 \times 10^7$  células o por lo menos o aproximadamente  $5 \times 10^7$  células;  
para una composición de entrada que comprende un virus a una proporción de aproximadamente 1 o aproximadamente 2 IU por células, dicho método es capaz de producir una composición de salida en la que por lo menos el 10%, por lo menos el 25%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, o por lo menos el 75% de las células en dicha composición de salida generada por el método comprenden dicho vector viral recombinante y/o expresan un producto de un ácido nucleico recombinante comprendido dentro de dicho vector; o  
40 entre las células en dicha composición de salida que contienen el vector viral recombinante o en las que está integrado el vector viral recombinante, el número de copias medio de dicho vector viral recombinante no es de más de aproximadamente 10, no más de aproximadamente 5, no más de aproximadamente 2,5, o no más de aproximadamente 1,5; o entre las células en la composición de salida, el número de copias medio de dicho vector no es de más de aproximadamente 2, no más de aproximadamente 1,5, o no más de aproximadamente 1.

45  
50  
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la cámara centrífuga es integral a un sistema cerrado, dicho sistema cerrado comprendiendo:

55 dicha cámara y por lo menos una línea de tubos conectada operativamente con la por lo menos una salida a través de un conector, por lo que se permite que el líquido y el gas se muevan entre dicha cavidad y dicha por lo menos una línea de tubos en por lo menos una configuración de dicho sistema; y  
opcionalmente, en donde:

60 dicha por lo menos una línea de tubos comprende una serie de líneas de tubos;  
dicho por lo menos un conector comprende una pluralidad de conectores; y  
dicho sistema cerrado comprende además por lo menos un recipiente conectado operativamente con la serie de líneas de tubos, la conexión permitiendo que el líquido y/o el gas pases entre dicho por lo menos un recipiente y dicha por lo menos una abertura a través de una serie de líneas de tubos, y  
65 opcionalmente en donde dicho por lo menos un recipiente comprende por lo menos un recipiente de entrada que comprende dichas partículas de vector viral y dichas células; un recipiente de residuos, un recipiente de producto, y por lo menos un recipiente de diluyente, cada uno conectado a dicha cavidad a través de dicha serie de líneas de tubos y dicha por lo menos una abertura.

12. El método de la reivindicación 11 en donde dicho método comprende además:

antes de y/o durante dicha incubación, efectuar la entrada de dicha composición de entrada en dicha cavidad, dicha entrada comprendiendo hacer fluir líquido desde dicho por lo menos un recipiente de entrada en dicha cavidad a través de dicha por lo menos una abertura; y  
 opcionalmente en donde por lo menos un recipiente comprende además un recipiente que comprende un gas antes de y /o durante por lo menos un punto durante dicha incubación y/o el sistema cerrado comprende además un filtro microbiano capaz de introducir gas en la cavidad interna de la cámara de centrifuga; y/o el sistema cerrado contiene un puerto de jeringuilla para efectuar la entrada de gas; en donde opcionalmente, antes de y/o durante dicha incubación, proporcionar o efectuar la entrada de gas en dicha cavidad bajo condiciones estériles, dicha introducción siendo efectuada por (a) un flujo de gas desde el recipiente que comprende gas, (b) flujo de gas desde un entorno externo al sistema cerrado, a través de un filtro microbiano, o (c) flujo de gas desde la jeringuilla conectada al sistema en el puerto de la jeringuilla.

13. El método de las reivindicaciones 6-12, en donde el gas es aire.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde:

(a) la incubación es parte de un proceso continuo, el método comprendiendo además:

durante por lo menos una parte de dicha incubación, efectuar la entrada continua de dicha composición de entrada, y opcionalmente gas, en dicha cavidad durante la rotación de la cámara; y durante una parte de dicha incubación, efectuar la extracción continua de líquido, y opcionalmente gas, de dicha cavidad a través de dicha por lo menos una abertura durante la rotación de la cámara; o

(b) la incubación es parte de un proceso semicontinuo, el método comprendiendo además:

antes de dicha incubación, efectuar la entrada de dicha composición de entrada, y opcionalmente gas, en dicha cavidad a través de dicha por lo menos una abertura; posteriormente a dicha incubación, efectuar la extracción de líquido y/o opcionalmente gas de dicha cavidad; efectuar la entrada de otra composición de entrada que comprende células y dichas partículas virales que contienen un vector viral recombinante, y opcionalmente gas, en dicha cavidad interna; y incubar dicha otra composición de entrada en dicha cavidad interna, en donde el método genera otra composición de salida que comprende una pluralidad de células de otra composición de entrada que están transducidas con dicho vector viral.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en donde el método comprende además:

efectuar la rotación de dicha cámara centrifuga antes de y/o durante dicha incubación; efectuar la extracción de líquido de dicha cavidad en un recipiente de residuos después de dicha incubación; efectuar la extracción de líquido de por lo menos un recipiente de diluyente en dicha cavidad a través de dicha por lo menos una abertura y efectuar la mezcla de los contenidos de dicha cavidad; y efectuar la extracción de líquido de dicha cavidad en un recipiente de producto, transfiriendo de este modo las células transducidas con el vector viral en dicho recipiente de producto.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además:

