

EI58977R/EX7802R

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo n. 3102609

a nome di:

The United States of America, as Represented by The Secretary, Department of Health and Human Services

Kite Pharma, Inc.

**“Metodi per produrre cellule T autologhe utili per trattare malignità a cellule B e altri cancro e loro  
composizioni”**

## **DESCRIZIONE**

### **DICHIARAZIONE DI INTERESSE GOVERNATIVO**

La presente invenzione è stata creata in esecuzione di un Cooperative Research and Development Agreement con il National Cancer Institute (NCI), una agenzia del Department of Health and Human Services. Il governo degli Stati Uniti detiene certi diritti nella presente invenzione.

### **FONDAMENTO**

Il procedimento per produrre cellule T ingegnerizzate autologhe per l'uso nella terapia del cancro è lungo (10-24 giorni), comporta due cicli di trasduzione retrovirale, ed è scarsamente adatto per applicazioni commerciali (vedere Kochenderfer et al., Blood. 2012 119: 2709-2720; Johnson, et al., Blood. 2009; 114(3):535-546). Quindi, può essere desiderabile sviluppare miglioramenti al procedimento di produzione di cellule T per superare queste limitazioni.

### **SOMMARIO**

Viene fornito in questa sede un metodo per produrre cellule T che esprimono un recettore della superficie cellulare che riconosce una parte antigenica specifica sulla superficie di una cellula bersaglio, il metodo comprendendo (a) arricchire una popolazione di linfociti ottenuti da un soggetto donatore; (b) stimolare la popolazione di linfociti con uno o più agenti che stimolano cellule T per produrre una popolazione di cellule T attivate, in cui la stimolazione viene eseguita in un sistema chiuso usando un terreno di coltura privo di siero; (c) trasdurre la popolazione di cellule T attivate con un vettore virale comprendente una molecola di acido nucleico che codifica il recettore della superficie cellulare, usando una trasduzione a ciclo singolo per produrre una popolazione di cellule T trasdotte, in cui la trasduzione viene eseguita in un sistema a sacca chiusa usando terreno di coltura privo di siero, in cui la sacca è rivestita con una proteina fibronectina umana ricombinante o un suo frammento; e (d) espandere la popolazione di cellule T trasdotte per un tempo predeterminato per produrre una popolazione di cellule T ingegnerizzate, in cui l'espansione viene eseguita in un sistema chiuso usando un terreno di coltura privo di siero. In certe realizzazioni, il recettore della superficie cellulare può essere un recettore di cellule T (TCR) o un recettore antigenico chimerico (CAR). In certe realizzazioni, la cellula

bersaglio può essere una cellula cancerosa. In certe realizzazioni, la cellula cancerosa può essere una malignità a cellule B. In certe realizzazioni, il recettore della superficie cellulare può essere un CAR anti-CD19. In certe realizzazioni, il CAR anti-CD19 può essere un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBz. In certe realizzazioni, gli uno o più agenti che stimolano cellule T possono essere un anticorpo anti-CD3 e IL-2. In certe realizzazioni, il vettore virale può essere un vettore retrovirale. In certe realizzazioni, il vettore retrovirale può essere un vettore retrovirale MSGV1 gamma. In certe realizzazioni, il vettore retrovirale MSGV1 gamma può essere un vettore retrovirale MSGV-FMC63-28Z o MSGV-FMC63-CD828BBz gamma. In certe realizzazioni, il tempo predeterminato per espandere la popolazione di cellule T trasdotte può essere 3 giorni. In certe realizzazioni, il tempo per l'arricchimento della popolazione di linfociti per produrre le cellule T ingegnerizzate può essere 6 giorni. In certe realizzazioni, le cellule T ingegnerizzate possono venire usate per trattare un paziente affetto da cancro. In certe realizzazioni, il paziente affetto da cancro e il soggetto donatore possono essere lo stesso individuo. In certe realizzazioni, il sistema chiuso può essere un sistema a sacca chiusa. In certe realizzazioni, la popolazione di cellule può comprendere cellule T naïve. In certe realizzazioni, circa il 35-43% della popolazione di cellule T ingegnerizzate può comprendere cellule T naïve. In certe realizzazioni, almeno circa il 35% della popolazione di cellule T ingegnerizzate può comprendere cellule T naïve. In certe realizzazioni, almeno circa il 43% della popolazione di cellule T ingegnerizzate può comprendere cellule T naïve.

Viene descritta in questa sede una popolazione di cellule T ingegnerizzate che esprimono un recettore della superficie cellulare che riconosce una parte antigenica specifica sulla superficie di una cellula bersaglio prodotta mediante i metodi descritti in questa sede.

Vengono descritte in questa sede composizioni farmaceutiche comprendenti una popolazione di cellule T ingegnerizzate. Vengono descritte in questa sede composizioni farmaceutiche comprendenti la popolazione di cellule T ingegnerizzate come descritto in questa sede. La composizione farmaceutica può comprendere una dose terapeuticamente efficace delle cellule T ingegnerizzate. Il recettore della superficie cellulare può essere un recettore di cellule T (TCR) o un recettore di un antigene chimerico (CAR). Il CAR può essere un CAR FMC63-

28Z o CAR FMC63-CD828BBZ. La dose terapeutica efficace può essere più di circa 1 milione fino a meno di circa 3 milioni di cellule T ingegnerizzate per chilogrammo di peso corporeo (cellule/kg). La dose terapeutica efficace può essere circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate/kg.

#### **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

La FIGURA 1 è un diagramma che illustra il procedimento per la produzione di cellule T secondo certe realizzazioni descritte in questa sede (il procedimento “migliorato”). Poiché i tempi di raddoppio delle cellule T possono variare leggermente da soggetto a soggetto, un tempo di crescita addizionale oltre 72 ore (cioè 3-6 giorni) in sacche viene considerato nel caso in cui il numero totale di cellule sia insufficiente per fornire una dose bersaglio di interesse (vedere \*).

La FIGURA 2 è un diagramma che illustra il procedimento migliorato confrontato ad un procedimento usato tradizionalmente (il procedimento “precedente”) secondo una realizzazione.

La FIGURA 3 è un grafico a barre che illustra l’espansione in coltura nel procedimento migliorato rispetto al procedimento precedente secondo una realizzazione. L’asse y rappresenta l’espansione in volte di cellule per ciascuna delle 5 prove (asse x). L’espansione in coltura in volte è simile fra i procedimenti precedente e migliorato in prove di ingegnerizzazione in scala.

La FIGURA 4 mostra una serie di grafici che illustrano fenotipi di cellule T il giorno 6 e il giorno 10 nei procedimenti precedente e migliorato per marcatori del fenotipo di cellule CD3+ (FIGURA 4A) e attivazione di cellule CD3+ (FIGURA 4B) secondo una realizzazione. I fenotipi di cellule T sono paragonabili fra i procedimenti precedente e migliorato, ma le cellule al giorno 6 sono meno differenziate. T<sub>eff</sub> = cellule T effettrici; T<sub>em</sub> = cellule T della memoria effettrici, T<sub>cm</sub> = cellule T della memoria centrali.

La FIGURA 5 mostra una serie di grafici che illustrano il fenotipo di cellule il giorno 6 nei procedimenti precedente e migliorato, secondo una realizzazione.

La FIGURA 6 è una vista schematica che mostra il conteggio delle cellule giornaliero durante le fasi di stimolazione, trasduzione ed espansione del procedimento migliorato, secondo una realizzazione.

La FIGURA 7 mostra la sequenza di acidi nucleici di uno scheletro retrovirale di MSGV1 gamma (SEQ. ID. n.

4) secondo una realizzazione.

La FIGURA 8 mostra l'efficienza di trasduzione come una funzione della concentrazione di RetroNectin® usato per rivestire le sacche, secondo una realizzazione. RN = concentrazione di RetroNectin® in µg/ml. I risultati sono stati misurati il giorno 6 dopo la trasduzione in sacche PL07 provenienti da 2 donatori.

La FIGURA 9 mostra l'efficienza di trasduzione con e senza una fase di lavaggio, secondo una realizzazione. I risultati sono stati misurati il giorno 6 dopo la trasduzione in sacche Origen PermaLife™.

La FIGURA 10 mostra l'impatto della concentrazione di RetroNectin® sull'efficienza di trasduzione in terreno OpTmizer™, secondo una realizzazione. RN = concentrazione di RetroNectin® in µg/ml. "Aperto" indica la condizione in cui la trasduzione è stata eseguita in piastre in AIM V®+ 5% di siero umano.

La FIGURA 11 mostra l'attività di cellule T trasdotte misurata mediante espressione di CD107a ed espressione di IFN-gamma dopo co-incubazione con cellule Nalm6 CD19+ per 4 ore, valutata mediante FACS, secondo una realizzazione. "Aperto" indica la condizione in cui la trasduzione è stata eseguita in piastre in AIM V®+ 5% di siero umano. Controllo T indica un campione di riferimento di PBMC trasdotte CAR-positive congelate.

La FIGURA 12 mostra il profilo di temperatura della camera di un congelatore a velocità controllata (linea inferiore) e della temperatura del prodotto (linea superiore) per il profilo ottimizzato. Il profilo mostrato è stato troncato per brevità per mostrare solo la regione critica.

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA**

Viene fornito un metodo per produrre una preparazione di cellule T che può essere utile per trattare pazienti con una malattia o condizione patologica. Diversamente dai metodi di produzione noti per prodotti di cellule T, i metodi e i procedimenti descritti in questa sede vengono completati in un tempo significativamente più breve, approssimativamente 6 giorni, offrendo così un vantaggio di tempo significativo per portare le cellule nell'ambito clinico. Vengono descritte in questa sede popolazioni di cellule T ingegnerizzate prodotte usando i metodi descritti in questa sede, e loro composizioni farmaceutiche.

Il metodo fornito in questa sede viene usato per produrre cellule T che esprimono un recettore della superficie cellulare che riconosce una parte antigenica specifica sulla superficie di una cellula bersaglio. Il recettore della

superficie cellulare può essere un recettore di cellule T di tipo selvatico o ricombinanti (TCR), un recettore di un antigene chimerico (CAR), o qualsiasi altro recettore superficiale in grado di riconoscere una parte antigenica che è associata con la cellula bersaglio. La forma della parte antigenica riconosciuta mediante i CAR e TCR è leggermente diversa. I CAR hanno un frammento variabile a catena singola (scFv) come un dominio legante il bersaglio, il che permette l'espressione del CAR come una proteina a catena singola. Questo permette ad un CAR di riconoscere antigeni del cancro nativi che sono parte di una proteina intatta sulla superficie di una cellula bersaglio. Un TCR ha due catene di proteina, che sono progettate per legarsi con peptidi specifici presentati mediante una proteina MHC sulla superficie di certe cellule. Poiché i TCR riconoscono peptidi nel contesto di molecole di MHC espresse sulla superficie di una cellula bersaglio, i TCR hanno il potenziale di riconoscere antigeni del cancro non solo presentati direttamente sulla superficie di cellule cancerose, ma anche presentati mediante cellule di presentazione dell'antigene in un tumore, microambienti infiammatori ed infettati, ed in organi linfoidi secondari. Le cellule che presentano l'antigene sono cellule del sistema immunitario native responsabili dell'amplificazione della risposta immunitaria.

Quindi, le cellule T prodotte che esprimono il recettore della superficie cellulare possono venire usate per mirare e uccidere qualsiasi cellula bersaglio comprendente, ma senza essere limitata a queste, cellule infettate, cellule danneggiate, o cellule disfunzionali. Esempi di tali cellule bersaglio possono comprendere cellule cancerose, cellule infettate viralmente, cellule infettate battericamente, cellule infiammatorie attivate disfunzionalmente (per esempio cellule endoteliali infiammatorie), e cellule coinvolte in reazioni immunitarie disfunzionali (per esempio cellule coinvolte in malattie autoimmuni).

In alcuni aspetti, la parte antigenica è associata con un cancro o una cellula cancerosa. Tali parti antigeniche possono comprendere, ma non sono limitate a queste, 707-AP (707 alanina prolina), AFP (alfa (a)-fetoproteina), ART-4 (antigene di adenocarcinoma riconosciuto mediante cellule T4), BAGE (antigene B; b-catenina/m, b-catenina/mutata), BCMA (antigene di maturazione delle cellule B), Bcr-abl (regione cluster del punto di rottura-Abelson), CAIX (anidrasi carbonica IX), CD19 (cluster di differenziazione 19), CD20 (cluster di differenziazione 20), CD22 (cluster di differenziazione 22), CD30 (cluster di differenziazione 30), CD33 (cluster

di differenziazione 33), CD44v7/8 (cluster di differenziazione 44, esoni 7/8), CAMEL (antigene riconosciuto da CTL su melanoma), CAP-1 (peptide dell'antigene carcinoembrionale - 1), CASP-8 (caspasi-8), CDC27m (ciclo di divisione cellulare 27 mutato), CDK4/m (chinasi dipendente da ciclina 4 mutata), CEA (antigene carcinoembrionale), CT (cancro/testicolo (antigene)), Cyp-B (ciclofilina B), DAM (antigene di differenziazione del melanoma), EGFR (recettore del fattore di crescita dell'epidermide), EGFRvIII (recettore del fattore di crescita dell'epidermide, variante III), EGP-2 (glicoproteina epiteliale 2), EGP-40 (glicoproteina epiteliale 40), Erbb2, 3, 4 (omologo dell'oncogene virale della leucemia eritroblastica-2, -3, 4), ELF2M (fattore di allungamento 2 mutato), ETV6-AML1 (gene variante Ets 6/gene della leucemia mieloide acuta 1 ETS), FBP (proteina legante folato), fAChR (recettore di acetilcolina fetale), G250 (glicoproteina 250), GAGE (antigene G), GD2 (disialoganglioside 2), GD3 (disialoganglioside 3), GnT-V (N-acetilglucosamminiltransferasi V), Gp100 (glicoproteina 100 kD), HAGE (antigene elicisio), HER-2/neu (recettore epidermico umano-2/neurologico; anche noto come EGFR2), HLA-A (antigene leucocitario umano-A) HPV (papillomavirus umano), HSP70-2M (proteina da shock termico 70 - 2 mutata), HST-2 (tumore ad anello con castone umano - 2), hTERT o hTRT (transcriptasi inversa di telomerasi umana), iCE (carbossilesterasi intestinale), IL-13R-a2 (subunità alfa-2 del recettore di interleuchina-13), KIAA0205, KDR (recettore del dominio dell'inserito di chinasi), catena leggera  $\kappa$ , LAGE (antigene L), LDLR/FUT (recettore di lipidi a bassa densità/GDP-L-fucosio: b-D-galattosidasi 2-a-L-fucosiltransferasi), LeY (anticorpo Lewis-Y), L1CAM (molecola di adesione cellulare L1), MAGE (antigene di melanoma), MAGE-A1 (antigene associato a melanoma 1), mesotelina, cellule infettate con CMV murino, MART-1/melan-A (antigene di melanoma riconosciuto mediante cellule T-1/antigene di melanoma A), MC1R (recettore di melanocortina 1), miosina/m (miosina mutata), MUC1 (mucina 1), MUM-1, -2, -3 (melanoma ubiquitario mutato 1, 2, 3), NA88-A (clone di cDNA NA del paziente M88), ligandi di NKG2D (gruppo 2 di killer naturali, membro D), NY-BR-1 (antigene di differenziazione del seno New York 1), NY-ESO-1 (carcinoma a cellule squamose esofageo New York-1), antigene oncofetale (h5T4), P15 (proteina 15), bcr-abl minore p190 (proteina di bcr-abl da 190 KD), Pml/RARa (recettore di leucemia promielocitica/acido retinoico a), PRAME (antigene espresso preferenzialmente di melanoma), PSA (antigene prostatico specifico), PSCA

(antigene di cellule staminali della prostata), PSMA (antigene della membrana prostatico specifico), RAGE (antigene renale), RU1 o RU2 (renale ubiquitario 1 o 2), SAGE (antigene di sarcoma), SART-1 o SART-3 (tumore che rigetta un antigene squamoso 1 o 3), SSX1, -2, -3, 4 (sarcoma sinoviale X1, -2, -3, -4), TAA (antigene associato a tumore), TAG-72 (glicoproteina 72 associata a tumore), TEL/AML1 (leucemia della famiglia Ets di traslocazione/leucemia mieloide acuta 1), TPI/m (triosio fosfato isomerasi mutata), TRP-1 (proteina correlata a tirosinasi 1, o gp75), TRP-2 (proteina correlata a tirosinasi 2), TRP-2/INT2 (TRP-2/introne 2), VEGF-R2 (recettore del fattore di crescita endoteliale vascolare 2), o WT1 (gene del tumore di Wilms).

In alcuni aspetti, il recettore della superficie cellulare è qualsiasi TCR che riconosce una parte antigenica specifica su cellule cancerose comprendenti, ma senza essere limitati a questi, TCR anti-707-AP, TCR anti-AFP, TCR anti-ART-4, TCR anti-BAGE, TCR anti-Bcr-abl, TCR anti-CAMEL, TCR anti-CAP-1, TCR anti-CASP-8, TCR anti-CDC27m, TCR anti-CDK4/m, TCR anti-CEA, TCR anti-CT, TCR anti-Cyp-B, TCR anti-DAM, TCR anti-, TCR anti-EGFRvIII, TCR anti-ELF2M, TCR anti-ETV6-AML1, TCR anti-G250, TCR GAGE, TCR anti-GnT-V, TCR anti-Gp100, TCR anti-HAGE, TCR anti-HER-2/neu, TCR anti-HLA-A, TCR anti-HPV, TCR anti-HSP70-2M, TCR anti-HST-2, TCR anti-hTERT o TCR anti-hTRT, TCR anti-iCE, anti-KIAA0205, anti-LAGE (antigene L), TCR anti-LDLR/FUT, TCR anti-MAGE, TCR anti-MART-1/Melan-A, TCR anti-MC1R, TCR anti-miosina/m, TCR anti-MUC1, TCR anti-MUM-1, -2, -3, TCR anti-NA88-A, TCR anti-NY-ESO-1, TCR anti-P15, TCR anti-p190 bcr-abl minore, TCR anti-Pml/RARa, TCR anti-PRAME, TCR anti-PSA, TCR anti-PSMA, TCR anti-RAGE, TCR anti-RU1 o TCR anti-RU2, TCR anti-SAGE, TCR anti-SART-1 o TCR anti-SART-3, TCR anti-SSX1, -2, -3, 4, TCR anti-TEL/AML1, TCR anti-TPI/m, TCR anti-TRP-1, TCR anti-TRP-2, TCR anti-TRP-2/INT2, o TCR anti-WT1.

In altri aspetti, il recettore della superficie cellulare è qualsiasi CAR che può venire espresso mediante una cellula T e che riconosce una parte antigenica specifica su cellule cancerose. Certi CAR contengono un dominio legante l'antigene (per esempio scFv) e un dominio di segnalazione (per esempio catena zeta di CD3). Altri CAR contengono un dominio legante l'antigene (per esempio scFv), un dominio di segnalazione (per esempio catena zeta di CD3), e un dominio co-stimolatorio (per esempio CD28). Ancora altri CAR contengono un dominio

legante l'antigene (per esempio scFv), un dominio di segnalazione (per esempio catena zeta di CD3), e due domini co-stimolatori (per esempio CD28 e 4-1BB). Esempi di CAR del recettore superficiale che possono venire espressi mediante cellule T che vengono generati secondo i metodi descritti in questa sede, comprendono ma non sono limitati a questi, un CAR anti-BCMA, CAR anti-CAIX, CAR anti-CD19, CAR anti-CD20, CAR anti-CD22, CAR anti-CD30, CAR anti-CD33, CAR anti-CD44v7/8, CAR anti-CEA, anti-EGFRvIII, anti-EGP-2, CAR anti-EGP-40, CAR anti-ErbB2, 3, 4, CAR anti-FBP, CAR anti-fAChR, CAR anti-GD2, CAR anti-GD3, CAR anti-HER2/neu, CAR anti-IL-13R-a2, CAR anti-KDR, CAR anti-catena leggera  $\kappa$ , CAR anti-LeY, CAR anti-L1CAM, CAR anti-MAGE-A1, CAR anti-mesotelina, CAR diretto a cellule infettate con anti-CMV murino, CAR anti-MUC1, ligando di CAR anti-NKG2D, CAR anti-NY-BR-1, CAR anti-h5T4, CAR anti-PSCA, CAR anti-PSMA, CAR anti-TAA, CAR anti-TAG-72, o CAR anti-VEGF-R2. In una realizzazione, il recettore della superficie cellulare è qualsiasi CAR anti-CD19. In un aspetto il CAR anti-CD19 comprende un dominio scFv extracellulare, una porzione intracellulare e/o transmembrana di una molecola di CD28, una porzione extracellulare opzionale della molecola di CD28, ed un dominio CD3zeta intracellulare. Il CAR anti-CD19 può anche comprendere domini addizionali, come una regione extracellulare e/o transmembrana CD8, un dominio Fc di immunoglobulina extracellulare (per esempio IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), o uno o più domini di segnalazione addizionali come recettore di 41BB, OX40, CD2 CD16, CD27, CD30 CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, IL-2, recettore di Fc gamma, o qualsiasi di altri domini costimolatori con motivi di attivazione basati su tirosina immunorecettore.