(a) lavar una muestra biológica que comprende dichas células en una cavidad interna de una cámara de centrifuga antes de dicha incubación; y/o  
 (b) aislar dichas células de una muestra biológica, en donde por lo menos una parte del paso de aislamiento se realiza en una cavidad interna de una cámara centrifuga antes de dicha incubación; y/o  
 (c) estimular las células antes de y/o durante dicha incubación, dicha estimulación comprendiendo exponer dichas células a condiciones de estimulación, induciendo de este modo a las células de la composición de entrada a que proliferen, en donde por lo menos una parte del paso de estimular las células se realiza en una cavidad interna de una cámara de centrifuga y/o  
 (d) formular células transducidas por el método en un tampón farmacéuticamente aceptable en una cavidad interna de una cámara centrifuga, produciendo de este modo una composición formulada, opcionalmente efectuando la extracción de la composición formulada a uno o una pluralidad de recipientes.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde:

dichas células en dicha composición de entrada comprenden células en suspensión; dichas células en dicha composición de entrada comprenden glóbulos blancos; y/o dichas células en dicha composición de entrada comprenden células T o células NK.



18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la cámara de centrífuga está localizada dentro de una centrífuga y está asociada con un sensor, dicho sensor capaz de monitorizar la posición de dicho miembro móvil, y circuitos de control capaces de recibir y transmitir información desde dicho sensor y provocar el movimiento de dicho miembro móvil, la entrada y la extracción de líquido y/o gas hacia y desde dicha cavidad a través de dichas una o más líneas de tubos, y la rotación de dicha cámara a través de dicha centrífuga.

5

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde dicho vector viral recombinante codifica un receptor recombinante, que es expresado de este modo por las células de la composición de salida.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

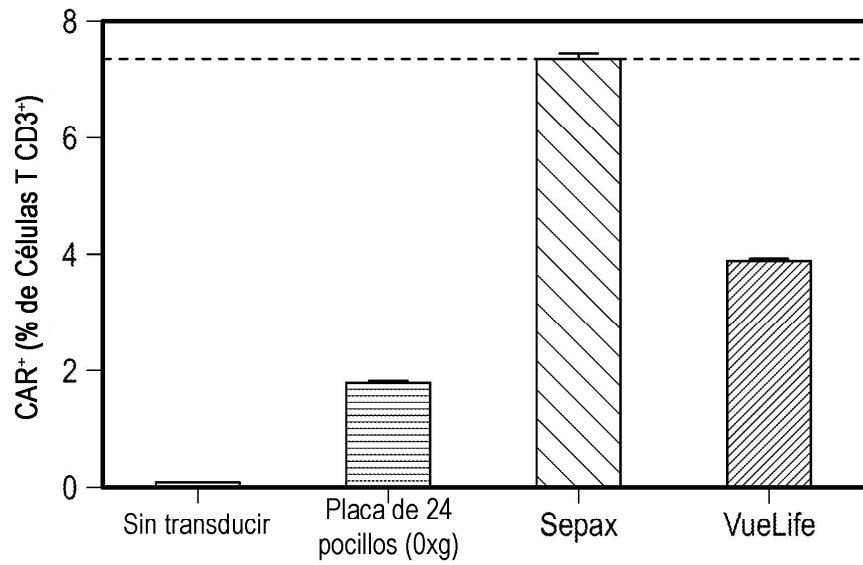


FIG. 1A

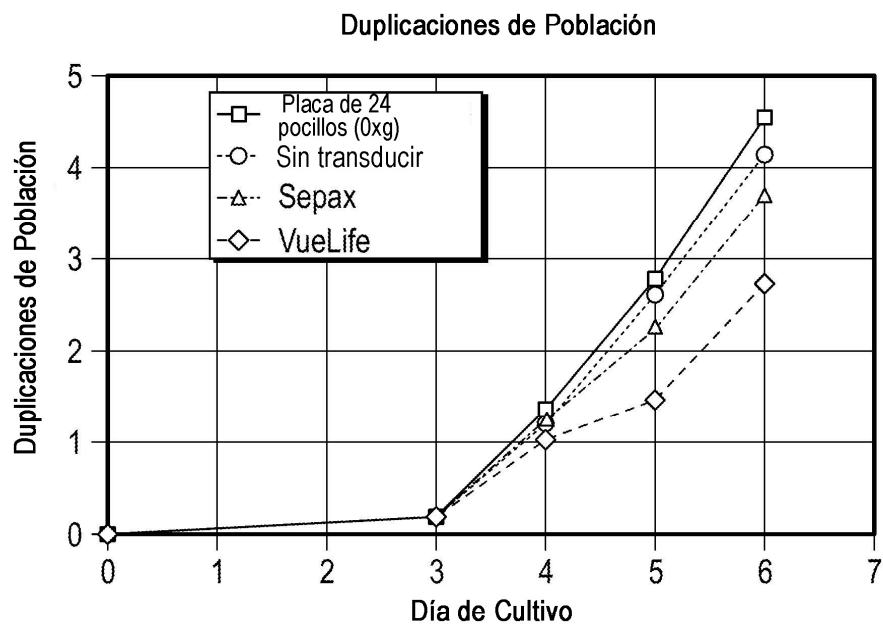


FIG. 1B