In certe realizzazioni, il recettore della superficie cellulare è un CAR anti-CD19, come CAR FMC63-28Z o CAR FMC63-CD828BBZ come esposto in Kochenderfer et al., *J Immunother.* Settembre 2009; 32(7): 689-702, "Construction and Pre-clinical Evaluation of an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor," che descrive i metodi di costruzione dei vettori usati per produrre cellule T che esprimono il CAR FMC63-28Z o CAR FMC63-CD828BBZ.

In altre realizzazioni, la parte antigenica è associata con cellule infettate viralmente (cioè una parte antigenica virale). Tali parti antigeniche possono comprendere, ma non sono limitate a queste, un antigene del virus

Epstein-Barr (EBV) (per esempio EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3, LMP-1, LMP-2), un antigene del virus dell'epatite A (per esempio VP1, VP2, VP3), un antigene del virus dell'epatite B (per esempio HBsAg, HBcAg, HBeAg), un antigene virale dell'epatite C (per esempio glicoproteine dell'involucro E1 ed E2), un antigene virale di tipo 1, tipo 2 o tipo 8 del virus herpes simplex (HSV1, HSV2 o HSV8) (per esempio glicoproteine gB, gC, gC, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM, UL20, UL32, US43, UL45, UL49A), un antigene virale di citomegalovirus (CMV) (per esempio glicoproteine gB, gC, gC, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM o altre proteine dell'involucro), un antigene virale del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) (glicoproteine gp120, gp41 o p24), un antigene virale dell'influenza (per esempio emagglutinina (HA) o neuramminidasi (NA)), un antigene virale del morbillo o della parotite, un antigene virale di papillomavirus umano (HPV) (per esempio L1, L2), un antigene virale del virus della parainfluenza, un antigene virale del virus della rosolia, un antigene virale del virus sinciziale respiratorio (RSV) o un antigene virale del virus varicella-zoster. In tali aspetti, il recettore della superficie cellulare può essere qualsiasi TCR o qualsiasi CAR che riconosce qualsiasi degli antigeni virali summenzionati su una cellula bersaglio infettata viralmente.

In altre realizzazioni, la parte antigenica è associata con cellule aventi una disfunzione immunitaria o infiammatoria. Tali parti antigeniche possono comprendere, ma non sono limitate a queste, proteina basica della mielina (MBP), proteina proteolipidica della mielina (PLP), glicoproteina oligodendrocitica della mielina (MOG), antigene carcinoembrionale (CEA), pro-insulina, glutammina decarbossilasi (GAD65, GAD67), proteine da shock termico (HSP), o qualsiasi altro antigene tessuto-specifico che viene fornito in o associato con un procedimento autoimmune patogeno.

Il metodo fornito in questa sede comprende una fase di arricchimento di una popolazione di linfociti ottenuti da un soggetto donatore. Il soggetto donatore può essere un paziente affetto da cancro che deve venire trattato con una popolazione di cellule generata mediante i metodi descritti in questa sede (cioè un donatore autologo), o può essere un individuo che dona un campione di linfociti che, dopo generazione della popolazione di cellule generata mediante i metodi descritti in questa sede, verrà usato per trattare un individuo o un paziente affetto da cancro diverso (cioè un donatore allogenico). La popolazione di linfociti può venire ottenuta dal soggetto

donatore mediante qualsiasi metodo adatto usato nella tecnica. Per esempio, la popolazione di linfociti può venire ottenuta mediante qualsiasi metodo extracorporeo adatto, venopuntura, o un altro metodo di prelievo del sangue mediante il quale un campione di sangue e/o linfociti viene ottenuto. In una realizzazione, la popolazione di linfociti viene ottenuta mediante aferesi.

L'arricchimento di una popolazione di linfociti può venire eseguito mediante qualsiasi metodo di separazione adatto comprendente, ma senza essere limitato a questi, l'uso di un mezzo di separazione (per esempio cocktail per l'arricchimento di linfociti totali HLA Ficoll-Paque™, RosetteSep™, mezzo per la separazione di linfociti (LSA) (n. di catalogo MP Biomedical 0850494X) o simili), separazione per dimensione, forma o densità cellulare mediante filtrazione o elutriazione, separazione immunomagnetica (per esempio sistema per la selezione di cellule ad attivazione magnetica, MACS), separazione fluorescente (per esempio sistema per la selezione di cellule attivate a fluorescenza, FACS) o separazione su colonna basata su perline.

Il metodo fornito in questa sede comprende anche una fase di stimolazione della popolazione di linfociti con uno o più agenti che stimolano cellule T per produrre una popolazione di cellule T attivate. Qualsiasi combinazione di uno o più agenti che stimolano cellule T adatti può venire usata per produrre una popolazione di cellule T attivate comprendente, ma senza essere limitata a questo, un suo frammento funzionale o anticorpo che mira una molecola stimolatrice o co-stimolatrice di cellule T (per esempio anticorpo anti-CD2, anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD28 o loro frammenti funzionali), una citochina di cellule T (per esempio qualsiasi delle citochine isolate, di tipo selvatico o ricombinanti come: interleuchina 1 (IL-1), interleuchina 2 (IL-2), interleuchina 4 (IL-4), interleuchina 5 (IL-5), interleuchina 7 (IL-7), interleuchina 15 (IL-15), fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) o qualsiasi altro mitogeno adatto (per esempio tetradecanoilforbolacetato (TPA), fitoemagglutinina (PHA), concanavalina A (conA), lipopolisaccaride (LPS), mitogeno da pokeweed (PWM)) o un ligando naturale a una molecola stimolatrice o co-stimolatrice di cellule T.

In alcune realizzazioni, la fase di stimolazione della popolazione di linfociti come descritto in questa sede può comprendere la stimolazione della popolazione di linfociti con uno o più agenti che stimolano cellule T a una temperatura predeterminata, per una quantità di tempo predeterminata, e/o in presenza di un livello di CO<sub>2</sub>

predeterminato. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata per la stimolazione può essere circa 34°C, circa 35°C, circa 36°C, circa 37°C, circa 38°C o circa 39°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata per la stimolazione può essere circa 34-39°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata per la stimolazione può essere da circa 35 fino a 37°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata preferita per la stimolazione può essere da circa 36 fino a 38°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata per la stimolazione può essere circa 36-37°C o più preferibilmente circa 37°C. In certe realizzazioni, la fase di stimolazione della popolazione di linfociti comprende la stimolazione della popolazione di linfociti con uno o più agenti che stimolano cellule T per un tempo predeterminato. In certe realizzazioni, il tempo predeterminato per la stimolazione può essere circa 24-72 ore. In certe realizzazioni, il tempo predeterminato per la stimolazione può essere circa 24-36 ore, circa 30-42 ore, circa 36-48 ore, circa 40-52 ore, circa 42-54 ore, circa 44-56 ore, circa 46-58 ore, circa 48-60 ore, circa 54-66 ore o circa 60-72 ore. In certe realizzazioni, il tempo predeterminato per la stimolazione può essere circa 48 ore o almeno circa 48 ore. In certe realizzazioni, il tempo predeterminato per la stimolazione può essere circa 44-52 ore. In certe realizzazioni, il tempo predeterminato per la stimolazione può essere circa 40-44 ore, circa 40-48 ore, circa 40-52 ore o circa 40-56 ore. In certe realizzazioni, la fase di stimolazione della popolazione di linfociti può comprendere la stimolazione della popolazione di linfociti con uno o più agenti che stimolano cellule T in presenza di un livello di CO<sub>2</sub> predeterminato. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato per la stimolazione può essere circa 1,0-10% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato per la stimolazione può essere circa 1,0%, circa 2,0%, circa 3,0%, circa 4,0%, circa 5,0%, circa 6,0%, circa 7,0%, circa 8,0%, circa 9,0% o circa 10,0% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato per la stimolazione può essere circa 3-7% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello predeterminato di CO<sub>2</sub> per la stimolazione può essere circa 4-6% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato per la stimolazione può essere circa 4,5-5,5% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato per la stimolazione può essere circa 5% di CO<sub>2</sub>. In alcune realizzazioni, la fase di stimolazione della popolazione di linfociti può comprendere la stimolazione della popolazione di linfociti con uno o più agenti che stimolano cellule T a una temperatura predeterminata, per una quantità di tempo predeterminata, e/o in

presenza di un livello di CO<sub>2</sub> predeterminato in qualsiasi combinazione. Per esempio, la fase di stimolazione della popolazione di linfociti può comprendere la stimolazione della popolazione di linfociti con uno o più agenti che stimolano cellule T a una temperatura predeterminata di circa 36-38°C, per una quantità di tempo predeterminata di circa 44-52 ore, e in presenza di un livello di CO<sub>2</sub> predeterminato di circa 4,5-5,5% di CO<sub>2</sub>.

In certe realizzazioni, la popolazione di linfociti che viene usata per la fase di stimolazione della popolazione di linfociti come descritto in questa sede può essere a una concentrazione di linfociti predeterminata. In certe realizzazioni, la concentrazione di linfociti predeterminata può essere circa  $0,1-10,0 \times 10^6$  cellule/ml. In certe realizzazioni, la concentrazione di linfociti predeterminata può essere circa  $0,1-1,0 \times 10^6$  cellule/ml,  $1,0-2,0 \times 10^6$  cellule/ml, circa  $1,0-3,0 \times 10^6$  cellule/ml, circa  $1,0-4,0 \times 10^6$  cellule/ml, circa  $1,0-5,0 \times 10^6$  cellule/ml, circa  $1,0-6,0 \times 10^6$  cellule/ml, circa  $1,0-7,0 \times 10^6$  cellule/ml, circa  $1,0-8,0 \times 10^6$  cellule/ml,  $1,0-9,0 \times 10^6$  cellule/ml o circa  $1,0-10,0 \times 10^6$  cellule/ml. In certe realizzazioni, la concentrazione di linfociti predeterminata può essere circa  $1,0-2,0 \times 10^6$  cellule/ml. In certe realizzazioni, la concentrazione predeterminata di linfociti può essere circa  $1,0-1,2 \times 10^6$  cellule/ml, circa  $1,0-1,4 \times 10^6$  cellule/ml, circa  $1,0-1,6 \times 10^6$  cellule/ml, circa  $1,0-1,8 \times 10^6$  cellule/ml o circa  $1,0-2,0 \times 10^6$  cellule/ml. In certe realizzazioni, la concentrazione di linfociti predeterminata può essere almeno circa  $0,1 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $1,0 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $1,1 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $1,2 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $1,3 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $1,4 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $1,5 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $1,6 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $1,7 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $1,8 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $1,9 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $2,0 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $4,0 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $6,0 \times 10^6$  cellule/ml, almeno circa  $8,0 \times 10^6$  cellule/ml o almeno circa  $10,0 \times 10^6$  cellule/ml.

In alcune realizzazioni, si può usare un anticorpo anti-CD3 (o un suo frammento funzionale), un anticorpo anti-CD28 (o un suo frammento funzionale), o una combinazione di anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 secondo la fase di stimolazione della popolazione di linfociti. Può venire usato qualsiasi anticorpo anti-CD2, anti-CD3 e/o anti-CD28 o un suo frammento funzionale solubile o immobilizzato (per esempio clone OKT3 (anti-CD3), clone 145-2C11 (anti-CD3), clone UCHT1 (anti-CD3), clone L293 (anti-CD28), clone 15E8 (anti-CD28)). In alcuni

aspetti, gli anticorpi possono venire acquistati commercialmente da venditori noti nella tecnica comprendenti, ma senza essere limitati a questi, Miltenyi Biotec, BD Biosciences (per esempio CD3 MACS GMP puro 1 mg/ml, parte n. 170-076-116), ed eBioscience, Inc. Inoltre, un esperto nella tecnica può comprendere come produrre un anticorpo anti-CD3 e/o anti-CD28 mediante metodi standard. Qualsiasi anticorpo usato nei metodi descritti in questa sede deve venire prodotto secondo pratiche di buona produzione (GMP) per adattarsi a linee guida di una agenzia pertinente per prodotti biologici. In alcune realizzazioni, gli uno o più agenti che stimolano cellule T che possono venire usati secondo la fase di stimolazione della popolazione di linfociti comprendono un anticorpo o un suo frammento funzionale che mira una molecola stimolatrice o co-stimolatrice per cellule T in presenza di una citochina di cellule T. In una realizzazione, gli uno o più agenti che stimolano cellule T comprendono un anticorpo anti-CD3 e IL-2. In certe realizzazioni, l'agente che stimola cellule T può comprendere un anticorpo anti-CD3 a una concentrazione di da circa 20 ng/ml fino a 100 ng/ml. In certe realizzazioni, la concentrazione dell'anticorpo anti-CD3 può essere circa 20 ng/ml, circa 30 ng/ml, circa 40 ng/ml, circa 50 ng/ml, circa 60 ng/ml, circa 70 ng/ml, circa 80 ng/ml, circa 90 ng/ml o circa 100 ng/ml. In certe realizzazioni, la concentrazione di anticorpo anti-CD3 può essere circa 50 ng/ml.

Il metodo fornito in questa sede comprende inoltre la fase di trasduzione della popolazione di cellule T attivate con un vettore virale comprendente una molecola di acido nucleico che codifica il recettore della superficie cellulare, usando una trasduzione a ciclo singolo per produrre una popolazione di cellule T trasdotte. Diversi virus ricombinanti sono stati usati come vettori virali per veicolare materiale genetico a una cellula. Vettori virali che possono venire usati secondo la fase di trasduzione possono essere qualsiasi vettore virale ecotropico o anfotropico comprendente, ma senza essere limitato a questi, vettori retrovirali ricombinanti, vettori lentivirali ricombinanti, vettori adenovirali ricombinanti e vettori virali adeno-associati (AAV) ricombinanti. In una realizzazione, il vettore virale usato per trasdurre la popolazione di cellule T attivate è un vettore retrovirale MSGV1 gamma. In un aspetto, tale vettore retrovirale MSGV1 gamma può comprendere una sequenza di acidi nucleici come scheletro mostrata nella FIGURA 6 (SEQ. ID. n.: 4), in cui un frammento di acido nucleico che comprende la sequenza di un recettore della superficie cellulare (per esempio un CAR o un TCR) è legato con un

frammento di acido nucleico che comprende la sequenza del vettore retrovirale MSGV1 gamma. In certe realizzazioni, il vettore virale usato per trasdurre la popolazione di cellule T attivate può essere il vettore retrovirale MSGV-FMC63-28Z o il vettore retrovirale MSGV-FMC63-CD828BBZ esposto in Kochenderfer et al., *J Immunother.* Settembre 2009; 32(7): 689-702, che descrive i metodi di costruzione dei vettori retrovirali forniti nella sezione "Construction of the MSGV-FMC63-28Z e MSGV-FMC63-CD828BBZ Recombinant Retroviral Vectors" nella sezione "Materials and Methods" della pubblicazione. Secondo un aspetto di questa realizzazione, il vettore virale viene fatto crescere in una coltura in un terreno che è specifico per la produzione di un vettore virale. Qualsiasi dei terreni e/o integratori per la crescita adatti per la crescita di vettori virali può venire usato nell'inoculo di vettore virale secondo i metodi descritti in questa sede. Secondo alcuni aspetti, il vettore virale può quindi venire aggiunto ai terreni di coltura privi di siero descritti in seguito durante la fase di trasduzione.

In certe realizzazioni, la fase di trasduzione della popolazione di cellule T attivate può venire eseguita per un tempo predeterminato, a una temperatura predeterminata e/o in presenza di un livello di CO<sub>2</sub> predeterminato. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata per la trasduzione può essere circa 34°C, circa 35°C, circa 36°C, circa 37°C, circa 38°C o circa 39°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata per la trasduzione può essere circa 34-39°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata per la trasduzione può essere da circa 35 fino a 37°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata preferita per la trasduzione può essere da circa 36 fino a 38°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata per la trasduzione può essere circa 36-37°C o più preferibilmente circa 37°C. In certe realizzazioni, il tempo predeterminato per la trasduzione può essere circa 12-36 ore. In certe realizzazioni, il tempo predeterminato per la trasduzione può essere circa 12-16 ore, circa 12-20 ore, circa 12-24 ore, circa 12-28 ore o circa 12-32 ore. In certe realizzazioni, il tempo predeterminato per la trasduzione può essere circa 20 ore o almeno circa 20 ore. In certe realizzazioni, il tempo predeterminato per la trasduzione può essere circa 16-24 ore. In certe realizzazioni, il tempo predeterminato per la trasduzione può essere almeno circa 14 ore, almeno circa 16 ore, almeno circa 18 ore, almeno circa 20 ore, almeno circa 22 ore, almeno circa 24 ore o almeno circa 26 ore. In alcune realizzazioni,

la fase di trasduzione della popolazione di cellule T attivate può comprendere la trasduzione della popolazione di cellule T attivate con un vettore virale a un livello di CO<sub>2</sub> predeterminato. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato per la trasduzione può essere circa 1,0-10% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato per la trasduzione può essere circa 1,0%, circa 2,0%, circa 3,0%, circa 4,0%, circa 5,0%, circa 6,0%, circa 7,0%, circa 8,0%, circa 9,0% o circa 10,0% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato per la trasduzione può essere circa 3-7% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato per la trasduzione può essere circa 4-6% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato per la trasduzione può essere circa 4,5-5,5% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato per la trasduzione può essere circa 5% di CO<sub>2</sub>. In alcune realizzazioni, la fase di trasduzione della popolazione di cellule T attivate può venire eseguita per un tempo predeterminato, a una temperatura predeterminata e/o in presenza di un livello di CO<sub>2</sub> predeterminato in qualsiasi combinazione. Per esempio, la fase di trasduzione della popolazione di cellule T attivate può comprendere una temperatura predeterminata di circa 36-38°C, per una quantità di tempo predeterminata di circa 16-24 ore, e in presenza di un livello di CO<sub>2</sub> predeterminato di circa 4,5-5,5% di CO<sub>2</sub>.