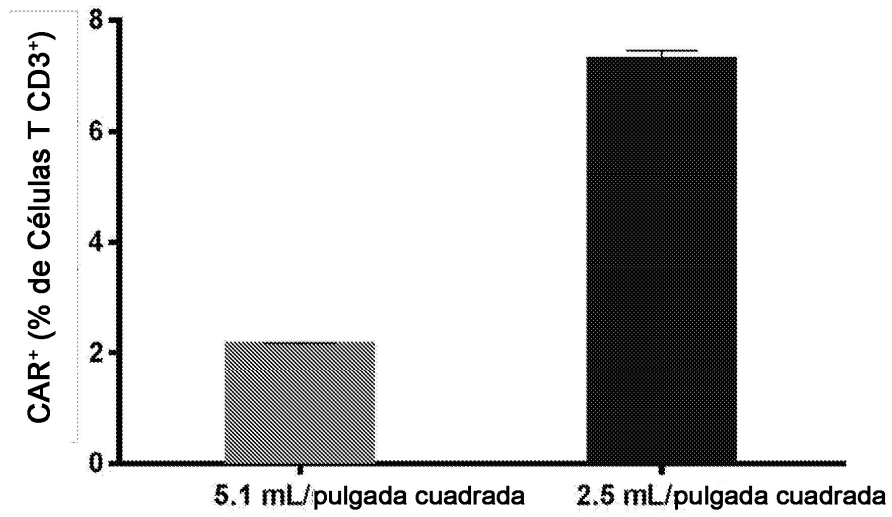


FIG. 2

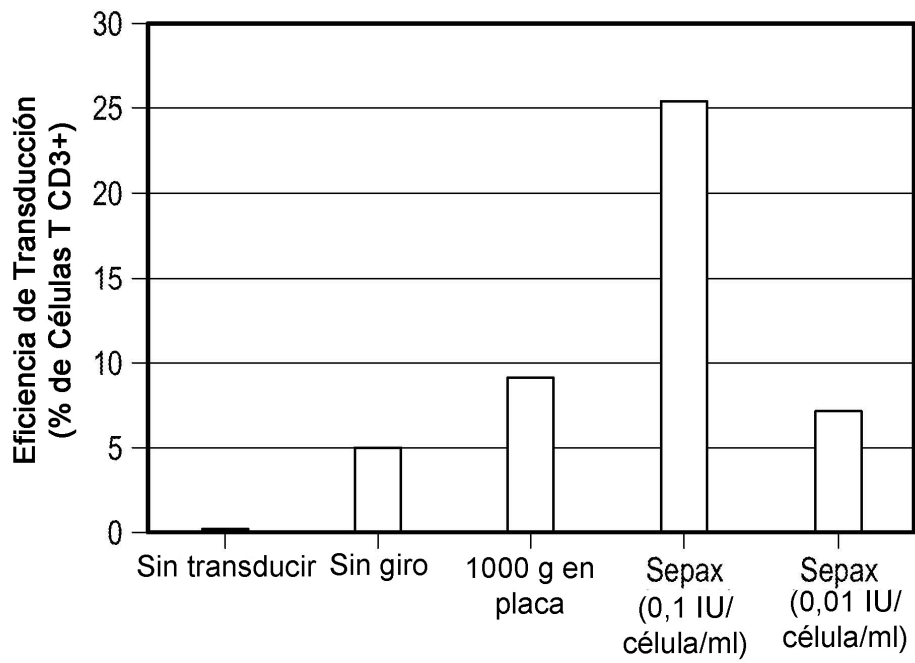


FIG. 3

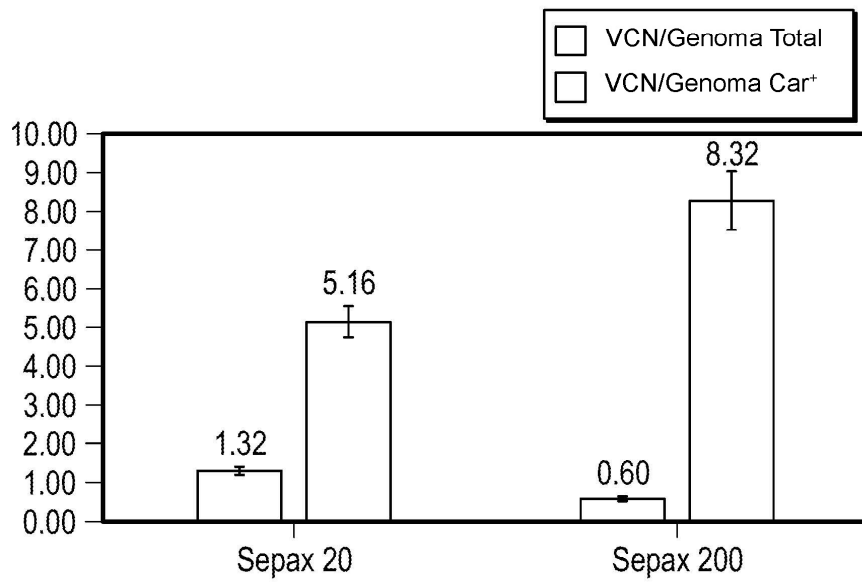