Il metodo fornito in questa sede comprende inoltre una fase di espansione della popolazione di cellule T trasdotte per un tempo predeterminato per produrre una popolazione di cellule T ingegnerizzate. Il tempo predeterminato per l'espansione può essere qualsiasi tempo adatto che permetta la produzione di (i) un numero sufficiente di cellule nella popolazione di cellule T ingegnerizzate per almeno una dose per la somministrazione a un paziente, (ii) una popolazione di cellule T ingegnerizzate con una proporzione favorevole di metamielociti rispetto a un procedimento tipico più lungo, o (iii) entrambi di (i) e (ii). Questo tempo dipenderà dal recettore della superficie cellulare espresso dalle cellule T, dal vettore usato, dalla dose che è necessaria per avere un effetto terapeutico e altre variabili. Quindi, in alcune realizzazioni, il tempo predeterminato per l'espansione può essere 1 giorno, 2 giorni, 3 giorni, 4 giorni, 5 giorni, 6 giorni, 7 giorni, 8 giorni, 9 giorni, 10 giorni, 11 giorni, 12 giorni, 13 giorni, 14 giorni, 15 giorni, 16 giorni, 17 giorni, 18 giorni, 19 giorni, 20 giorni, 21 giorni o più di 21 giorni. In alcuni aspetti, il tempo predeterminato per l'espansione è più corto dei metodi di espansione noti nella tecnica. Per

esempio, il tempo predeterminato per l'espansione può essere più corto di almeno il 5%, almeno il 10%, almeno il 15%, almeno il 20%, almeno il 25%, almeno il 30%, almeno il 35%, almeno il 40%, almeno il 45%, almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, o può essere più corto di più del 75%. In una realizzazione, il tempo predeterminato per l'espansione è circa 3 giorni. In questo aspetto, il tempo per l'arricchimento della popolazione di linfociti per produrre le cellule T ingegnerizzate è circa 6 giorni. In certe realizzazioni, la fase di espansione della popolazione di cellule T trasdotte può venire eseguita a una temperatura predeterminata e/o in presenza di un livello di CO<sub>2</sub> predeterminato. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata può essere circa 34°C, circa 35°C, circa 36°C, circa 37°C, circa 38°C o circa 39°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata può essere circa 34-39°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata può essere da circa 35 fino a 37°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata preferita può essere da circa 36 fino a 38°C. In certe realizzazioni, la temperatura predeterminata può essere circa 36-37°C o più preferibilmente circa 37°C. In alcune realizzazioni, la fase di espansione della popolazione di cellule T trasdotte può comprendere l'espansione della popolazione di cellule T trasdotte in presenza di un livello di CO<sub>2</sub> predeterminato. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato può essere 1,0-10% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato può essere circa 1,0%, circa 2,0%, circa 3,0%, circa 4,0%, circa 5,0%, circa 6,0%, circa 7,0%, circa 8,0%, circa 9,0% o circa 10,0% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato può essere circa 4,5-5,5% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato può essere circa 5% di CO<sub>2</sub>. In certe realizzazioni, il livello di CO<sub>2</sub> predeterminato può essere circa 3,5%, circa 4,0%, circa 4,5%, circa 5,0%, circa 5,5% o circa 6,5% di CO<sub>2</sub>. In alcune realizzazioni, la fase di espansione della popolazione di cellule T trasdotte può venire eseguita a una temperatura predeterminata e/o in presenza di un livello di CO<sub>2</sub> predeterminato in qualsiasi combinazione. Per esempio, la fase di espansione della popolazione di cellule T trasdotte può comprendere una temperatura predeterminata di circa 36-38°C e in presenza di un livello predeterminato di CO<sub>2</sub> di circa 4,5-5,5% di CO<sub>2</sub>.

In alcuni aspetti, ciascuna fase dei metodi descritti in questa sede viene eseguita in un sistema chiuso. In certe realizzazioni, il sistema chiuso è un sistema di coltura in sacca chiusa che può usare qualsiasi delle sacche per

coltura cellulare adatte (per esempio sacche per la differenziazione di cellule GMP Mitenyi Biotec MACS<sup>®</sup>, sacche per coltura cellulare Origen Biomedical PermaLife<sup>™</sup>). In alcune realizzazioni, le sacche per coltura cellulare usate nel sistema di coltura in sacca chiusa sono rivestite con una proteina fibronectina umana ricombinante durante la fase di trasduzione. In certe realizzazioni, le sacche per coltura cellulare usate nel sistema di coltura in sacca chiusa sono rivestite con un frammento di proteina fibronectina umana ricombinante durante la fase di trasduzione. Il frammento di fibronectina umana ricombinante può comprendere tre domini funzionali: un dominio legante cellule centrale, un dominio legante eparina II e una sequenza CS1. Si può usare la proteina fibronectina umana ricombinante o un suo frammento per aumentare l'efficienza genica di trasduzione retrovirale di cellule immunitarie contribuendo alla co-localizzazione di cellule bersaglio e un vettore virale. In certe realizzazioni, il frammento di fibronectina umana ricombinante è RetroNectin<sup>®</sup> (Takara Bio, Giappone). In certe realizzazioni, le sacche per coltura cellulare possono venire rivestite con un frammento di fibronectina umana ricombinante a una concentrazione di circa 1-60 µg/ml, preferibilmente 1-40 µg/ml. In certe realizzazioni, le sacche per coltura cellulare possono venire rivestite con un frammento di fibronectina umana ricombinante a una concentrazione di circa 1-20 µg/ml, 20-40 µg/ml o 40-60 µg/ml. In certe realizzazioni, le sacche per coltura cellulare possono venire rivestite con circa 1 µg/ml, circa 2 µg/ml, circa 3 µg/ml, circa 4 µg/ml, circa 5 µg/ml, circa 6 µg/ml, circa 7 µg/ml, circa 8 µg/ml, circa 9 µg/ml, circa 10 µg/ml, circa 11 µg/ml, circa 12 µg/ml, circa 13 µg/ml, circa 14 µg/ml, circa 15 µg/ml, circa 16 µg/ml, circa 17 µg/ml, circa 18 µg/ml, circa 19 µg/ml o circa 20 µg/ml di frammento di fibronectina umana ricombinante. In certe realizzazioni, le sacche per coltura cellulare possono venire rivestite con circa 2-5 µg/ml, circa 2-10 µg/ml, circa 2-20 µg/ml, circa 2-25 µg/ml, circa 2-30 µg/ml, circa 2-35 µg/ml, circa 2-40 µg/ml, circa 2-50 µg/ml o circa 2-60 µg/ml di frammento di fibronectina umana ricombinante. In certe realizzazioni, le sacche per coltura cellulare possono venire rivestite con almeno circa 2 µg/ml, almeno circa 5 µg/ml, almeno circa 10 µg/ml, almeno circa 15 µg/ml, almeno circa 20 µg/ml, almeno circa 25 µg/ml, almeno circa 30 µg/ml, almeno circa 40 µg/ml, almeno circa 50 µg/ml o almeno circa 60 µg/ml di frammento di fibronectina umana ricombinante. In certe realizzazioni, le sacche per coltura cellulare possono venire rivestite con almeno circa 10 µg/ml di frammento di fibronectina

umana ricombinante. In certe realizzazioni, le sacche per coltura cellulare usate nel sistema di coltura in sacca chiusa possono venire bloccate con siero di albumina umana (HSA) durante la fase di trasduzione. In una realizzazione alternativa, le sacche per coltura cellulare non sono bloccate con HSA durante la fase di trasduzione. Come indicato in questa sede, l'espressione "terreni privi di siero" o "terreno di coltura privo di siero" significa che i terreni di crescita usati non sono additivati con siero (per esempio siero umano o siero bovino). In altre parole, non viene aggiunto siero al terreno di coltura come un ingrediente singolarmente separato e distinto allo scopo di sostenere vitalità, attivazione e crescita delle cellule coltivate. Qualsiasi dei terreni di crescita per cellule T come terreno di coltura adatto può venire usato per mettere in coltura le cellule in sospensione secondo i metodi descritti in questa sede. Per esempio, terreni di crescita per cellule T possono comprendere, ma non sono limitati a questo, una soluzione a basso contenuto di glucosio sterile che contiene una quantità adatta di tampone, magnesio, calcio, piruvato di sodio e bicarbonato di sodio. In una realizzazione, il terreno di crescita per cellule T è OpTmizer™ (Life Technologies), ma un esperto nella tecnica può comprendere come generare terreni simili. Contrariamente ai metodi tipici per produrre cellule T ingegnerizzate, i metodi descritti in questa sede usano un terreno di coltura che non è additivato con siero (per esempio umano o bovino). Il metodo per produrre cellule T che esprimono un recettore della superficie cellulare che riconosce una parte antigenica specifica sulla superficie di una cellula bersaglio fornito in questa sede comprende (1) arricchire una popolazione di linfociti ottenuta da un soggetto donatore; (2) stimolare la popolazione di linfociti con uno o più agenti che stimolano cellule T per produrre una popolazione di cellule T attivate, in cui la stimolazione viene eseguita in un sistema chiuso usando un terreno di coltura privo di siero; (3) trasdurre la popolazione di cellule T attivate con un vettore virale comprendente una molecola di acido nucleico che codifica il recettore della superficie cellulare, usando una trasduzione a ciclo singolo per produrre una popolazione di cellule T trasdotte, in cui la trasduzione viene eseguita in un sistema a sacca chiusa usando un terreno di coltura privo di siero, in cui la sacca è rivestita con una proteina fibronectina umana ricombinante o un suo frammento; e (4) espandere la popolazione di cellule T trasdotte per un tempo predeterminato per produrre una popolazione di cellule T ingegnerizzate, in cui l'espansione viene eseguita in un sistema chiuso usando un terreno di coltura privo di

siero.

In una realizzazione, il metodo può comprendere, ma non è limitato a questo, (1) raccolta di un prodotto di aferesi da un paziente e separazione delle cellule mononucleari in un sistema chiuso, (2) stimolazione della popolazione di cellule mononucleari con un anticorpo per CD3 in presenza di IL2 per stimolare la crescita cellulare di cellule T in un sistema chiuso, (3) trasduzione di un nuovo gene del recettore della superficie cellulare che permette a cellule T di riconoscere una parte antigenica specifica sulla superficie di cellule cancerose bersaglio usando un vettore retrovirale gamma in un sistema chiuso, (4) espansione delle cellule T trasdotte in un sistema chiuso, (5) e lavaggio e preparazione delle cellule T autologhe espanse in un sistema chiuso per la ri-somministrazione a un paziente affetto da cancro. In alcune realizzazioni, la fase di espansione è di 3 giorni, che permette all'intero procedimento di preparazione di venire completato in meno di una settimana. Le fasi del procedimento 2-4 in cui cellule T vengono fatte crescere attivamente vengono eseguite in un terreno di coltura cellulare definito che non contiene siero umano (cioè terreno privo di siero). Le cellule T prodotte mediante questo procedimento presentano attività biologica e diventano attivate mediante un antigene bersaglio sulla superficie di cellule cancerose e producono in risposta interferone gamma. Alcuni aspetti dei metodi descritti in questa sede comprendono:

- questo procedimento si verifica in un sistema chiuso in cui la probabilità di contaminazione durante la produzione di cellule T è minima;
- il procedimento è adatto per la produzione di cellule T per applicazioni cliniche;
- le cellule vengono propagate in un terreno di coltura cellulare che non contiene siero umano;
- il gene recettore viene introdotto in cellule T in un sistema a sacca chiusa;
- le cellule possono venire preparate per uso clinico in solo 6 giorni; e
- le cellule presentano attività biologica indicativa di attività biologica *in vivo*.

Questi aspetti forniscono diverse distinzioni e/o miglioramenti rispetto ai metodi che vengono attualmente usati nel campo come segue. L'uso di terreno di coltura cellulare privo di siero umano minimizza le possibilità di introduzione di patogeni umani da materie prime nel procedimento, ed evita l'uso di una materia prima che può

non essere facilmente disponibile in futuro. Inoltre, tale uso sostiene la conformità a GMP poiché lotti di siero diversi richiedono valutazione e rilascio in coltura significativi per assicurare riproducibilità e robustezza del procedimento. La crescita di cellule T in terreno privo di siero è stata riportata precedentemente (Carstens et al., ISCT meeting in San Diego, 2012; Zuliani, 2011), ma non è stata precedentemente incorporata in un procedimento per la produzione di cellule T per l'uso clinico per trattare cancro, e il lavoro precedente non ha dimostrato che attivazione, trasduzione ed espansione di cellule T in terreno privo di siero sono robuste. Nel procedimento migliorato contemplato negli studi descritti in questa sede, l'uso di un anticorpo monoclonale anti-CD3 e IL2 è stato mantenuto per la stimolazione di popolazioni di cellule T. Inoltre, la coltura cellulare in sacche a sistema chiuso può fornire un vantaggio significativo per prevenire una possibile contaminazione durante la coltura cellulare e fornisce un procedimento semplificato e accorciato che è adatto per la produzione cGMP e la commercializzazione del prodotto. L'importanza di questa applicazione pratica è significativa, poiché molti procedimenti descritti nella letteratura per la propagazione di cellule T non sono adatti per applicazioni commerciali ampie.

Precedentemente, la trasduzione virale con un vettore retrovirale gamma non era efficiente, e un procedimento aperto denominato 'spinoculazione' è stato eseguito in piastre di microtitolazione, in cui virus e cellule sono stati centrifugati sul fondo di un pozzetto che era stato rivestito con RetroNectin®. Questo procedimento viene tipicamente ripetuto due volte in giorni successivi per massimizzare l'efficienza di trasduzione. Questa fase di trasduzione è stata modificata secondo alcune realizzazioni dei metodi descritti in questa sede per cui la trasduzione viene eseguita in un sistema a sacca chiusa, usando una sacca (anziché una piastra) che è stata rivestita con RetroNectin®, e il procedimento viene eseguito una sola volta anziché due volte. I metodi descritti in questa sede possono anche comportare propagazione di cellule in sacche di coltura cellulare a sistema chiuso anziché in palloni a sistema aperto come sono stati storicamente usati nel campo. Sebbene certa letteratura riporti trasduzione in sistemi a sacca (Lamers et al., *Cancer Gene Therapy* 2002, 9: 613-623; Lamers et al., *Cytotherapy* 2008, 10: 406-416; Tumanini et al., *Cytotherapy* 2013, 11, 1406-1415), questi casi - diversamente dai metodi descritti in questa sede - comprendono almeno due trasduzioni che sono state completate in terreno di coltura

cellulare che conteneva siero, e un tempo di espansione di almeno 9 giorni. Gli studi di sviluppo descritti in questa sede dimostrano che la trasduzione in sacche in terreno privo di siero è non solo fattibile, ma che i livelli di trasduzione sono accettabili per un ulteriore sviluppo clinico dopo una singola trasduzione e una espansione di soli 3 giorni.

La popolazione di cellule T ingegnerizzate prodotta mediante i metodi suddescritti può opzionalmente venire crioconservata, per cui le cellule possono venire usate in una data successiva. Quindi, un metodo per la crioconservazione di una popolazione di cellule T ingegnerizzate viene descritto in questa sede. Tale metodo può comprendere una fase di lavaggio e concentrazione della popolazione di cellule T ingegnerizzate con una soluzione diluente. In alcuni aspetti, la soluzione diluente è soluzione salina normale, soluzione salina allo 0,9%, PlasmaLyte A (PL), soluzione salina al 5% di destrosio/0,45% di NaCl (D5), albumina di siero umano (HSA) o una loro combinazione. In alcuni aspetti, HSA può venire aggiunta alle cellule lavate e concentrate per vitalità cellulare e recupero delle cellule migliorati dopo scongelamento. In un altro aspetto, la soluzione di lavaggio è soluzione salina normale e le cellule lavate e concentrate vengono additivate con HSA (5%). Il metodo può anche comprendere una fase di generazione di una miscela di crioconservazione, in cui la miscela di crioconservazione comprende la popolazione diluita di cellule nella soluzione diluente e una soluzione crioconservante adatta. In alcuni aspetti, la soluzione crioconservante può essere qualsiasi soluzione crioconservante adatta comprendente, ma senza essere limitata a questa, CryoStor10 (BioLife Solution), miscelata con la soluzione diluente di cellule T ingegnerizzate a un rapporto di 1:1 o 2:1. HSA può venire aggiunta per fornire una concentrazione finale di circa 1,0-10% di HSA nella miscela crioconservata. HSA può venire aggiunta per fornire una concentrazione finale di circa 1,0%, circa 2,0%, circa 3,0%, circa 4,0%, circa 5,0%, circa 6,0%, circa 7,0%, circa 8,0%, circa 9,0% o circa 10,0% di HSA nella miscela crioconservata. HSA può venire aggiunta per fornire una concentrazione finale di circa 1-3% di HSA, circa 1-4% di HSA, circa 1-5% di HSA, circa 1-7% di HSA, circa 2-4% di HSA, circa 2-5% di HSA, circa 2-6% di HSA o circa 2-7% di HSA nella miscela crioconservata. HSA può venire aggiunta per fornire una concentrazione finale di circa 2,5% di HSA nella miscela crioconservata. Per esempio, la crioconservazione di una popolazione di cellule T

ingegnerizzate può comprendere il lavaggio delle cellule con soluzione salina normale allo 0,9%, aggiunta di HSA a una concentrazione finale del 5% alle cellule lavate, e diluizione delle cellule 1:1 con CryoStor™ CS10 (per una concentrazione finale del 2,5% di HSA nella miscela di crioconservazione finale). Il metodo può anche comprendere una fase di congelamento della miscela di crioconservazione. In un aspetto, la miscela di crioconservazione viene congelata in un congelatore a velocità controllata usando un ciclo di congelamento definito a una concentrazione cellulare di fra circa  $1e6$  e circa  $1,5e7$  cellule per ml di miscela di crioconservazione. Il metodo può anche comprendere una fase di conservazione della miscela di crioconservazione in azoto liquido in fase vapore.

La popolazione di cellule T ingegnerizzate prodotta mediante i metodi descritti in questa sede può venire crioconservata a una dose predeterminata. La dose predeterminata può essere una dose terapeuticamente efficace, che può essere qualsiasi dose terapeuticamente efficace come descritto in seguito. La dose predeterminata di cellule T ingegnerizzate può dipendere dal recettore della superficie cellulare che viene espresso mediante le cellule T (per esempio l'affinità e la densità dei recettori della superficie cellulare espressi sulla cellula), dal tipo di cellula bersaglio, dalla natura della malattia o della condizione patologica che viene trattata, o una combinazione di entrambi. In certe realizzazioni, il recettore della superficie cellulare che viene espresso mediante le cellule T ingegnerizzate può essere un CAR anti-CD19, come CAR FMC63-28Z o CAR FMC63-CD828BBZ come esposto in Kochenderfer et al., *J Immunother.* Settembre 2009; 32(7): 689-702, che descrive metodi di costruzione dei vettori usati per produrre cellule T che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ. La dose predeterminata di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ può essere più di circa 1 milione fino a circa 3 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg. La dose predeterminata di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ può essere più di circa 1 milione fino a circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte per chilogrammo di peso corporeo (cellule/kg). La dose predeterminata di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ può essere più di 1 milione fino a circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte per chilogrammo di peso corporeo (cellule/kg). La

dose predeterminata di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ può essere almeno circa 2 milioni fino a meno di circa 3 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg. La dose predeterminata preferita di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ può essere circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg. La dose predeterminata di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ può essere almeno circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg. La dose predeterminata di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ può essere circa 2,0 milioni, circa 2,1 milioni, circa 2,2 milioni, circa 2,3 milioni, circa 2,4 milioni, circa 2,5 milioni, circa 2,6 milioni, circa 2,7 milioni, circa 2,8 milioni o circa 2,9 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg. La popolazione di cellule T ingegnerizzate può venire crioconservata a una dose predeterminata di circa 1 milione di cellule T ingegnerizzate per chilogrammo di peso corporeo (cellule/kg). La popolazione di cellule T ingegnerizzate può venire crioconservata a una dose predeterminata di da circa 500.000 fino a circa 1 milione di cellule T ingegnerizzate/kg. La popolazione di cellule T ingegnerizzate può venire crioconservata a una dose predeterminata di almeno circa 1 milione, almeno circa 2 milioni, almeno circa 3 milioni, almeno circa 4 milioni, almeno circa 5 milioni, almeno circa 6 milioni, almeno circa 7 milioni, almeno circa 8 milioni, almeno circa 9 milioni, almeno circa 10 milioni di cellule T ingegnerizzate/kg. In altri aspetti, la popolazione di cellule T ingegnerizzate può venire crioconservata a una dose predeterminata di meno di 1 milione di cellule/kg, 1 milione di cellule/kg, 2 milioni di cellule/kg, 3 milioni di cellule/kg, 4 milioni di cellule/kg, 5 milioni di cellule/kg, 6 milioni di cellule/kg, 7 milioni di cellule/kg, 8 milioni di cellule/kg, 9 milioni di cellule/kg, 10 milioni di cellule/kg, più di 10 milioni di cellule/kg, più di 20 milioni di cellule/kg, più di 30 milioni di cellule/kg, più di 40 milioni di cellule/kg, più di 50 milioni di cellule/kg, più di 60 milioni di cellule/kg, più di 70 milioni di cellule/kg, più di 80 milioni di cellule/kg, più di 90 milioni di cellule/kg o più di 100 milioni di cellule/kg. La popolazione di cellule T ingegnerizzate può venire crioconservata a una dose predeterminata di da circa 1 milione fino a circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate/kg. La popolazione di cellule T ingegnerizzate può venire crioconservata a una dose predeterminata fra circa 1 milione di cellule e circa 2 milioni di cellule/kg, circa

1 milione di cellule e circa 3 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 4 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 5 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 6 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 7 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 8 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 9 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 10 milioni di cellule/kg. La dose predeterminata della popolazione di cellule T ingegnerizzate può venire calcolata in base al peso corporeo di un soggetto. La popolazione di cellule T ingegnerizzate può venire crioconservata in circa 0,5-200 ml di terreni di crioconservazione. La popolazione di cellule T ingegnerizzate può venire crioconservata in circa 0,5 ml, circa 1,0 ml, circa 5,0 ml, circa 10,0 ml, circa 20 ml, circa 30 ml, circa 40 ml, circa 50 ml, circa 60 ml, circa 70 ml, circa 80 ml, circa 90 ml o circa 100 ml di terreni di crioconservazione. La popolazione di cellule T ingegnerizzate può venire crioconservata in circa 10-30 ml, circa 10-50 ml, circa 10-70 ml, circa 10-90 ml, circa 50-70 ml, circa 50-90 ml, circa 50-110 ml, circa 50-150 ml o circa 100-200 ml di terreni di crioconservazione. La popolazione di cellule T ingegnerizzate può venire preferibilmente crioconservata in circa 50-70 ml di terreni di crioconservazione.

I metodi descritti in questa sede vengono usati per produrre una popolazione di cellule T ingegnerizzate che può venire usata per trattare una malattia o condizione patologica in un soggetto avente la malattia o condizione patologica somministrando una quantità terapeuticamente efficace o dose terapeuticamente efficace delle cellule T ingegnerizzate al soggetto. Come tale, una popolazione di cellule T ingegnerizzate che esprime un recettore della superficie cellulare che riconosce una parte antigenica specifica sulla superficie di una cellula bersaglio può venire prodotta mediante un metodo fornito in questa sede. Condizioni patogene che possono venire trattate con cellule T ingegnerizzate che vengono prodotte mediante i metodi descritti in questa sede comprendono, ma non sono limitate a queste, cancro, infezione virale, infiammazione acuta o cronica, malattia autoimmune o qualsiasi altra disfunzione immunitaria. In una realizzazione, le cellule T ingegnerizzate sono destinate all'uso nel trattamento di un paziente affetto da cancro, in cui il paziente affetto da cancro e il soggetto donatore sono preferibilmente lo stesso individuo. Esempi di trattamento di pazienti con dosi di cellule T ingegnerizzate possono venire trovati in Kochenderfer, et al., *J Clin Oncol.* 25 Ago 2014. pii: JCO.2014.56.2025 (intitolato

“Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor”) e Kochenderfer et al. *Blood*. 22 Mar 2012; 119(12):2709-20 (intitolato “B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells”), che forniscono dettagli riguardanti le pratiche standard di trattamento di pazienti con dosi di cellule T ingegnerizzate.

La popolazione di cellule T ingegnerizzate prodotta mediante i metodi suddescritti può comprendere una o più sottopopolazioni di cellule. Le una o più sottopopolazioni di cellule possono comprendere, senza limitazione, cellule T naïve, cellule T effettrici, cellule T della memoria effettrici e/o cellule T della memoria centrali. Come fornito nell'esempio 2 seguente, era inaspettato che usando i metodi descritti in questa sede, oltre a diminuire semplicemente la durata della coltura da 10 giorni o più a 6 giorni, si potesse ottenere una maggiore distribuzione di cellule T giovani con rappresentazione aumentata di cellule T naïve e rappresentazione diminuita di cellule T effettrici differenziate. In certe realizzazioni, la popolazione di cellule T ingegnerizzate può comprendere una sottopopolazione di cellule T naïve. In certe realizzazioni, almeno circa il 34-43% della popolazione di cellule T ingegnerizzate può comprendere una sottopopolazione di cellule T naïve. In certe realizzazioni, almeno circa il 35% della popolazione di cellule T ingegnerizzate può comprendere una sottopopolazione di cellule T naïve. In certe realizzazioni, almeno circa il 40% della popolazione di cellule T ingegnerizzate può comprendere una sottopopolazione di cellule T naïve. In certe realizzazioni, almeno circa il 34%, almeno circa il 35%, almeno circa il 36%, almeno circa il 37%, almeno circa il 38%, almeno circa il 39%, almeno circa il 40%, almeno circa il 41%, almeno circa il 42%, almeno circa il 43% o almeno circa il 44% della popolazione di cellule T ingegnerizzate può comprendere una sottopopolazione di cellule T naïve. In certe realizzazioni, la popolazione di cellule T ingegnerizzate può comprendere una sottopopolazione di cellule T della memoria centrali. In certe realizzazioni, circa il 15% o meno della popolazione di cellule T ingegnerizzate può comprendere una sottopopolazione di cellule T della memoria centrali. In certe realizzazioni, circa il 15% o meno, circa il 14% o meno, circa il 13% o meno, circa il 12% o meno, circa l'11% o meno della popolazione di

cellule T ingegnerizzate può comprendere una sottopopolazione di cellule T della memoria centrali.

Quando riferito in questa sede, un “cancro” può essere qualsiasi cancro che è associato con un antigene superficiale o un marcatore canceroso comprendente, ma senza essere limitato a questi, leucemia linfoblastica acuta (ALL), leucemia mieloide acuta (AML), carcinoma cistico adenoide, carcinoma corticosurrenale, cancri correlati ad AIDS, cancro anale, cancro dell’appendice, astrocitoma, tumore teratoide/rabdoide atipico, sistema nervoso centrale, leucemia a cellule B, linfoma o altre malignità a cellule B, carcinoma a cellule basali, cancro del dotto biliare, cancro della vescica, cancro delle ossa, osteosarcoma e istiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco cerebrale, tumori cerebrali, cancro del seno, tumori bronchiali, linfoma di Burkitt, tumori carcinoidi, cancri del sistema nervoso centrale, cancro cervicale, cordoma, leucemia linfocitica cronica (CLL), leucemia mielogena cronica (CML), disturbi mieloproliferativi cronici, cancro del colon, cancro colorettales, craniofaringioma, linfoma a cellule T cutaneo, tumori embrionali, sistema nervoso centrale, cancro endometriale, ependimoblastoma, ependimoma, cancro esofageo, estensioneuroblastoma, famiglia di tumori del sarcoma di Ewing, tumore extracraniale delle cellule germinali, tumore extragonadale delle cellule germinali, cancro del dotto biliare extraepatico, cancro dell’occhio, istiocitoma fibroso dell’osso, maligno e osteosarcoma, cancro della cistifellea, cancro gastrico (stomaco), tumore carcinoide gastrointestinale, tumori stromali gastrointestinali (GIST), sarcoma dei tessuti molli, tumore delle cellule germinali, tumore trofoblastico gestazionale, glioma, leucemia a cellule capellute, cancro della testa e del collo, cancro del cuore, cancro epatocellulare (fegato), istiocitosi, linfoma di Hodgkin, cancro ipofaringeo, melanoma intraoculare, tumori delle cellule degli isolotti (pancreas endocrino), sarcoma di Kaposi, cancro del rene, istiocitosi delle cellule di Langerhans, cancro laringeo, leucemia, cancro delle labbra e della cavità orale, cancro del fegato (primario), carcinoma lobulare *in situ* (LCIS), cancro del polmone, linfoma, macroglobulinemia, cancro del seno maschile, istiocitoma fibroso maligno dell’osso e osteosarcoma, medulloblastoma, medulloepitelioma, melanoma, carcinoma a cellule di Merkel, mesotelioma, cancro del collo squamoso metastatico con carcinoma del tratto della linea mediana primario occulto che coinvolge il gene NUT, cancro della bocca, sindromi da neoplasia endocrina multipla, mieloma multiplo/neoplasma delle cellule plasmatiche, micosi fungoide, sindromi mielodisplastiche, neoplasmi

mielodisplastici/mieloproliferativi, leucemia mielogena, leucemia mieloide cronica (CML), acuta (AML), mieloma, multiplo, disturbi mieloproliferativi, cancro della cavità nasale e dei seni paranasali, cancro nasofaringeo, neuroblastoma, linfoma non-Hodgkin, cancro del polmone a cellule non piccole, cancro orale, cancro della cavità orale, cancro orofaringeo, osteosarcoma e istiocitoma fibroso maligno dell'osso, cancro dell'ovaio, cancro pancreatico, papillomatosi, paraganglioma, cancro del seno paranasale e della cavità nasale, cancro paratiroideo, cancro penile, cancro faringeo, feocromocitoma, tumori parenchimali pineali di differenziazione intermedia, pineoblastoma e tumori neuroectodermici primitivi sovratentoriali, tumore pituitario, neoplasma delle cellule plasmatiche/mieloma multiplo, blastoma pleuropolmonare, cancro della gravidanza e del seno, linfoma primario del sistema nervoso centrale (SNC), cancro della prostata, cancro rettale, cancro delle cellule renali (rene), pelvi renale e uretere, cancro delle cellule di transizione, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cancro della ghiandola salivare, sarcoma, sindrome di Sézary, cancro del polmone a cellule piccole, cancro dell'intestino tenue, sarcoma dei tessuti molli, carcinoma a cellule squamose, cancro del collo squamoso, cancro dello stomaco (gastrico), tumori neuroectodermici primitivi sovratentoriali, linfoma a cellule T, cutaneo, cancro testicolare, cancro della gola, timoma e carcinoma timico, cancro della tiroide, cancro delle cellule di transizione del pelvi renale e dell'uretere, tumore trofoblastico, cancro dell'uretere e del pelvi renale, cancro uretrale, cancro uterino, sarcoma uterino, cancro vaginale, cancro vulvare, macroglobulinemia di Waldenström, tumore di Wilms.

In alcuni aspetti, il cancro è una malignità a cellule B. Esempi di malignità a cellule B comprendono, ma non sono limitate a questi, linfomi non-Hodgkin (NHL), linfoma a cellule B grandi diffuse (DLBCL), linfoma linfocitico piccolo (SLL/CLL), linfoma a cellule mantellari (MCL), linfoma follicolare (FL), linfoma della zona marginale (MZL), linfoma a cellule grandi diffuse extranodale (linfoma MALT), nodale (linfoma a cellule B monocitoidi), splenico, leucemia linfocitica/linfoma cronico a cellule B, linfoma di Burkitt e linfoma linfoblastico.

Quando indicata in questa sede, una "infezione virale" può essere una infezione causata da qualsiasi virus che causa una malattia o condizione patologica nell'ospite. Esempi di infezioni virali che possono venire trattate con

le cellule T ingegnerizzate che vengono prodotte mediante i metodi descritti in questa sede comprendono, ma non sono limitate a queste, una infezione virale causata da un virus Epstein-Barr (EBV); una infezione virale causata da un virus dell'epatite A, un virus dell'epatite B o un virus dell'epatite C; una infezione virale causata da un virus herpes simplex tipo 1, un virus herpes simplex tipo 2 o un virus herpes simplex tipo 8, una infezione virale causata da un citomegalovirus (CMV), una infezione virale causata da un virus dell'immunodeficienza umana (HIV), una infezione virale causata da un virus dell'influenza, una infezione virale causata da un virus del morbillo o della parotite, una infezione virale causata da un papillomavirus umano (HPV), una infezione virale causata da un virus della parainfluenza, una infezione virale causata da un virus della rosolia, una infezione virale causata da un virus sinciziale respiratorio (RSV) o una infezione virale causata da un virus varicella-zoster. In alcuni aspetti, una infezione virale può portare a o condurre allo sviluppo di cancro in un soggetto con l'infezione virale (per esempio una infezione da HPV può causare o essere associata con lo sviluppo di diversi cancri, comprendenti i cancri cervicale, vulvare, vaginale, penile, anale, orofaringeo, e una infezione da HIV può causare lo sviluppo del sarcoma di Kaposi).

Esempi di malattie infiammatorie croniche, malattie autoimmuni o qualsiasi altra delle disfunzioni immunitarie che possono venire trattate con le cellule T ingegnerizzate prodotte mediante i metodi descritti in questa sede comprendono, ma non sono limitati a questi, sclerosi multipla, lupus e psoriasi.

Il termine "trattato", "trattare" o "trattamento" quando usato in questa sede con riferimento a una condizione o malattia può riferirsi a prevenzione di una condizione o malattia, rallentamento dell'insorgenza o della velocità di sviluppo della condizione o malattia, riduzione del rischio di sviluppo della condizione o malattia, prevenzione o ritardo dello sviluppo dei sintomi associati con la condizione o malattia, riduzione o interruzione dei sintomi associati con la condizione o malattia, generazione di una regressione completa o parziale della condizione o malattia, o qualche loro combinazione.

Una "quantità terapeutamente efficace" o una "dose terapeutamente efficace" è una quantità di cellule T ingegnerizzate che produce un effetto terapeutico desiderato in un soggetto, come prevenzione o trattamento di una condizione bersaglio o alleviamento di sintomi associati con la condizione uccidendo cellule bersaglio. I

risultati più efficaci in termini di efficacia di trattamento in un dato soggetto varieranno a seconda di una varietà di fattori comprendenti, ma senza essere limitati a questi, le caratteristiche delle cellule T ingegnerizzate (comprendenti longevità, attività, farmacocinetiche, farmacodinamiche e biodisponibilità), la condizione fisiologica del soggetto (comprendente età, sesso, tipo e stadio della malattia, condizione fisica generale, responsività a un dato dosaggio e tipo di medicazione), la natura di qualsiasi veicolante, o veicolanti, farmaceuticamente accettabile in qualsiasi composizione usata, e la via di somministrazione. Una dose terapeuticamente efficace di cellule T ingegnerizzate dipende anche dal recettore della superficie cellulare che viene espresso mediante le cellule T (per esempio l'affinità e la densità dei recettori della superficie cellulare espressi sulla cellula), il tipo di cellula bersaglio, la natura della malattia o condizione patologica che viene trattata, o una combinazione di entrambi. Quindi, in alcuni aspetti, una dose terapeuticamente efficace di cellule T ingegnerizzate trasdotte è da circa 1 milione fino a circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte per chilogrammo di peso corporeo (cellule/kg). Quindi, in alcuni aspetti, una dose terapeuticamente efficace di cellule T ingegnerizzate trasdotte è da circa 1 milione fino a circa 3 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg. In certi aspetti, la dose terapeuticamente efficace è circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg. In certi aspetti, la dose terapeuticamente efficace è almeno circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg. In certi aspetti, la dose terapeuticamente efficace è almeno circa 1 milione, almeno circa 2 milioni, almeno circa 3 milioni, almeno circa 4 milioni, almeno circa 5 milioni, almeno circa 6 milioni, almeno circa 7 milioni, almeno circa 8 milioni, almeno circa 9 milioni, almeno circa 10 milioni di cellule T ingegnerizzate/kg. In altri aspetti, la dose terapeuticamente efficace può essere meno di 1 milione di cellule/kg, 1 milione di cellule/kg, 2 milioni di cellule/kg, 3 milioni di cellule/kg, 4 milioni di cellule/kg, 5 milioni di cellule/kg, 6 milioni di cellule/kg, 7 milioni di cellule/kg, 8 milioni di cellule/kg, 9 milioni di cellule/kg, 10 milioni di cellule/kg, più di 10 milioni di cellule/kg, più di 20 milioni di cellule/kg, più di 30 milioni di cellule/kg, più di 40 milioni di cellule/kg, più di 50 milioni di cellule/kg, più di 60 milioni di cellule/kg, più di 70 milioni di cellule/kg, più di 80 milioni di cellule/kg, più di 90 milioni di cellule/kg o più di 100 milioni di cellule/kg. In altri aspetti, la dose terapeuticamente efficace può essere fra circa 1 milione di cellule e circa 2

milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 3 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 4 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 5 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 6 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 7 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 8 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 9 milioni di cellule/kg, circa 1 milione di cellule e circa 10 milioni di cellule/kg. In alcuni aspetti, la dose terapeuticamente efficace totale (cellule trasdotte per paziente) può essere fino a circa  $1e6$  cellule trasdotte, fra circa  $1e6$  e circa  $1e7$  cellule trasdotte, fra circa  $1e7$  e circa  $1e8$  cellule trasdotte, fra circa  $1e8$  e circa  $1e9$  cellule trasdotte, fra circa  $1e9$  e circa  $1e10$  cellule trasdotte, fra circa  $1e10$  e circa  $1e11$  cellule trasdotte, circa  $1e11$  cellule trasdotte, o oltre circa  $1e11$  cellule trasdotte. In un aspetto, la dose terapeuticamente efficace può essere fra circa  $1e8$  e circa  $2e8$  cellule trasdotte. Un esperto nelle tecniche cliniche e farmacologiche sarà in grado di determinare una quantità terapeuticamente efficace tramite sperimentazione ordinaria, vale a dire controllando la risposta di un soggetto alla somministrazione di un composto e regolando il dosaggio di conseguenza. In certe realizzazioni, il recettore della superficie cellulare che viene espresso mediante le cellule T ingegnerizzate è un CAR anti-CD19. Il CAR anti-CD19 può essere un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ come esposto in Kochenderfer et al., *J Immunother.* Settembre 2009; 32(7): 689-702, che descrive metodi di costruzione dei vettori usati per produrre cellule T che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ. La dose terapeuticamente efficace di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ può essere più di circa 1 milione fino a meno di circa 3 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte per chilogrammo di peso corporeo (cellule/kg). La dose terapeuticamente efficace di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ può essere più di 1 milione fino a circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte per chilogrammo di peso corporeo (cellule/kg). La dose terapeuticamente efficace di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ può essere da circa 2 milioni fino a meno di circa 3 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg. In certi aspetti, la dose terapeuticamente efficace di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ è circa 2,0 milioni, circa 2,1 milioni, circa 2,2 milioni, circa 2,3 milioni, circa 2,4 milioni, circa 2,5

milioni, circa 2,6 milioni, circa 2,7 milioni, circa 2,8 milioni o circa 2,9 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg. La dose terapeuticamente efficace preferita di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ è circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg. In certi aspetti, la dose terapeuticamente efficace di cellule T ingegnerizzate che esprimono un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ è almeno circa 2 milioni di cellule T ingegnerizzate trasdotte/kg.

Una composizione farmaceutica può comprendere una popolazione di cellule T ingegnerizzate prodotta mediante i metodi descritti in questa sede. La composizione farmaceutica può anche comprendere un veicolante farmaceuticamente accettabile. Un veicolante farmaceuticamente accettabile può essere un materiale, una composizione o un veicolo farmaceuticamente accettabile che è coinvolto nella veicolazione o nel trasporto di cellule di interesse da un tessuto, organo o una porzione del corpo a un altro tessuto, organo o porzione del corpo. Per esempio, il veicolante può essere una carica liquida o solida, un diluente, eccipiente, solvente o materiale incapsulante, o qualche loro combinazione. Ciascun componente del veicolante deve essere “farmaceuticamente accettabile” in quanto deve essere compatibile con gli altri ingredienti della formulazione. Esso deve essere anche adatto per il contatto con qualsiasi tessuto, organo o porzione del corpo che può incontrare, significando che non deve comportare un rischio di tossicità, irritazione, risposta allergica, immunogenicità o qualsiasi altra complicazione che superi eccessivamente i suoi benefici terapeutici.

Il termine “circa” quando usato in questa sede significa entro il 5% o il 10% di un valore o un intervallo di valori indicato.