FIG. 4

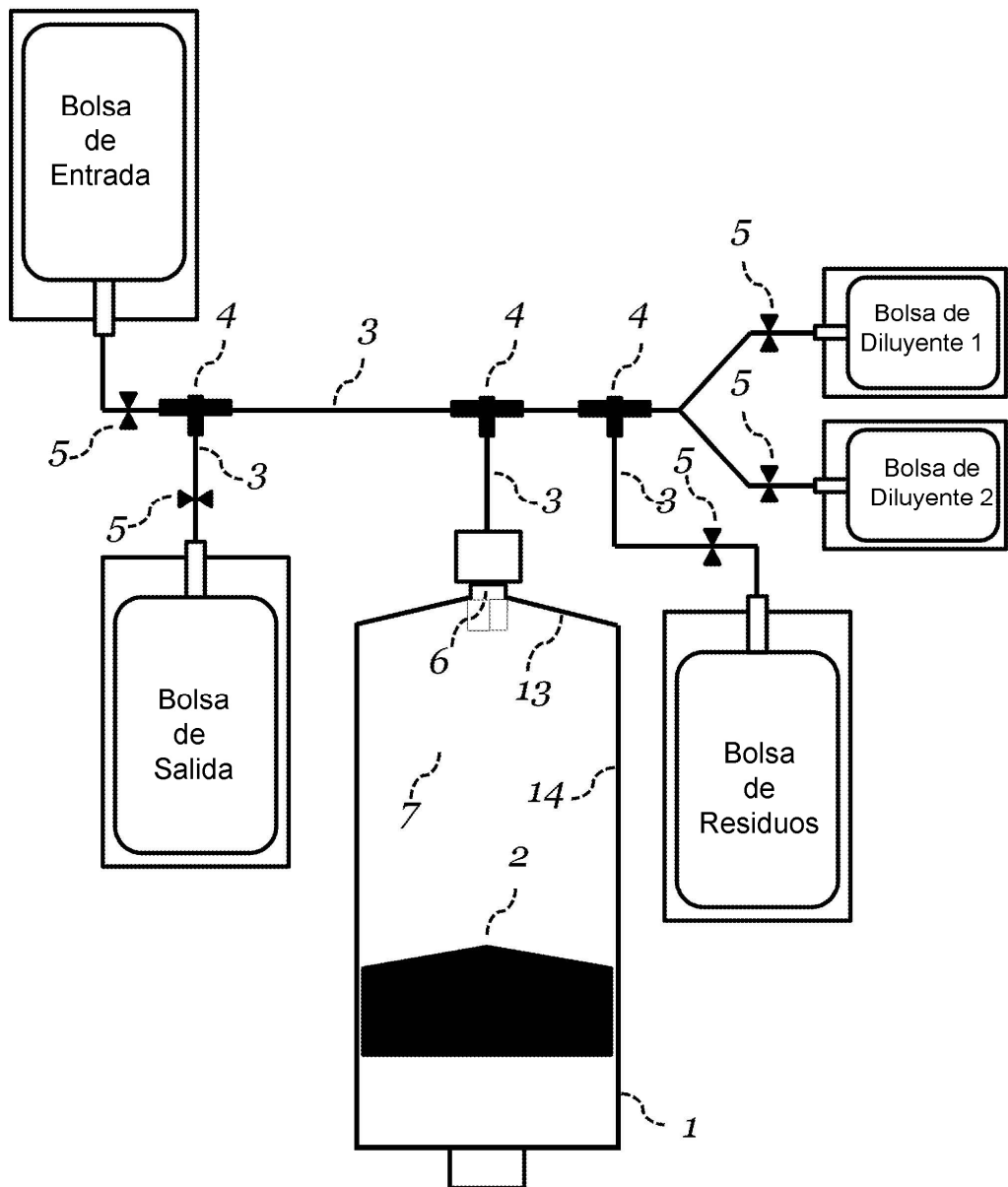


FIG. 5

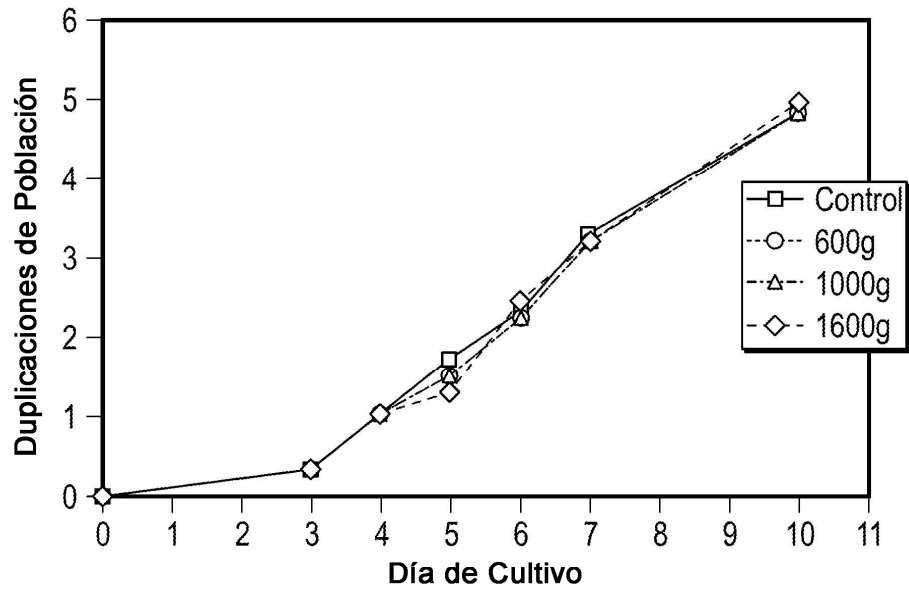


FIG. 6A