#### **ESEMPIO 1: preparazione di cellule autologhe gene-modificate *ex vivo***

Una panoramica di un procedimento di produzione di cellule T esemplificativo (il procedimento “migliorato”) viene fornita nella figura 1. Questo procedimento migliorato comprende miglioramenti a un procedimento usato tradizionalmente di produzione di cellule T (il procedimento “precedente”) (vedere la FIGURA 2 che illustra questi miglioramenti), pur mantenendo le caratteristiche del prodotto di cellule T. Specificamente, il procedimento migliorato è un procedimento chiuso che inaspettatamente è in grado di eliminare l’uso di siero. Inoltre, questo procedimento migliorato usa una trasduzione a ciclo singolo per produrre una popolazione di

cellule T trasdotte. Inoltre, cellule che subiscono espansione per un totale di 6 giorni usando questo procedimento presentano un profilo immuno-fenotipico più giovane rispetto a cellule che subiscono espansione per 10 giorni cellule. Questo procedimento è in grado di produrre in modo riproducibile un prodotto con un numero bersaglio di cellule T transfettate che esprimono un recettore di un antigene chimerico (CAR) per, per esempio, CD19; tuttavia, questi metodi si applicano a cellule T trasdotte con qualsiasi CAR.

Specificamente, il procedimento è progettato per essere compatibile con un prodotto di aferesi raccolto usando una apparecchiatura e procedure di aferesi standard, arricchire l'aferesi del soggetto per linfociti e attivare le cellule T del soggetto durante un periodo di coltura definito in presenza di IL-2 ricombinante e anticorpo anti-CD3, fornire un ambiente di coltura *ex vivo* in cui le cellule T sopravvivono e proliferano selettivamente, transfettare le cellule T del soggetto usando un vettore retrovirale ingegnerizzato per esprimere un recettore dell'antigene chimerico CD19 entro un intervallo di efficienza di transfezione compatibile, ridurre le impurità correlate al prodotto a livelli compatibili (le impurità correlate al prodotto comprendono cellule non T nel materiale di partenza proveniente dal soggetto), e ridurre le impurità correlate al procedimento a livelli compatibili (le impurità correlate al procedimento comprendono terreni di crescita, citochine e altri reagenti del procedimento).

*Raccolta per aferesi.* Globuli bianchi sono stati raccolti (leucaferesi) usando una apparecchiatura per aferesi standard come Cobe® Spectra, Spectra Optia®, Fenwal™ Amicus® o equivalente. Il procedimento di leucaferesi ha fornito tipicamente approssimativamente 200-400 ml di prodotto di aferesi da pazienti. Il prodotto di aferesi può venire sottoposto al procedimento di produzione sul posto o, opzionalmente, trasportato a 1-10°C a un impianto per venire sottoposto al procedimento di produzione in una posizione diversa. Ulteriori fasi del procedimento possono venire condotte in un ambiente per un processo di coltura cellulare ISO 7 (o ambiente tipo camera sterile simile), come delineato nella figura 1.

*Riduzione del volume.* Quando appropriato, una fase di riduzione del volume del procedimento migliorato è stata eseguita usando uno strumento per il trattamento di cellule come lo strumento da laboratorio Sepax® 2 (Biosafe SA; Houston, TX) o equivalente, ed eseguito usando un kit di tubazioni asettiche standard. Data la variabilità nel

numero di cellule e nel volume di materiale di origine in ingresso da ciascun soggetto (approssimativamente 200-400 ml), la fase di riduzione del volume è progettata per standardizzare il volume di cellule ad approssimativamente 120 ml. Nel caso in cui il volume di aferesi sia meno di 120 ml, non è necessario che la fase di riduzione del volume venga eseguita, e le cellule vengono trasportate direttamente alla fase di arricchimento in linfociti. La fase di riduzione del volume è progettata per standardizzare il volume di cellule ricevuto da ciascun soggetto, trattenere cellule mononucleari, ottenere una resa cellulare compatibile e alta vitalità cellulare, e mantenere un sistema chiuso per minimizzare il rischio di contaminazione.

*Arricchimento in linfociti.* Dopo la fase di riduzione del volume, le cellule sono state sottoposte a separazione basata su Ficoll su uno strumento per il trattamento di cellule, come il Sepax<sup>®</sup> 2 o equivalente, usando il protocollo di separazione sviluppato e raccomandato dal produttore dello strumento (NeatCell Program) e usando un kit di tubazioni asettiche standard. La fase di arricchimento in linfociti riduce le impurità correlate al prodotto come RBC e granulociti, arricchisce e concentra le cellule mononucleari, lava e riduce residui correlati al procedimento come Ficoll, e formula le cellule in terreni di crescita in preparazione per l'attivazione delle cellule, ottenendo anche una resa cellulare compatibile e alta vitalità cellulare. Il sistema chiuso minimizza la contaminazione ambientale.

Il procedimento può venire eseguito in un'area ISO 7 a temperatura ambiente e tutte le connessioni possono venire condotte usando un saldatore per tubazioni sterili, o eseguite in una cappa a flusso laminare ISO 5.

*Attivazione delle cellule T.* La fase di attivazione delle cellule T può venire eseguita con cellule appena trattate provenienti dall'arricchimento in linfociti, o con cellule precedentemente crioconservate. Nel caso in cui vengano usate cellule crioconservate, le cellule possono venire scongelate usando protocolli sviluppati prima dell'uso.

La fase di attivazione delle cellule T attiva selettivamente le cellule T per diventare recettive per la trasduzione di un vettore retrovirale, riduce la popolazione viva di tutti gli altri tipi di cellule, fornisce una resa cellulare compatibile e alta vitalità di cellule T, e mantiene un sistema chiuso per minimizzare il rischio di contaminazione.

*Lavaggio 1.* Dopo la fase di attivazione delle cellule T, le cellule sono state lavate usando una apparecchiatura per il trattamento di cellule, come la Sepax<sup>®</sup> 2 o equivalente, con terreni di coltura freschi in un kit asettico standard usando protocolli sviluppati dal produttore. Le cellule sono state opzionalmente concentrate a un volume finale di approssimativamente 100 ml in preparazione della trasduzione con il vettore retrovirale. La fase di lavaggio 1 riduce i residui correlati al procedimento come anticorpo anti-CD3, terreni di crescita esauriti e frammenti cellulari; ottiene una resa cellulare compatibile e alta vitalità di cellule T, mantiene un sistema chiuso per minimizzare il rischio di contaminazione; e concentra e fornisce un numero sufficiente di cellule T vive in un piccolo volume appropriato per l'inizio della trasduzione.

*Trasduzione retrovirale.* Cellule attivate ottenute dalla fase di lavaggio 1 in terreni di crescita cellulare freschi sono state trasferite a una sacca di coltura cellulare (Origen Biomedical PL240 o paragonabile) che era stata precedentemente preparata rivestendo dapprima la sacca con fibronectina ricombinante o suoi frammenti come RetroNectin<sup>®</sup> (Takara Bio, Giappone), e successivamente incubata con vettore retrovirale secondo procedure definite prima dell'introduzione delle cellule attivate. Il rivestimento con RetroNectin<sup>®</sup> (10 µg/ml) è stato eseguito a una temperatura di 2-8°C per  $20 \pm 4$  h, lavato con tampone diluito, e successivamente incubato con vettore retrovirale scongelato per approssimativamente 180-210 min a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $5 \pm 0,5\%$  di CO<sub>2</sub>. Dopo l'aggiunta delle cellule alla sacca, la trasduzione è stata eseguita per  $20 \pm 4$  h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $5 \pm 0,5\%$  di CO<sub>2</sub>. La fase di trasduzione retrovirale mette in coltura le cellule T attivate in presenza del vettore retrovirale in condizioni controllate per permettere che avvenga trasduzione efficiente, ottiene resa cellulare compatibile e alta vitalità cellulare, e mantiene un sistema chiuso per minimizzare il rischio di contaminazione.

*Lavaggio 2.* Dopo la fase di trasduzione retrovirale, le cellule sono state lavate con terreni di crescita freschi usando una apparecchiatura per il trattamento di cellule, come la Sepax<sup>®</sup> 2 o equivalente, in un kit asettico standard usando protocolli sviluppati dal produttore, e le cellule sono state concentrate a un volume finale di approssimativamente 100 ml in preparazione per la fase di espansione. La fase di lavaggio 2 è progettata per ridurre residui correlati al procedimento come particelle di vettore retrovirale, residui del procedimento di produzione del vettore, terreni di crescita esauriti e frammenti cellulari, ottenere resa cellulare compatibile e alta

vitalità cellulare; mantenere un sistema chiuso per minimizzare il rischio di contaminazione; e sostituire i terreni di crescita esauriti con terreni freschi con un numero bersaglio di cellule in un volume specificato appropriato per l'inizio della fase di espansione.

*Espansione delle cellule T.* Cellule ottenute dalla fase di lavaggio 2 sono state trasferite asetticamente a una sacca di coltura (Origen Biomedical PL325 o equivalente) e diluite con terreni di crescita cellulare freschi e messe in coltura per approssimativamente 72 h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $5 \pm 0,5\%$  di  $\text{CO}_2$ . La densità cellulare è stata misurata quotidianamente iniziando il giorno 5. Poiché i tempi di raddoppio delle cellule T possono variare leggermente da soggetto a soggetto, un tempo di crescita addizionale oltre 72 h (cioè 3-6 giorni) può essere necessario nel caso in cui il numero di cellule totale sia insufficiente per fornire una dose bersaglio di cellule T CAR-positive/kg di peso del soggetto. La fase di espansione delle cellule T è progettata per mettere in coltura le cellule in condizioni controllate per produrre un numero sufficiente di cellule trasdotte per fornire una dose efficace, mantenere un sistema chiuso per minimizzare il rischio di contaminazione, e ottenere una resa cellulare compatibile e alta vitalità cellulare. Una dose efficace o dose bersaglio simile comprende  $2 \times 10^6$  cellule T positive a CAR FMC63-28Z o a CAR FMC63-CD828BBZ/kg ( $\pm 20\%$ ) di peso del soggetto che sono state prodotte tramite trasduzione con, rispettivamente, il vettore retrovirale MSGV-FMC63-28Z o il vettore retrovirale MSGV-FMC63-CD828BBZ, entrambi i quali sono descritti in dettaglio in Kochenderfer et al., *J Immunother.* Settembre 2009; 32(7): 689-702.

*Lavaggio 3 e concentrato.* Dopo la fase di espansione delle cellule T, le cellule sono state lavate con soluzione salina allo 0,9% usando uno strumento per il trattamento di cellule, come il Sepax<sup>®</sup> 2 o equivalente, in un kit asettico standard usando protocolli sviluppati dal produttore, e le cellule sono state concentrate a un volume finale di approssimativamente 35 ml in preparazione per la formulazione e crioconservazione. La fase di lavaggio 3 è progettata per ridurre i residui correlati al procedimento come residui del procedimento di produzione retrovirale, terreni di crescita esauriti e frammenti cellulari; ottenere una resa cellulare compatibile e alta vitalità cellulare; e mantenere un sistema chiuso per minimizzare il rischio di contaminazione.

Una volta che le cellule sono state concentrate e lavate in soluzione salina allo 0,9%, una dose di cellule

appropriata può venire formulata per la preparazione del prodotto crioconservato finale. Le cellule sono state preparate per la crioconservazione e crioconservate secondo i metodi forniti in seguito nell'esempio 4.

### **ESEMPIO 2: prestazione di crescita di cellule T espanse in sacche di coltura cellulare**

Le realizzazioni descritte in questa sede forniscono produzione efficiente di terapia con cellule T autologhe ingegnerizzate in 6 giorni. Sono stati ottenuti i miglioramenti seguenti rispetto alla tecnica: un procedimento accorciato a 6 giorni invece di 24, 14 o 10 giorni usati precedentemente (questo riduce il numero di test necessari per il rilascio del prodotto (compresa valutazione RCR)); prodotti di cellule T migliorati, comprendenti una proporzione maggiore di cellule T giovani per potenza ed efficacia aumentate; una coltura che può venire iniziata con un numero maggiore di cellule per compensare il tempo di produzione minore; un sistema chiuso in cui eseguire le fasi dei metodi descritti in questa sede; identificazione di condizioni di coltura prive di siero umano che sostengono la crescita di cellule T; trasduzione di retrovirus a ciclo singolo in sacche; attivazione della coltura cellulare ed espansione eseguite in sacche anziché in palloni; e fornitura di un prodotto congelato. Questi miglioramenti sono stati usati per lo sviluppo e la commercializzazione di nuovi prodotti terapeutici di cellule T autologhe di sangue periferico ingegnerizzate (eACT) per il trattamento di più indicazioni di cancro. Le cellule T derivanti dal programma di sviluppo hanno mantenuto lo stesso profilo fenotipico e di attività come cellule propagate mediante metodi precedenti.

*Generazione di cellule T ingegnerizzate.* La figura 2 mostra una panoramica del procedimento di produzione di cellule T con i miglioramenti descritti in questa sede nel procedimento migliorato. In breve, cellule mononucleari di sangue periferico (PBMC) sono state ottenute da soggetti aventi malignità a cellule B mediante aferesi, separate e trattate parallelamente usando le tecniche precedenti e le tecniche migliorate descritte in questa sede. Cinque studi hanno valutato tutte le fasi del procedimento attraverso la crescita al giorno 6, ma non le operazioni finali di lavaggio e crioconservazione. In due studi addizionali, il procedimento migliorato è stato eseguito dal trattamento iniziale del materiale di aferesi fino alle fasi finali di formulazione e congelamento, nuovamente usando il prodotto di aferesi ottenuto da pazienti con linfoma.

Il prodotto di aferesi (o "campione") è stato arricchito in linfociti mediante separazione Ficoll delle PBMC

mediante un procedimento Sepax 2 chiuso. I linfociti sono quindi stati fatti crescere in sacche di coltura chiuse in terreno privo di siero (OpTmizer™, Life Technologies) additivato con una aggiunta prototipo evolutiva (T cell SR Media Supplement, Life Technologies) e stimolati per l'attivazione di cellule T con anticorpo anti-CD3 e rIL-2 (IL-2 ricombinante) per 48 ore (giorni 0-2). Le cellule T attivate sono quindi state lavate usando un procedimento Sepax 2 chiuso.

I giorni 2-3 del procedimento di produzione, le cellule T attivate sono state trasdotte con un CAR anti-CD19 usando un vettore retrovirale gamma. La trasduzione è stata eseguita in un sistema chiuso come segue. Una sacca di coltura cellulare chiusa (cioè la sacca Origen PermaLife™ PL240) è stata rivestita con RetroNectin® a 2-10 µg/ml, quindi il RetroNectin® è stato rimosso e la sacca è stata lavata con soluzione salina tamponata. Il retrovirus gamma è stato quindi introdotto nella sacca a sistema chiuso, facendo seguire un periodo di incubazione. Le cellule T attivate sono quindi state aggiunte direttamente nella sacca contenente il vettore retrovirale facendo seguire incubazione per una notte a 37°C. Il materiale ottenuto dalla sacca di coltura rivestita con RetroNectin® è stato rimosso e posto in una sacca di coltura cellulare separata per l'espansione cellulare. Una fase di lavaggio opzionale può venire aggiunta prima dell'espansione delle cellule. Le cellule T trasdotte sono state espanse in un sistema a sacca chiusa senza antibiotici per 3 giorni (giorni 3-6). Le cellule T ingegnerizzate risultanti sono quindi state raccolte e crioconservate (la crioconservazione è una fase opzionale).

*Fenotipo di cellule T ingegnerizzate.* Le cellule T ingegnerizzate sono state analizzate mediante selezione delle cellule attivate da fluorescenza (FACS) per (i) confermare l'espressione del gene CAR, (ii) confermare la purezza della popolazione di cellule T, e (iii) determinare i fenotipi cellulari presenti nella popolazione di cellule T ingegnerizzate usando l'espressione sulla superficie cellulare di marcatori delle sottoserie di cellule T CCR7, CD45RA, CD62L e marcatori della competenza funzionale CD27 e CD28.

*Attività delle cellule T ingegnerizzate.* Le cellule T ingegnerizzate sono anche state analizzate usando un biosaggio in co-cultura *in vitro* per misurare la produzione di interferone gamma (IFNγ) mediante le cellule T ingegnerizzate dopo co-cultura con cellule bersaglio positive all'antigene (Ag) (cioè CD19+). Le cellule T ingegnerizzate sono anche state analizzate per la produzione intracellulare di interferone gamma (IFNγ)

mediante le cellule T ingegnerizzate e l'espressione di CD107a dopo co-cultura con cellule bersaglio positive ad Ag mediante FACS.

*Studi di crescita.* La crescita e la vitalità delle cellule T sono state valutate in ciascun esperimento per assicurare che la crescita cellulare fosse robusta, coerente e simile (o migliore) a quella in studi convenzionali.

*Crioconservazione.* Le cellule sono state lavate il giorno 6 con soluzione salina normale, quindi è stata aggiunta HSA al 5%, e le cellule sono state miscelate 1:1 con CryoStor™ 10 (BioLife Solutions™). Le cellule sono quindi state congelate in un congelatore a velocità controllata usando un ciclo di congelamento definito, quindi conservate in azoto liquido in fase vapore. È stato dimostrato che cellule fra circa  $1 \times 10^6$  e  $1,5 \times 10^7$  per ml possono venire crioconservate e scongelate con successo mediante questo procedimento. Soluzione salina con HSA era valida o migliore rispetto ad altre soluzioni testate (per esempio PL/D5), e HSA ha migliorato il recupero da congelamento-scongelo.

Le cellule sono state valutate per la vitalità al momento dello scongelamento mediante esclusione con blu tripano nonché FACS (FACS basata su colorazione per annessina V nonché 7AAD). Le cellule hanno mantenuto il loro fenotipo e funzionalità biologica quando misurate mediante IFN-gamma dopo scongelamento.

## **Risultati**

Studi di crescita sono stati condotti in terreni privi di siero in congiunzione con integratori di crescita nel terreno. In questi studi, la prestazione era variabile, e il successo è stato definito come un terreno che ha portato a un fenotipo simile a quello del terreno (AIMV) contenente il 5% di siero umano. Il terreno privo di siero usato nei metodi suddescritti ha portato a eccellente crescita delle cellule T e a un fenotipo che era simile alla crescita in AIMV. Una osservazione imprevista consisteva nel fatto che per ottenere crescita e vitalità eccellenti, le cellule devono venire fatte passare quando la densità cellulare ha raggiunto approssimativamente  $1,5 \times 10^6$ /ml. Se le cellule non sono state fatte passare circa a questa concentrazione cellulare, la vitalità può diminuire. Nell'intervallo di approssimativamente 0,4 fino a  $1,5 \times 10^6$ /ml, tuttavia, le cellule sono cresciute bene con un tempo di raddoppio di 24 ore o meno in coltura a 37°C in palloni o sistemi a sacca chiusa.

Il procedimento per generare cellule T ingegnerizzate in cui un nuovo gene recettore viene introdotto in cellule T

usando un vettore retrovirale gamma, richiede che le cellule siano in crescita attiva cosicché possano venire trasdotte con successo. Nella presente, le cellule T sono state trasdotte con un CAR anti-CD19, ma il procedimento descritto in questa sede può venire usato per qualsiasi CAR o TCR. È stato dimostrato che la crescita di cellule T umane può venire stimolata nel terreno OpTmizer™ usando anticorpo anti-CD3 e IL2 in palloni T aperti o in un sistema a sacca di coltura cellulare chiusa. FACS è stata usata per dimostrare che cellule colorate con CFSE crescono ugualmente bene in terreno OpTmizer™ o AIMV più il 5% di siero umano durante questa stimolazione. Sebbene la crescita di cellule T sia stata osservata ad altri tempi di incubazione, è stato dimostrato che una incubazione di 2 giorni con anticorpo anti-CD3 e IL2 è ottimale per ottenere crescita attiva delle cellule nel terreno OpTmizer™.

Una varietà di condizioni sono state valutate per osservare la trasduzione nel terreno OpTmizer™ in un sistema a sacca chiusa. Un aspetto nuovo della presente invenzione è l'ordine specifico delle fasi che sono state sviluppate per ottenere trasduzione in un sistema a sacca chiusa in terreno OpTmizer™. Il procedimento descritto ha il vantaggio che è operativamente semplice, ma fornisce una frequenza di trasduzione che è simile a condizioni usate precedentemente. È stato appreso che fasi precedentemente incluse in protocolli di trasduzione non erano necessarie (per esempio bloccaggio di superfici rivestite con proteine come HSA). La frequenza di trasduzione non viene impattata da un lavaggio delle cellule dopo rimozione dalla sacca di coltura cellulare rivestita con RetroNectin®.

L'analisi fenotipica di cellule a 6 giorni o 10 giorni post-inizio del procedimento di stimolazione ha rivelato che in terreno OpTmizer™ le cellule sono generalmente simili a cellule cresciute in terreno AIMV in sacche simili o nel sistema a piastra in uso generale (vedere le FIGURE 4-5). Analogamente, le cellule prodotte nel sistema a sacca a procedimento chiuso semplice in terreno OpTmizer™ sono in grado di produrre IFN gamma in risposta a cellule bersaglio Ag-positive in un saggio di co-cultura *in vitro*, il che dimostra che le cellule T prodotte mediante questo procedimento migliorato sono biologicamente attive.

La tabella 1 seguente mostra la produzione di IFN gamma (pg/ml) il giorno 6 usando il procedimento migliorato descritto in questa sede.

**Tabella 1**

	Linee cellulari CD19+			Linee cellulari CD19-	
	Toledo	Nalm6	CD19-K562	NGFR-K562	CEM
<b>UT precedente</b>	0	5	17	17	5
<b>UT migliorato</b>	0	228	56	5	17
<b>TD precedente</b>	11269	13986	64911	43	17
<b>TD migliorato</b>	11101	16883	104324	70	0
<b>Controllo</b>	11942	19818	81165	30	5

I campioni provenivano da una prova di ingegnerizzazione a scala intera

UT - non trasdotte; TD - trasdotte

Un'altra osservazione inaspettata consisteva nel fatto che la semplice diminuzione della durata di coltura da 10 giorni o più ai presenti 6 giorni ha portato a una distribuzione di cellule T più giovani con rappresentazione aumentata di cellule della memoria centrali, naïve e rappresentazione diminuita di cellule T effettrici differenziate (vedere le FIGURE 4-5). Questo ha un impatto benefico sulla potenza del prodotto e altri attributi. Specificamente, cellule sufficienti sono in grado di venire raccolte dal prodotto espanso dopo solo 3 giorni in coltura. Il tempo totale dall'inizio della stimolazione fino alla raccolta di cellule trasdotte espanse è 6 giorni, il che sostiene una dose di approssimativamente  $1-2 \times 10^8$  cellule CAR-positive (FIGURA 6). Se è richiesto un numero di cellule maggiore, le cellule continuano a crescere in modo robusto in sacche e una coltura cellulare a 10 giorni o più può venire raccolta. In alternativa, un numero maggiore di cellule nella popolazione di partenza può venire utilizzato per generare una popolazione di cellule maggiore nel periodo di 6 giorni.

Inoltre, sono stati condotti due studi in scala completa con aferesi da pazienti con linfoma in cui le cellule al giorno 6 sono state inoltre lavate in soluzione salina allo 0,9%, formulate nella formulazione di prodotto finale e crioconservate. Il prodotto di cellule al giorno 6 è stato valutato pre- e post-scongelo per un certo numero di parametri. Non vi è stata una differenza significativa nella percentuale di cellule T CAR-positive 3 giorni post-scongelo rispetto al livello pre-congelamento, suggerendo che il protocollo di crioconservazione non è dannoso per l'espressione di CAR. Inoltre, le cellule CAR-positive hanno continuato a dimostrare

riconoscimento dell'antigene CD19-specifico come misurato mediante rilascio di IFN-gamma dopo co-coltura con bersagli CD19-positivi. La vitalità delle cellule al momento dello scongelamento era, rispettivamente, 90% e 79% per i due prodotti testati.

### **ESEMPIO 3: sviluppo di condizioni di trasduzione in un sistema chiuso**

Precedentemente, trasduzione di PBMC è stata eseguita in piastre a 6 pozzetti non trattate per coltura tissutale. Le piastre sono state rivestite con RetroNectin® a 10 µg/ml per una notte a 2-8°C, o per 2 h a temperatura ambiente. Dopo incubazione, RetroNectin® è stato rimosso, e le piastre sono state bloccate con HSA al 2,5% per 30 min, facendo seguire lavaggio con HBSS + HEPES 5 mM. Nel procedimento basato su piastre, il vettore retrovirale è stato applicato nel pozzetto rivestito e centrifugato in una centrifuga, facendo seguire rimozione di approssimativamente il 75% del supernatante virale, facendo seguire aggiunta delle cellule per la trasduzione mediante spinoculazione.

Come fornito in questa sede, sono stati completati tre studi per ottimizzare la concentrazione di RetroNectin® per la trasduzione di PBMC in sacche di coltura cellulare chiuse, e per determinare se il lavaggio con HSA e la rimozione del supernatante virale hanno impattato la trasduzione. Il primo esperimento è stato eseguito in sacche Origen PermaLife™ PL07, in cui attivazione, trasduzione ed espansione delle cellule sono state condotte in terreno AIM V® + 5% di siero umano. Un intervallo della concentrazione di RetroNectin® da 2 fino a 40 µg/ml è stato valutato in PBMC ottenute da tre donatori separati. Non vi erano differenze significative fra la trasduzione in piastre e la trasduzione in sacche a una concentrazione di RetroNectin® di 10 e 40 µg/ml, o la trasduzione eseguita senza bloccaggio con HSA al livello di confidenza del 95%. Tuttavia, allo stesso livello di confidenza, la riduzione della concentrazione di RetroNectin® a 2 µg/ml, o la rimozione di vettore retrovirale dalla sacca prima della trasduzione, sembra ridurre moderatamente l'efficienza di trasduzione come rappresentato nella tabella 2 seguente.

**Tabella 2.** Impatto della concentrazione di RetroNectin®, del bloccaggio con HSA e della rimozione del vettore retrovirale sulla trasduzione in sacche di coltura cellulare rispetto a trasduzione in piastre.

	% CAR+ CD3+						
	Non trasdotte	TD <sup>2</sup> in piastra	TD in sacca (2 µg/ml)	TD in sacca (10 µg/ml)	TD in sacca (40 µg/ml)	TD <sup>3</sup> in sacca, senza bloccaggio con HSA	TD3 in sacca, rimozione del vettore
PT1 <sub>1</sub>	0.670%	82.12%	74.80%	81.63%	76.62%	77.26%	67.70%
PT2 <sub>1</sub>	0.19%	80.25%	73.24%	78.39%	79.63%	82.75%	59.55%
PT3 <sub>1</sub>	0.81%	82.78%	72.39%	79.10%	-	75.80%	65.36%
Media	0.57%	81.70%	73.47%	79.70%	77.35%	75.13%	63.62%
Dev. Std.	0.33%	1.31%	1.22%	1.71%	2.01%	8.89%	5.76%
<sup>1</sup> PT1, PT2 e PT3 si riferiscono a PBMC ottenute da tre donatori separati. <sup>2</sup> TD si riferisce a trasduzione <sup>3</sup> Condizioni senza un bloccaggio con HSA o con rimozione del vettore retrovirale sono state condotte a una concentrazione di RetroNectin <sup>®</sup> di 10 µg/ml.							

Un secondo studio in terreno AIM V<sup>®</sup> + 5% di siero umano in sacche Origen PermaLife<sup>™</sup> PL07 usando PBMC ottenute da due donatori separati, ha confermato i risultati ottenuti dal primo studio e dimostrato che la massima efficienza di trasduzione in sacche si verifica nell'intervallo di 1-20 µg/ml di RetroNectin<sup>®</sup> (vedere la FIGURA 8). Inoltre, una fase di bloccaggio con HSA non migliora il procedimento o aumenta l'efficienza di trasduzione (vedere la FIGURA 9). Inoltre, lo studio ha dimostrato che il fenotipo delle cellule trasdotte (CD45RA/CCR7) non viene impattato dall'eliminazione della fase di bloccaggio con HSA.

In un terzo studio, PBMC provenienti da 2 donatori sono state stimulate in OpTmizer<sup>™</sup> + 2,5% di integratore in una sacca Origen PermaLife<sup>™</sup> PL70 o AIM V<sup>®</sup> + 5% di HSA per 2 giorni. Il giorno 2, le cellule sono state lavate e trasdotte con il vettore retrovirale in PL30 o piastre a 6 pozzetti. La concentrazione cellulare durante la trasduzione era  $0,5 \times 10^6$ /ml. Il giorno 3, le cellule trasdotte sono state trasferite in palloni T175 (come controllo) o sacche PL30. Il giorno 6 e 7, le cellule sono state valutate per la potenza nel saggio di co-coltura e mediante FACS per l'espressione di CAR e fenotipo. La figura 10 mostra l'impatto della concentrazione di RetroNectin<sup>®</sup> sulla frequenza di trasduzione in cui RetroNectin<sup>®</sup> oltre 5 µg/ml non ha avuto impatto sulla frequenza di

trasduzione in sacche. La figura 11 mostra che l'attività di cellule testate in queste condizioni era simile quando sono state valutate misure dell'attivazione cellulare (espressione di CD107a e produzione di IFN-gamma) in risposta al riconoscimento dell'antigene CD19 su cellule bersaglio. In questo caso, le cellule trasdotte sono state incubate con cellule Nalm6 CD19-positive per quattro ore, facendo seguire colorazione per l'espressione sulla superficie cellulare di CD107a, e per la produzione intracellulare di IFN-gamma.

Quindi, secondo i metodi forniti in questa sede, viene supportato un procedimento in cui le sacche sono: rivestite con RetroNectin® a 10 µg/ml; la trasduzione viene eseguita in sacche usando terreno OpTmizer™ + 2,5% di integratore; una fase di bloccaggio con HSA non ha avuto impatto sull'efficienza di trasduzione o impatto sulla potenza o sul fenotipo delle cellule; la trasduzione in sacche ha fornito prodotti di cellule T con fenotipo simile alla trasduzione in piastre; e la rimozione del vettore retrovirale prima dell'aggiunta delle cellule alla sacca durante la trasduzione non ha aumentato, e può diminuire leggermente, la frequenza di trasduzione globale.

#### **ESEMPIO 4: sviluppo della fase di crioconservazione per cellule T CAR+ anti-CD19 prodotte**

Una serie di studi di sviluppo è stata condotta per determinare le condizioni ottimali per la crioconservazione di cellule T CAR anti-CD19 prodotte. Gli studi sono stati progettati per stabilire condizioni per alta vitalità al momento dello scongelamento, una formulazione di prodotto congelato, un protocollo di congelamento ottimizzato, e per determinare l'impatto di congelamento-scongelo sul fenotipo e sulla potenza delle cellule. Le misure analitiche seguenti sono state impiegate per valutare la prestazione: conteggio delle cellule mediante esclusione con blu tripiano pre- e post-scongelo, colorazione con annessina mediante FACS post-scongelo, colorazione con FACS per determinare cellule T CAR+ e il fenotipo (CCR7, CD45RA), crescita in coltura di cellule crioconservate dopo scongelamento, e potenza mediante produzione di IFN-gamma dopo co-coltivazione con cellule CD19+.

PBMC trasdotte con vettore retrovirale sono state usate per valutare le misure di prestazione summenzionate. In studi di sviluppo, cellule crioconservate nell'intervallo di concentrazione di  $3-12 \times 10^6$ /ml sono state usate in un volume crioconservato finale di 20 ml. Si ritiene che la densità cellulare di prodotti clinici reali cada entro questo intervallo, in base al peso corporeo del soggetto e della frequenza di trasduzione di CAR. Studi sono stati

condotti in sacche OriGen CS50 o sacche AFC KryoSure® 20-F senza differenze evidenti.

Le cellule trasdotte sono state lavate e ri-sospese in una soluzione contenente soluzione salina allo 0,9% o una miscela 1:1 di PLASMA-LYTE® A e soluzione salina semi-normale D5 (5% di destrosio/0,45% di NaCl), con o senza albumina di siero umano (HSA). Le cellule sono quindi state miscelate a un rapporto di 1:1 o 1:2 con CryoStor® CS10. Nei vari studi, le cellule sono state crioconservate in un congelatore a velocità controllata (CRF), conservate in LN2 in fase vapore per > 2 giorni, quindi scongelate e valutate per vitalità, espressione di CAR, fenotipo e attività. In alcuni esperimenti, le cellule sono state miscelate 1:1 con siero AB umano all'80% + DMSO al 20% come controllo.

Il recupero delle cellule al momento dello scongelamento è stato aumentato quando una concentrazione finale del 2,5% di HSA è stata inclusa nel prodotto crioconservato (tabella 3). Inoltre, cellule congelate con HSA hanno mantenuto una vitalità superiore, iniziano a crescere più rapidamente quando riposte in coltura e hanno riguadagnato una alta vitalità cellulare più rapidamente (tabella 4).

**Tabella 3.** Recupero di cellule immediatamente post-scongelamento di cellule T CAR+ anti-CD19 crioconservate a differenti diluizioni di crioconservanti.

Formulazione	Cellule totali congelate (x 10 <sup>6</sup> )		Cellule totali recuperate (x 10 <sup>6</sup> )		% di recupero post-scongelamento	
	Senza HSA	HSA	Senza HSA	HSA	Senza HSA	HSA
Solo CS10	68	74	52	58	77%	78%
2:1 CS10:diluente	68	74	51	63	76%	85%
1:1 CS10:diluente	68	74	45	69	66%	93%
1:1 siero*:diluente	68	74	46	67	67%	91%
Diluente si riferisce a una sospensione di cellule in una miscela 1:1 di PLASMA-LYTE® A e soluzione salina semi-normale D5 (5% di destrosio/0,45% di NaCl) *Siero - 80% di siero AB umano/20% di DMSO						

**Tabella 4.** Recupero e crescita di cellule post-scongelamento di cellule T CAR+ anti-CD19 crioconservate in varie diluizioni di crioconservanti.

ID campione	HSA	Vitalità				Conteggio delle cellule (x 10 <sup>6</sup> )			
		Giorno 0	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 0 <sup>1</sup>	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3
Solo CS10	No	96%	81%	86%	90%	20	19	33	58
2:1 CS10:diluyente	No	96%	81%	86%	89%	20	14	29	49
1:1 CS10:diluyente	No	95%	83%	86%	91%	20	21	36	66
1:1 siero <sup>2</sup> :diluyente	No	93%	86%	92%	97%	20	10	32	64
Solo CS10	Sì	95%	90%	92%	93%	20	26	44	82
2:1 CS10:diluyente	Sì	97%	88%	93%	95%	20	23	41	82
1:1 CS10:diluyente	Sì	96%	86%	91%	93%	20	20	37	68
1:1 siero <sup>2</sup> :diluyente	Sì	95%	87%	94%	96%	20	20	36	66

Diluyente si riferisce a una sospensione di cellule in una miscela 1:1 di PLASMA-LYTE<sup>®</sup> A e soluzione salina semi-normale D5 (5% di destrosio/0,45% di NaCl)

<sup>1</sup> Numero totale di cellule poste in coltura il giorno 0

<sup>2</sup> Siero - 80% di siero AB umano/20% di DMSO

Studi che confrontano PLASMA-LYTE<sup>®</sup> A/soluzione salina semi-normale D5 a soluzione salina allo 0,9% hanno dimostrato che non vi era differenza significativa nel recupero al momento dello scongelamento, nella prestazione di crescita delle cellule in coltura dopo scongelamento o nel fenotipo (tabella 5). Inoltre, non vi è stato miglioramento in questi parametri quando le cellule sono state diluite 1:2 con CryoStor<sup>®</sup> CS10 rispetto a 1:1 con CryoStor<sup>®</sup> CS10. Nella maggior parte degli esperimenti con siero umano al 5% nei diluenti per cellule T con una concentrazione finale di HSA nel prodotto crioconservato del 2,5%, la prestazione era uguale o superiore a quella di cellule congelate in 1:1 con 80% di siero AB umano/20% di DMSO. È stata quindi presa la decisione di scegliere un prodotto crioconservato finale in cui le cellule vengono lavate con soluzione salina normale allo 0,9%, HSA viene aggiunto al 5%, quindi le cellule vengono diluite 1:1 con CryoStor<sup>®</sup> CS10.

**Tabella 5.** Prestazione di cellule diluite in soluzione salina normale allo 0,9% rispetto a PLASMA-LYTE<sup>®</sup> A/soluzione salina semi-normale D5

Campione	Vitalità (%)				Conteggio delle cellule (x 10 <sup>6</sup> cellule)				
	Giorno 0	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	# di cellule recuperate al momento dello scongelamento	# di cellule poste in coltura	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3
2:1 NS	91	86	91	85	163	20	21	22	29
2:1 NS	90	84	85	86	155	20	17	21	26
1:1 NS	91	81	88	85	175	20	15	22	42
1:1 NS	93	86	84	88	163	20	20	21	45
2:1 PL/D5	91	87	87	84	161	20	16	24	23
2:1 PL/D5	91	83	85	88	172	20	20	23	27
1:1 PL/D5	95	87	89	87	191	20	18	25	24
1:1 PL/D5	93	87	88	86	203	20	17	24	21

<sup>1</sup> 200 x 10<sup>6</sup> cellule sono state congelate in ciascuna sacca in un volume totale di 20 ml PL/D5 - miscela 1:1 di PLASMA-LYTE® A e soluzione salina semi-normale D5 (5% di destrosio/0,45% di NaCl); NS - soluzione salina normale

Lo sviluppo del ciclo di congelamento è stato eseguito sulla formulazione scelta di soluzione salina normale allo 0,45%, HSA al 2,5% e CryoStor® CS10 al 50%, e un volume del prodotto finale di approssimativamente 50-60 ml in sacche Origen™ CS250. Tutte le prove sono state condotte singolarmente, usando un volume e formulazione di terreno singoli per ciascuna prova. Aria è stata eliminata dalla sacca e la temperatura del prodotto è stata controllata attaccando una termocoppia alla superficie esterna della sacca. Sacche singole sono state poste in una cassetta di congelamento progettata per alloggiare la sacca CS250, come Custom BioGenic Systems™, parte numero ZC021, e poste nel ripiano intermedio di una rastrelliera di congelamento in un congelatore a velocità controllata.

Una serie di cicli di congelamento è stata valutata per determinare il punto al quale la soluzione salina normale allo 0,45%, HSA al 2,5% e CryoStor® CS10 al 50% nucleano spontaneamente per contribuire a decidere ove iniziare il picco di temperatura. Dopo ciascuna prova, sono state apportate modifiche al protocollo di

congelamento fino a quando è stato prodotto un profilo di temperatura del campione soddisfacente. Criteri per la creazione di un campione soddisfacente erano sfalsamento del picco del freddo dal calore di fusione al grado massimo possibile e che il campione aderisca a una velocità di raffreddamento di 1°C/minuto. Il protocollo ottimizzato per la sacca da 50 ml nel congelatore a velocità controllata (CRF) è rappresentato nella tabella 6, e i profili di temperatura corrispondenti della camera e del prodotto sono mostrati nella figura 12.

**Tabella 6.** Ciclo di congelamento ottimizzato per la formulazione di prodotto di cellule T CAR+ anti-CD19 nel congelatore a velocità controllata.

Fase	Azione	Temperatura della camera bersaglio
1	Permanenza a 4°C	NA
2	Aumento 1,0°C/min	-23.0 °C
3	Aumento 30,0°C/min	-75.0 °C
4	Aumento 10,0°C/min	-28.0 °C
5	Aumento 1,0°C/min	-40.0 °C
6	Aumento 10,0°C/min	-90.0 °C

## RIVENDICAZIONI

### 1. Metodo per produrre cellule T

che esprimono un recettore della superficie cellulare che riconosce una parte antigenica specifica sulla superficie di una cellula bersaglio, il metodo comprendendo

- (a) arricchire una popolazione di linfociti ottenuta da un soggetto donatore;
- (b) stimolare la popolazione di linfociti con uno o più agenti che stimolano cellule T per produrre una popolazione di cellule T attivate, in cui la stimolazione viene eseguita in un sistema chiuso usando un terreno di coltura privo di siero;
- (c) trasdurre la popolazione di cellule T attivate con un vettore virale comprendente una molecola di acido nucleico che codifica il recettore della superficie cellulare, usando una trasduzione a ciclo singolo per produrre una popolazione di cellule T trasdotte, in cui la trasduzione viene eseguita in un sistema a sacca chiusa usando un terreno di coltura privo di siero, in cui la sacca è rivestita con una proteina fibronectina umana ricombinante o un suo frammento; e
- (d) espandere la popolazione di cellule T trasdotte per un tempo predeterminato per produrre una popolazione di cellule T ingegnerizzate, in cui l'espansione viene eseguita in un sistema chiuso usando un terreno di coltura privo di siero.