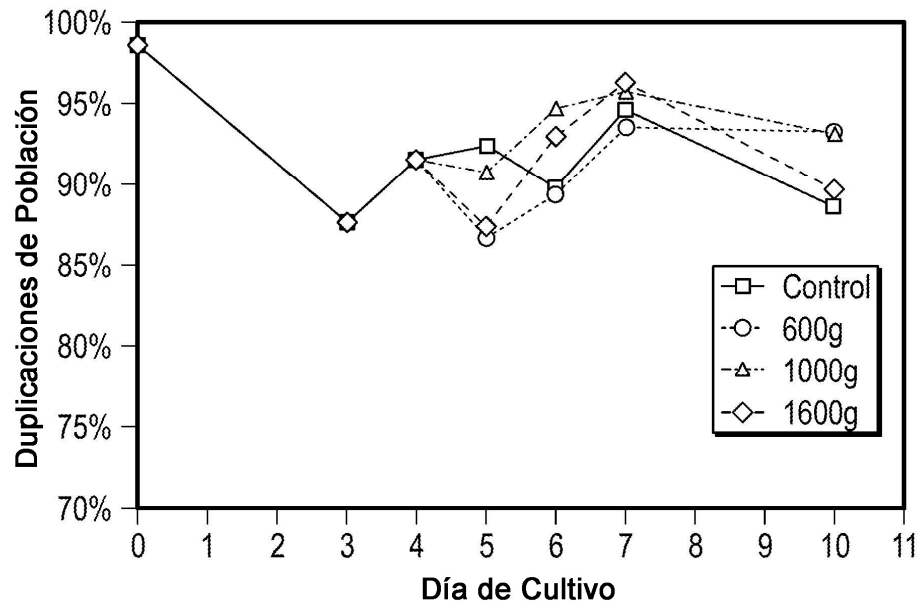


FIG. 6B



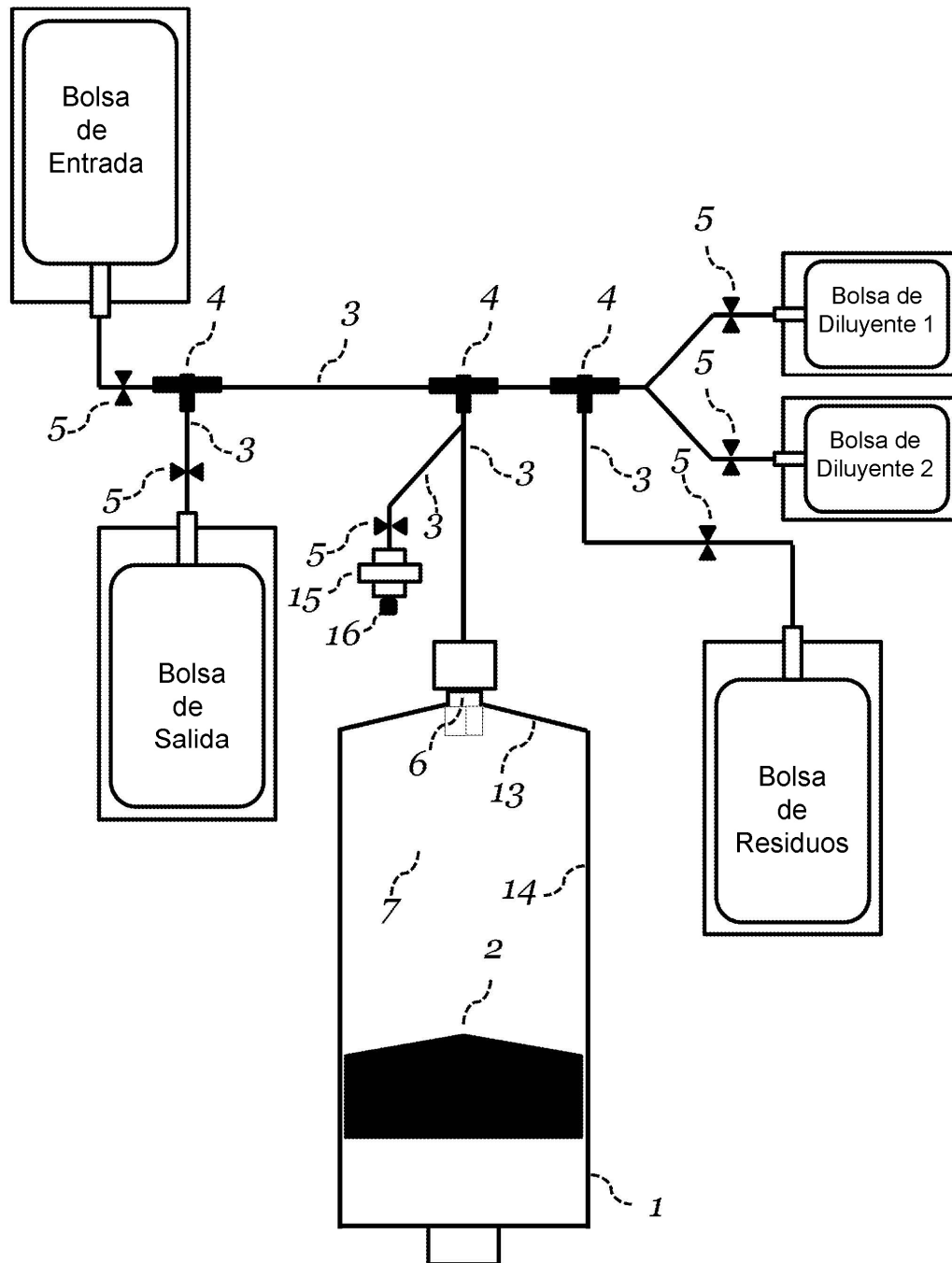


FIG. 7