2. Metodo della rivendicazione 1, in cui il recettore della superficie cellulare è un recettore di cellule T (TCR) o un recettore di un antigene chimerico (CAR).

3. Metodo della rivendicazione 1, in cui la cellula bersaglio è una cellula cancerosa.

4. Metodo della rivendicazione 3, in cui la cellula cancerosa è una malignità a cellule B.

5. Metodo della rivendicazione 3, in cui il recettore della superficie cellulare è un CAR anti-CD19.

6. Metodo della rivendicazione 1, in cui gli uno o più agenti che stimolano cellule T sono un anticorpo anti-CD3 e IL-2.

7. Metodo della rivendicazione 1, in cui il vettore virale è un vettore retrovirale.

8. Metodo della rivendicazione 7, in cui il vettore retrovirale è un vettore retrovirale MSGV1 gamma.

9. Metodo della rivendicazione 1, in cui il tempo predeterminato per espandere la popolazione di cellule T trasdotte è 3 giorni.
10. Metodo della rivendicazione 1, in cui il tempo per l'arricchimento della popolazione di linfociti per produrre le cellule T ingegnerizzate è 6 giorni.
11. Metodo della rivendicazione 10, in cui le cellule T ingegnerizzate sono destinate all'uso nel trattamento di un paziente affetto da cancro, in cui il paziente affetto da cancro e il soggetto donatore sono preferibilmente lo stesso individuo.
12. Metodo della rivendicazione 1, in cui il sistema chiuso è un sistema a sacca chiusa.
13. Metodo della rivendicazione 1 o 12, in cui la sacca non è bloccata con HSA durante la fase di trasduzione.
14. Metodo della rivendicazione 1, in cui la popolazione di cellule comprende cellule T naïve, in cui preferibilmente circa il 35-43%, almeno circa il 35% o almeno circa il 43% della popolazione di cellule T ingegnerizzate comprende cellule T naïve.

Si dichiara che la presente traduzione è perfettamente conforme al testo originale.

Il mandatario

Società Italiana Brevetti S.p.A.

## LEGENDA – DISEGNI

FIG. 1	
Process Step	Fase del procedimento
Apheresis Collection	Raccolta mediante aferesi
Volume Reduction	Riduzione del volume
Lymphocyte Enrichment	Arricchimento in linfociti
T Cell Activation	Attivazione di cellule T
Wash ...	Lavaggio ...
Retroviral Transduction	Trasduzione retrovirale
T Cell Expansion	Espansione delle cellule T
Wash 3 and Concentrate	Lavaggio 3 e concentrato
Formulation	Formulazione
Cryopreservation	Crioconservazione
Storage/Transportation	Immagazzinamento/trasporto
Process Time	Tempo del procedimento
Day ...	Giorno ...
Days ...	Giorni ...
Description	Descrizione
Cell collection at Clinical site	Raccolta delle cellule nel sito clinico
Ship to CMO	Trasporto a CMO
Standard volume for processing	Standardizzare il volume per il trattamento
Separation of PBMC	Separazione di PBMC
Activation in bags	Attivazione in sacche
OpTmizer™ + growth media + ...	OpTmizer™ + terreni di crescita + ...

Cells washed to reduce process impurities	Cellule lavate per ridurre le impurità del procedimento
Transduction in bags	Trasduzione in sacche
Retroviral vector & cells incubated for 20 ± 4 hr	Vettore retrovirale e cellule incubati per 20 ± 4 h
Expansion in bags for 3 days*	Espansione in sacche per 3 giorni*
Cells washed to reduce process impurities & concentrated	Cellule lavate per ridurre le impurità del procedimento e concentrate
Formulate subject specific dose in cryopreservation medium	Formulare una dose specifica per il soggetto in terreno di crioconservazione
Cryopreserve cells	Crioconservare le cellule
Product testing and release Shipment clinical site	Valutazione del prodotto e rilascio. Trasporto al sito clinico
FIG. 2	
Previous Process	Procedimento precedente
Manual Ficoll Separation of PMBC	Separazione Ficoll manuale di PMBC
Stim in T175 Flask (open)	Stimolazione in pallone T175 (aperto)
AIMV5 + 5% Hu serum supplemented with OKT3 and rIL2	AIMV5 + 5% di siero umano additivato con OKT3 e rIL2
Wash cells after Stim (open)	Lavare le cellule dopo stimolazione (aperto)
Transduction in 6-well plates by Spinoculation (open process)	Trasduzione in piastre a 6 pozzetti mediante spinoculazione (procedimento aperto)
Expansion in GRex flasks (open process) with antibiotics	Espansione in palloni GRex (procedimento aperto) con antibiotici
... day expansion	Espansione per ... giorni
Cell concentration and wash (open process)	Concentrazione e lavaggio delle cellule (procedimento aperto)

Administer fresh cells	Somministrare le cellule fresche
Apheresis product	Prodotto per aferesi
Enrich for lymphocytes	Arricchimento per linfociti
Days ...	Giorni ...
T Cell Activation	Attivazione delle cellule T
Retroviral Transduction	Trasduzione retrovirale
T Cell Expansion	Espansione delle cellule T
Harvest	Raccolta
Improved Process	Procedimento migliorato
Ficoll Separation of PBMC by Sepax 2 (closed process)	Separazione Ficoll di PBMC mediante Sepax 2 (procedimento chiuso)
Stim in Culture bags (closed)	Stimolazione in sacche di coltura (chiuso)
Serum-free medium with OKT-3 and rIL-2	Terreno privo di siero con OKT-3 e rIL-2
Wash cells after Stim (Sepax 2, closed process)	Lavare le cellule dopo stimolazione (Sepax 2, procedimento chiuso)
Transduction in Culture bags (closed process)	Trasduzione in sacche di coltura (procedimento chiuso)
Expansion in Culture bags (closed process) without antibiotics	Espansione in sacche di coltura (procedimento chiuso) senza antibiotici
Cell concentration and wash (closed process)	Concentrazione e lavaggio delle cellule (procedimento chiuso)
Cryopreserve product	Crioconservazione del prodotto
FIG. 3	
Fold expansion	Volte di espansione
Previous	Precedente

Improved	Migliorato
FIG. 4A	
Phenotype of CD3+ T Cells	Fenotipo di cellule T CD3+
Day ...	Giorno ...
Previous	Precedente
Improved	Migliorato
FIG. 4B	
CD3+ Cell Activation	Attivazione delle cellule CD3+
Day ...	Giorno ...
Previous	Precedente
Improved	Migliorato
FIG. 5	
% Cells	% cellule
Naive T cells	Cellule T Naïve
Previous	Precedente
Improved	Migliorato
Central memory T cells	Cellule T della memoria centrali
Effector Memory T cells	Cellule T della memoria effettrici
Effector T cells	Cellule T effettrici
FIG. 6	
Stimulation	Stimolazione
Transduction	Trasduzione
Expansion	Espansione
Approx Cell #	# cellule approssimato
Days	Giorni

FIG. 7 (cont'd)	FIG. 7 (segue)
FIG. 8	
% of CAR + CD3+ Cells	% di CAR + cellule CD3+
FIG. 9	
% of CAR + CD3+ Cells	% di CAR + cellule CD3+
With wash	Con lavaggio
Without wash	Senza lavaggio
FIG. 10	
% of CAR+ CD3+ Cells	% di CAR + cellule CD3+
Open	Aperto
FIG. 11	
% of T Cell Population	% di popolazione di cellule T
Open	Aperto
Control T	Controllo T
% ... T cells	% cellule T ...
FIG. 12	
Temperature (°C)	Temperatura (°C)
Time (min)	Tempo (min)

FIG. 1

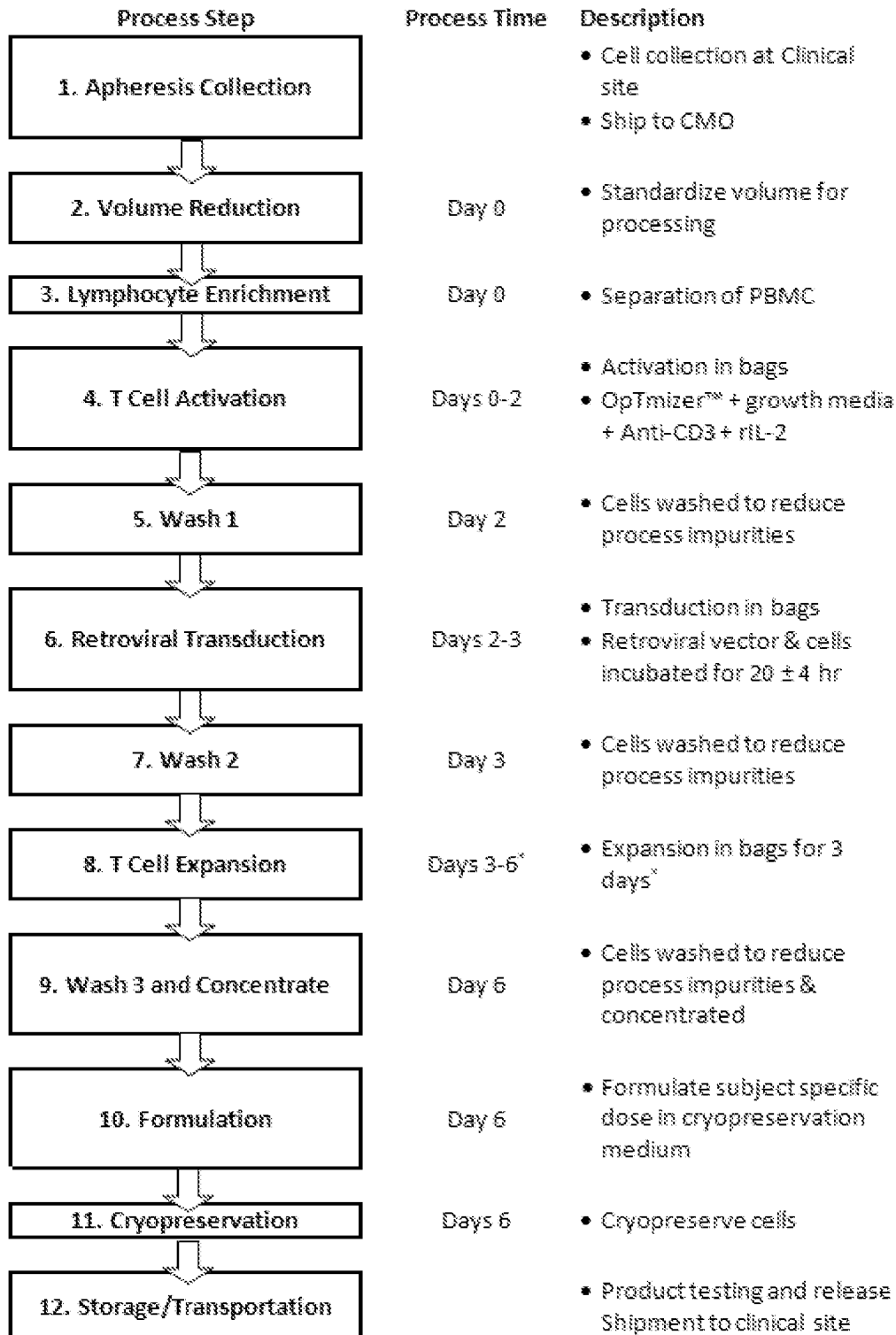


FIG. 2

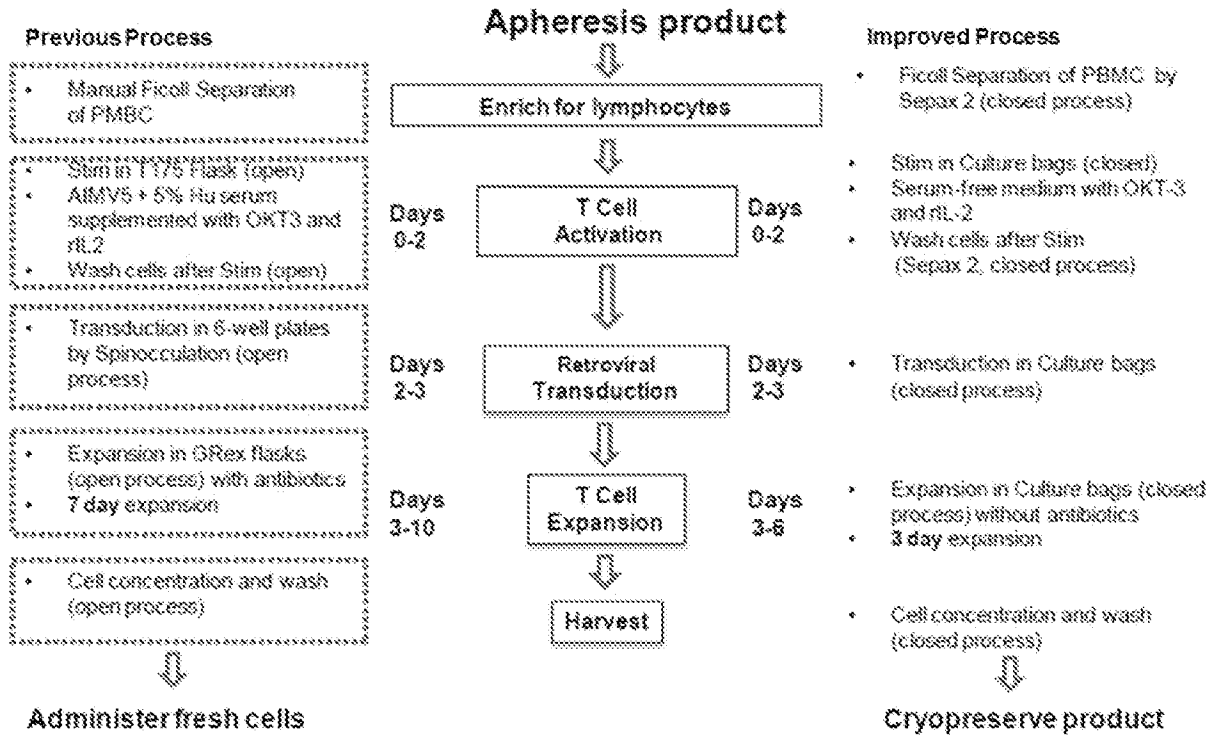


FIG. 3

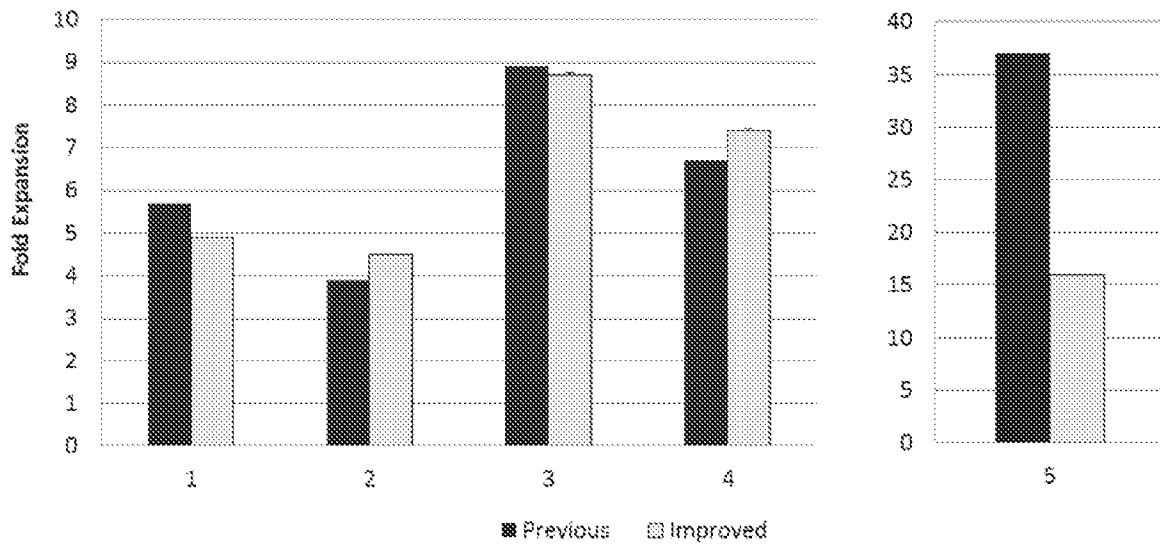
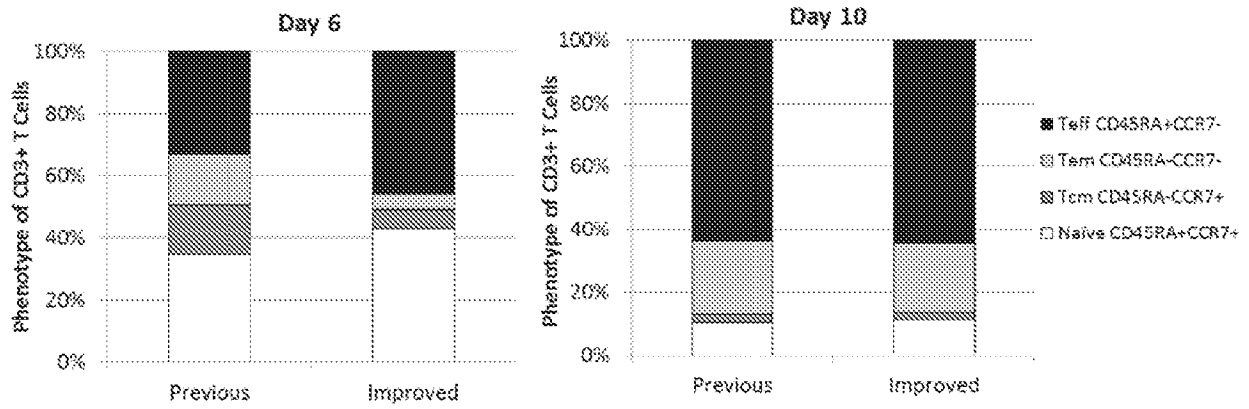