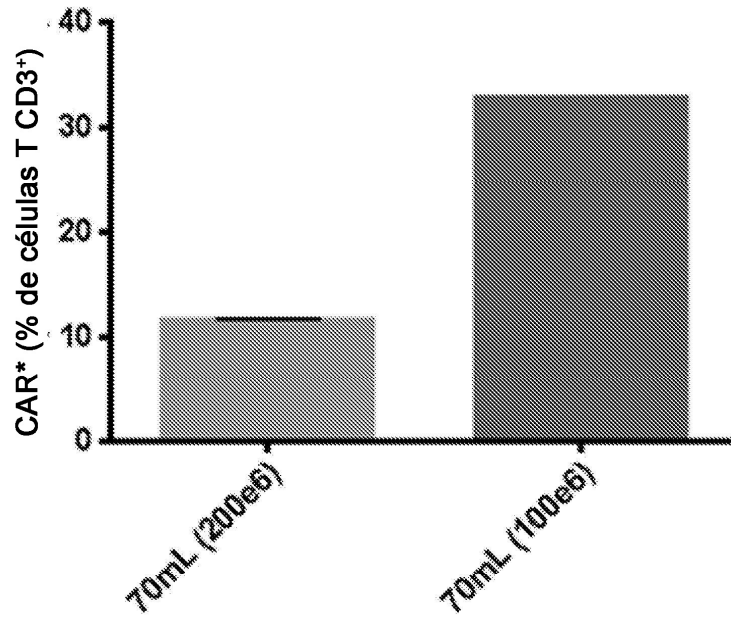


FIG. 8A

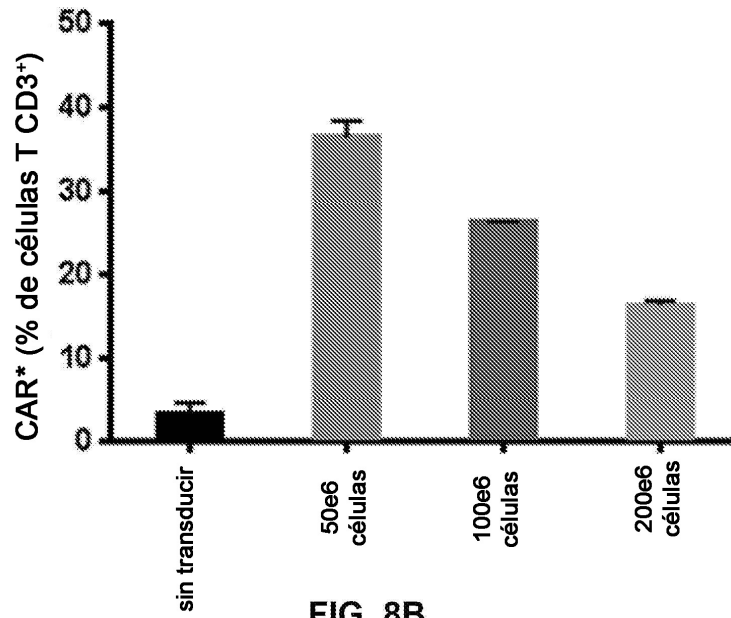
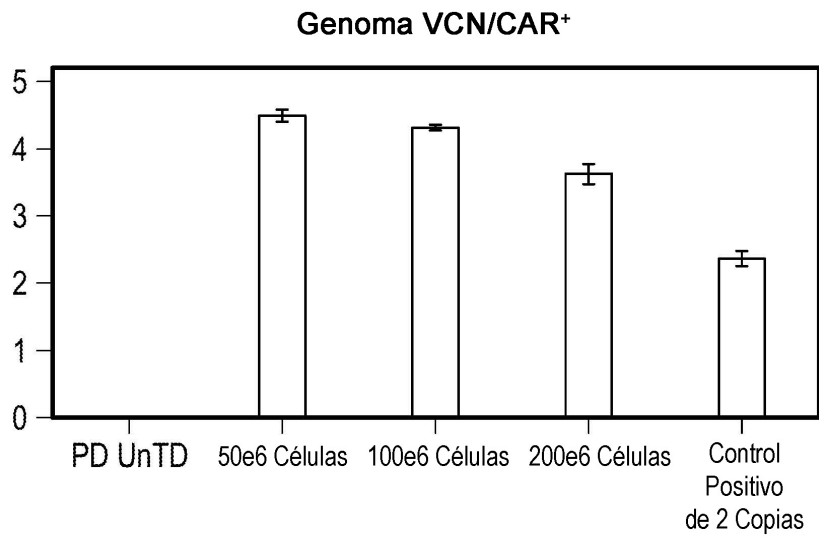


FIG. 8B



**FIG. 8C**

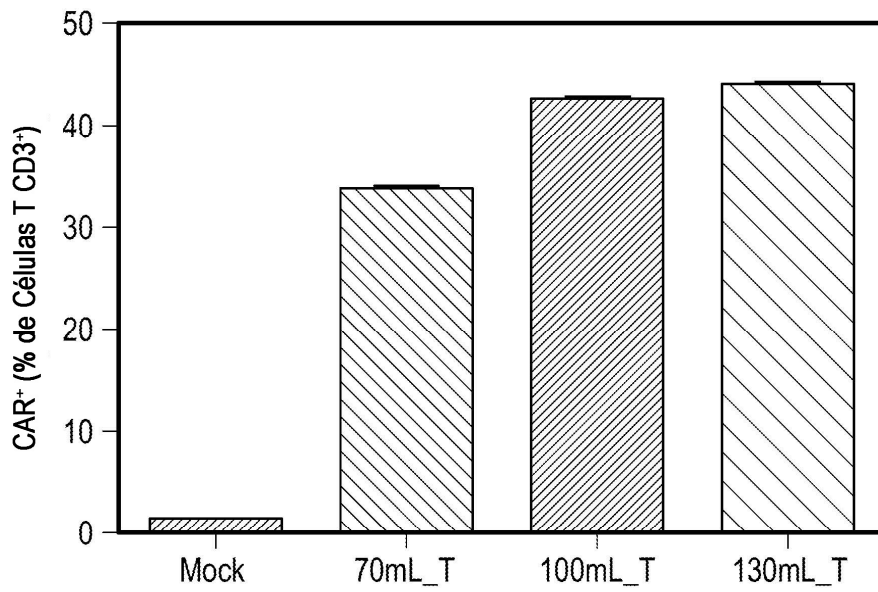


FIG. 9A

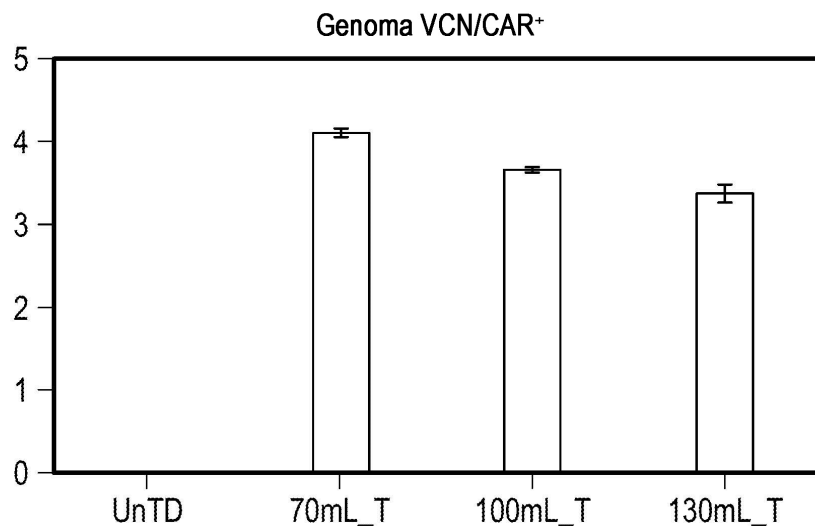


FIG. 9B

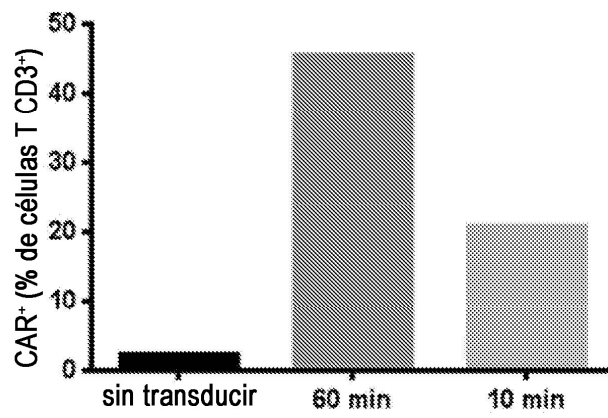


FIG. 10

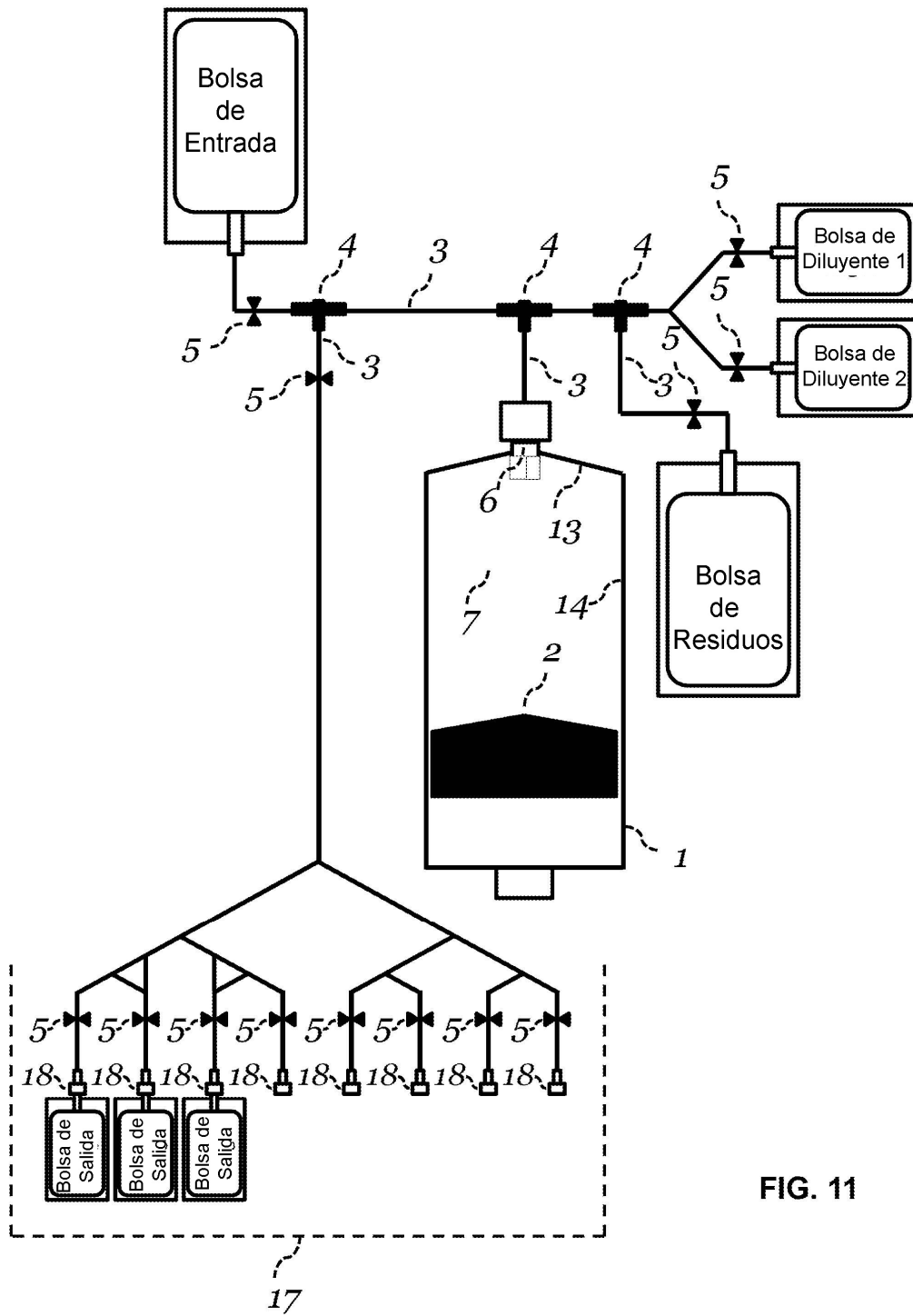


FIG. 11