FIG. 4

A



B

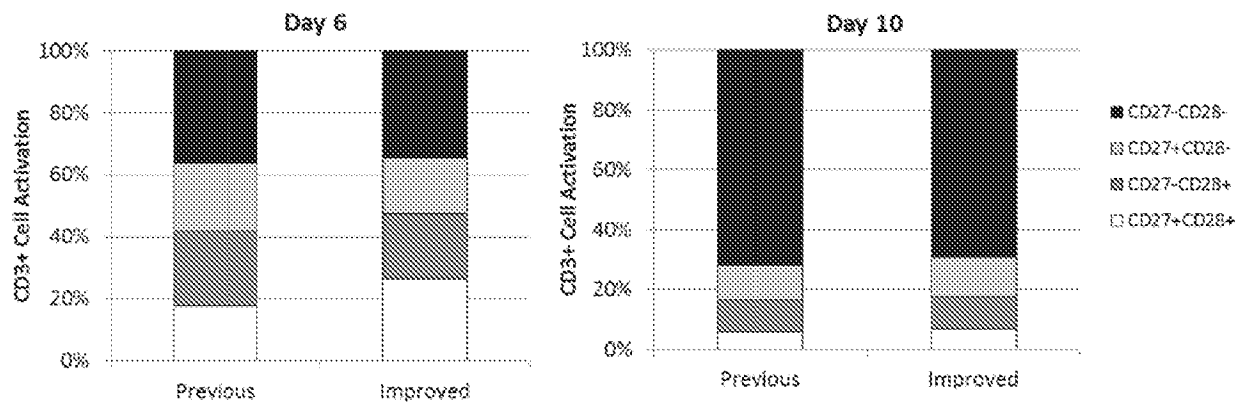


FIG. 5

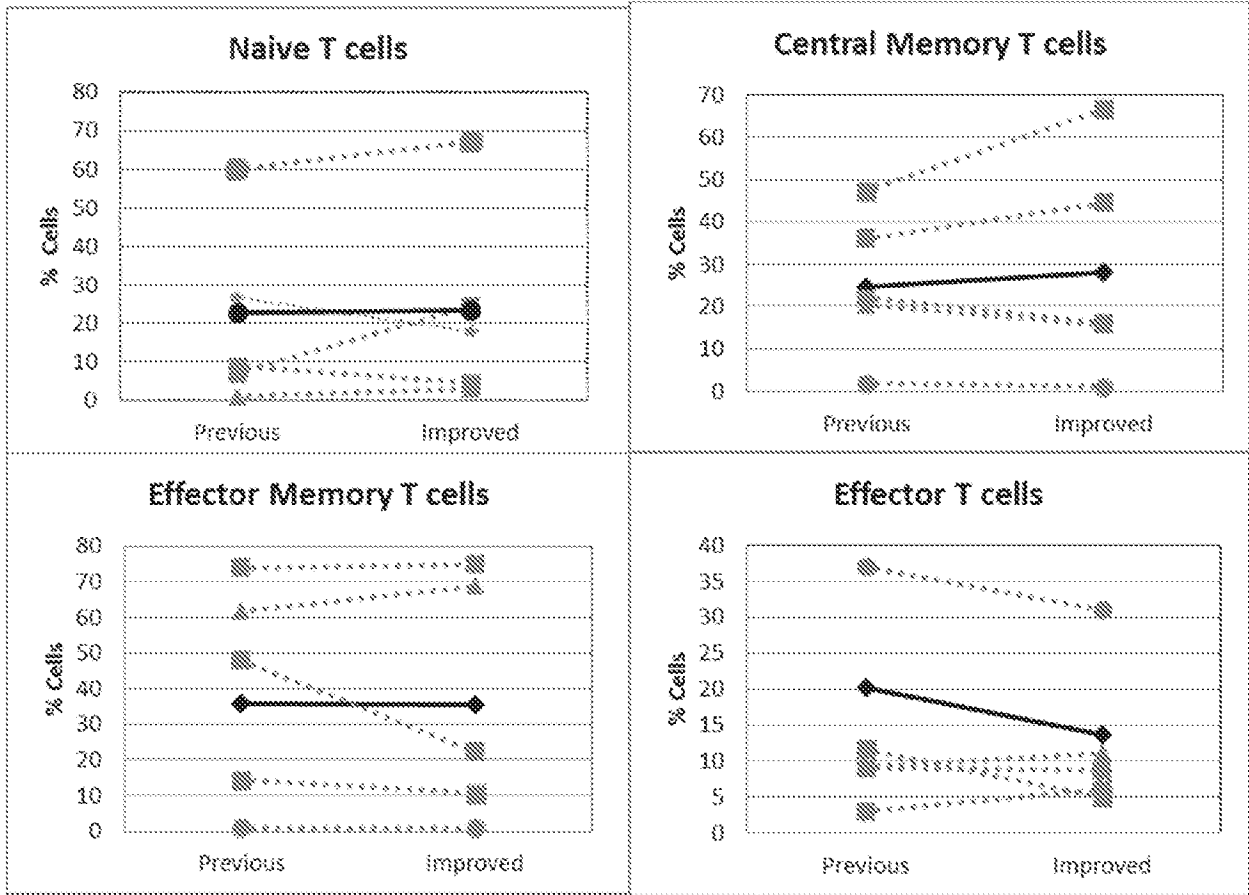


FIG. 6

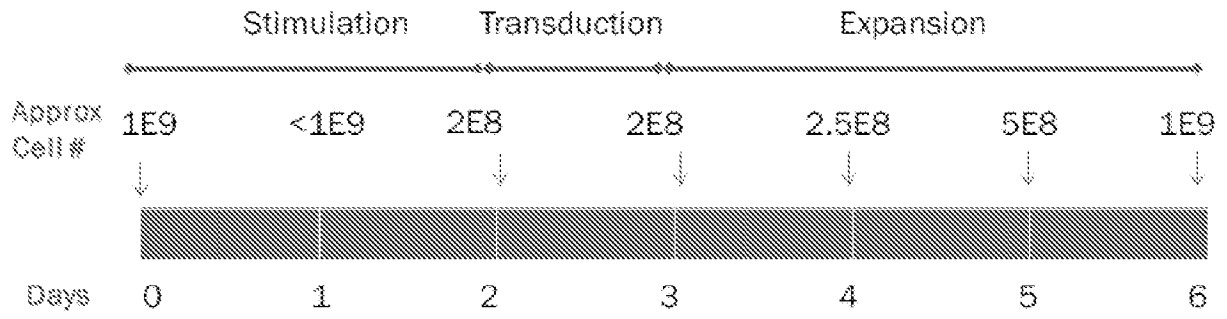


FIG. 7

ggatccgataaaaataaaagattttattagtctccagaaaaaggggggaalgaagacccccacctgtaggttggcaagc  
 tagcttaagtaacgccattttgcaaggcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggtaggaacag  
 agagacagcagaataigggccaaacaggatctcgtggaagcagttcctgccccggctcagggccaagaacagatg  
 giccccagatgcggtcccgccctcagcagttctagagaaccatcagatgltccaggggtgccccaggacctgaaaaatg  
 acctgtgacctatftgaactaaccaatcagttcgcttctcgcttctgctgctgctccccgagctcaataaaagagc  
 ccacaacccctcactcggcgcgcccagtcctccgatagactgctgctgccccgggtacccgigtatccaataaacccctctgca  
 gtgcatccgactgtggtctcgtctgcttgggagggtctcctctgagtgatgactacccgicagcgggggtctttcatgggt  
 aacagttctgaagttggagaacaacattctgagggtaggagtcgaatattaagtaatcctgactcaatagccactgtttg  
 aatccacatactccaatactccgaaatccatcgaatggagttcattatggacagcgcagaaagagctggggagaaltgig  
 aaattgtatccgctcacaattccacacaacatacagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgccaatgagtga  
 gtaactcacattaattgctgtcgtcactgccccgttccagtcgggaaacctgctgctccagctgcattaatgaatcggc  
 caacgcgcggggagaggcgggttgcglatggggcgtcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggctcgttccgct  
 gcggcgagcggatcagctcactcaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaaca  
 tgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgltttccataggctcggcccccc  
 tgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcc  
 ccctggaagctccctcgtgctctcctgttccgacctgcccgttaccggataacctgtccgcttctccctcgggaagcgt  
 ggcgcttctcatagctcagctgtaggtatctcagttcggigttaggtcgttcccaagctgggctgltgicacgaaccccc  
 cgttcagcccagaccgtcgccttaccggtaactatcgtctgagtcacaaccggtaagacacgactatcgccactggca  
 gcagccactggtaacaggattagcagagcggatgtagggcgggtctacagagttctgaagtggtggcctaactacgg  
 ctacactagaaggacagatattggtatctcgtcctcgtcgaagccagttacctcggaaaaagagttggtagctctgatccg  
 gcaaacaaaccaccgctggttagcgggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatcacaagaa  
 galcctttgatctttctacggggctcagcgtcagtggaacgaaaaactcacgttaagggatlttggtaigagattatcaaaa  
 aggatctcacctagatccctttaaataaaaaatgaagittaaatcaatcfaaagtatfatagtaaaacttggtcigacagita  
 ccaatgctaatcagtgaggcacctatctcagcagatctgtctatcttctgctcatccatagttgctgactccccgtcgtgtagataa  
 ctacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgcctaccggctccagaltta  
 tcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaaagtggtcctgcaactttatccgctccatccagttatata  
 ttgttccgggaagctagagtaagtagttcggcagtaaatagtttgcgaacgltgttgcattgctacaggcatcgtggtgtc  
 acgctcgtcgttggtaggttcaatcagctccgggtcccaacgatcaaggcaggtacatgatccccatgttggcaaaa  
 aagcggtagctcctcggctcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgaggttatcactcatggttatggcagcactgc  
 ataattctctactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactgggtgagactcaaccaagtcattctgagaalagtgtatg  
 cggcgaccgagttgctctgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgctcatcatt  
 ggaaaaacgttctcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgtgagatccagttcgaatgaaccactcgtgcacc  
 aacigatctcagcatctttactttcaccagcgtttcgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaaatgccgcaaaaagg  
 aataagggcgacaocggaatgtgaatactcatactctccttttcaatatttgaagcattatcagggttattgtctcatgag  
 cggatacataattgaatgtatttagaaaaataaacaataagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccaccigacgt  
 ctaagaaaccattatcatgacattaaacctataaaaaataggcgtatcacgaggcccttctcgtcctcgcgcttccggtgatga  
 cggtgaaaacctctgacacatgcagctccccggagacgggtcacagctgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagc  
 ccgtcagggcgcgtcagcgggtgtggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagaitgtactgagag  
 tgcaccatagcgggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccgcatcaggcggccattcggcattcaggct  
 gcgcaactgttgggaaggcgcgatcgggtcgggctctctcgtctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaagg  
 cgattaagttgggtaacgccagggttccagtcacgacgttgaaaaacgacggccagtgccacgctctccctatgagac  
 tctgtcattaggaagcagcccagtagtaggtgagggcgttgagcaccgcccggcaaggaatgggtgatgcaaggag  
 atggcggcccaacagtcccccggccacggggcctgccaaccatacccacgcccgaacaagcgcctatgagcccgaagt  
 ggcgagcccgatcttccccatcgggtgatgtcggcgataataggcggcagcaaccgcacctgtggcggcgggtgatgccggc

**FIG. 7 (cont'd)**

cacgatgctccggcglagaggcgalltaaacagagatalcagtggtccaggcctagtttgactcaacaatacacca  
gctgaagcctatagagtacgagccatagataaaaataaaagatfttatttagtctccagaaaaaggggggaatgaaagac  
cccacctgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccatttgcaggcatggaaaatacataactgagaatagagaagt  
tcagatcaaggtaggaacagagagacagcagaatatgggccaacaggatalcigtggttaagcagttcctgccccgg  
ctcaggccaagaacagatggtccccagatgctggccccgccccagcagttctagagaaccatcagatgittcagggt  
gccccaggacctgaaaatgacctgtgcctatttgaactaaccaalcagttcgcctctcgcctctgctcgcgcgcttcgctc  
cccgagctcaataaaagagcccacaacccccactcggcgccagtcctccgatagacigcgtcgccccgggiacctg  
tattccaataaagcctctgtctgttgcacccaatcgtggactcgcctggtggagggtctcctcagattgattgactgc  
ccacctcgggggtcttcatitggagggtccaccgagattggagacccccgctagggaccaccgacccccccgccccggg  
aggttaagctggccagcggctcgttctgtctgtctctgtcttctgtcgtgttctgtccggcatctaatttgcgctcgtctgtac  
tagttagctaaactagctctgtatctggcggacccgctggggaactgacgagttcggaacacccggccgcaacctgggag  
acgtcccagggaactcgggggcccgttttggccccgacctgagtcacaaaatcccgatcgttttggactcttgggtgcccc  
cccttagaggaggatgtgtgtctgttaggagacgagaacctaaaacagttcccgcctccgtctgaattttgcttccggtt  
tgggaccgaagccgccccgctctgtctgtcagcatcgttctgtgttctctgtctgactgtgttctgtatttctgtgag  
aatatgggcccgggctagcctgttaccactcccctaagttgacctaggctcactggaaagatgtcgagcggatcgtctaca  
accagtcggtagatgtcaagaagagacggttgggtacctctgtctctgcagaatggccaaccttaacgtcggatggccgc  
gagacggcaccttaaccgagacctcatcaccaggtaagatcaaggcttttaccctggccccgatggacacccagac  
caggtcccctacatcgtgacctgggaagccttggctttgacccccctcccgggtcaagcccttgtacacctaaagcctcc  
gctcctctctccatccgccccgtctctcccccttgaacctcctcgtctcagccccgctcgtatcctcccttatccagccctca  
ctcctctctaggcgcccccatagggccatagagatcttatatggggcaccccccgccccctgtlaaactcctgacctgac  
atgacaagagttactaacagcccctctctccaagctcacttacaggctctctacttagtccagcacgaagctcggagacctc  
tggcggcagcctaccaagaacaactggaccgaccgggtggtacctcacccttaccgagtcggcgacacagtgigggtcc  
gcccacaccagaciaagaacctagaacctcgtctggaaaggaccttacacagtcctgctgaccacccccaccgccccca  
aagtagacggcatcgcagcttggatacacgcccggccacgtgaaggctgcccgacccccgggggtggaccatcctctag

FIG. 8

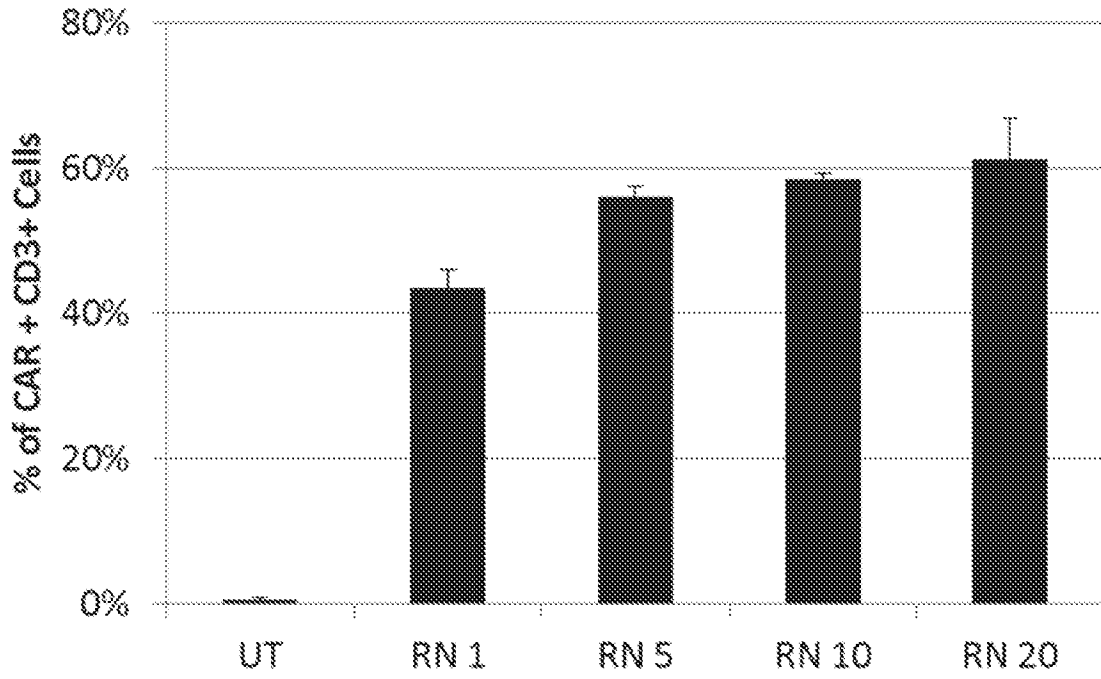


FIG. 9

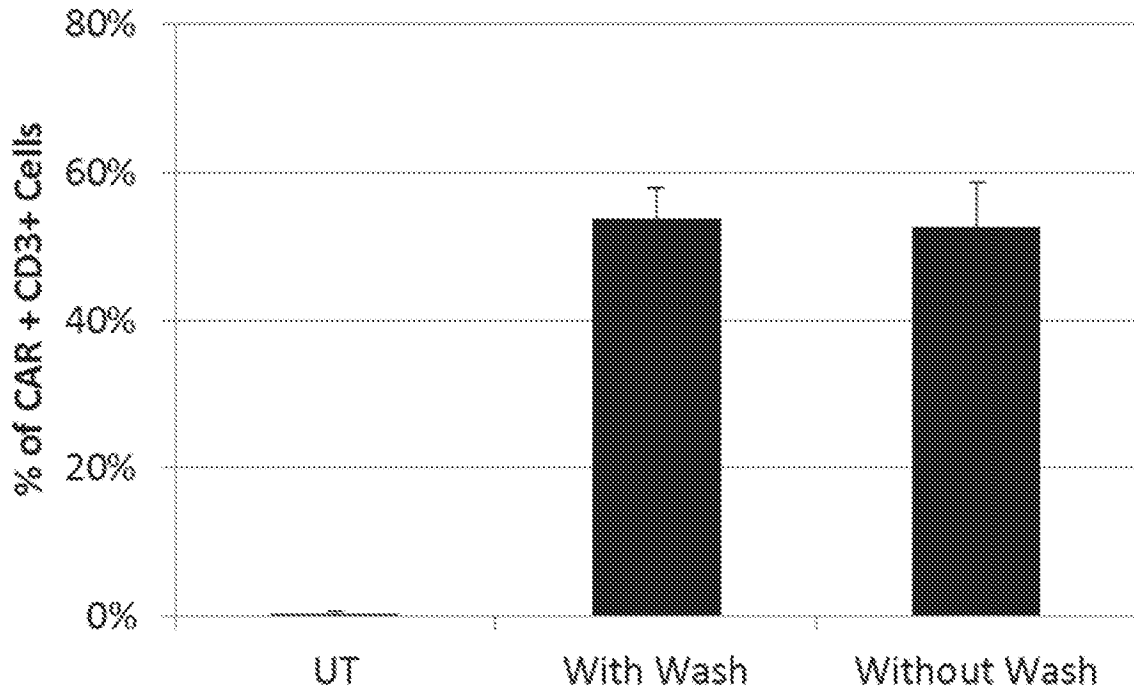


FIG. 10

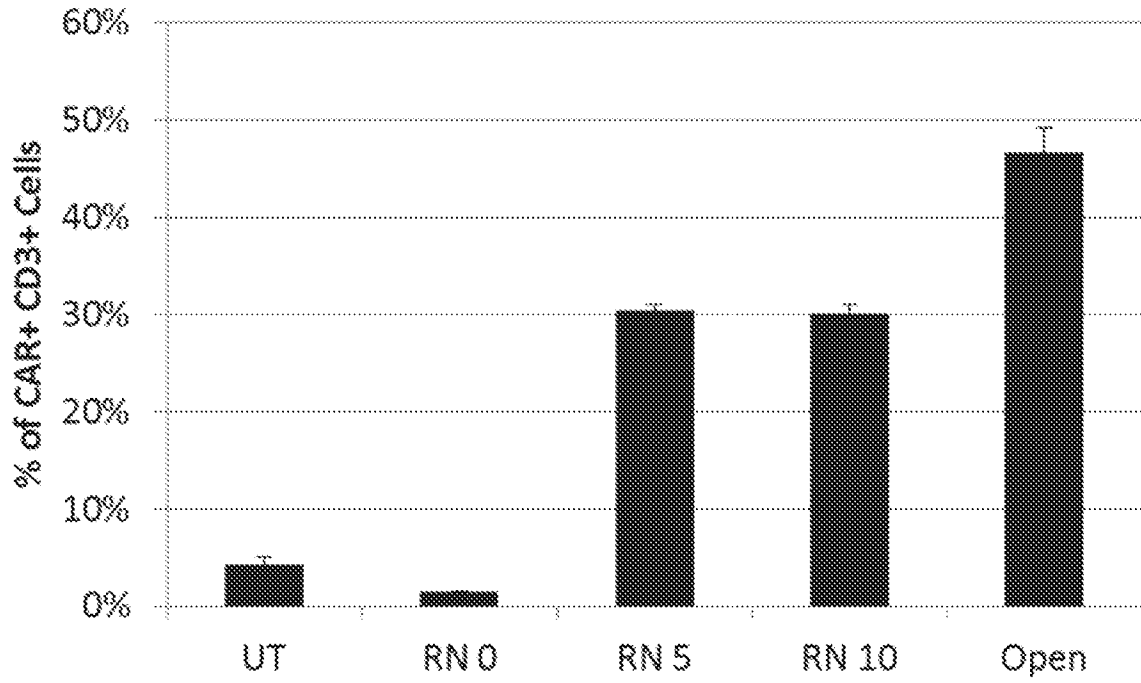


FIG. 11

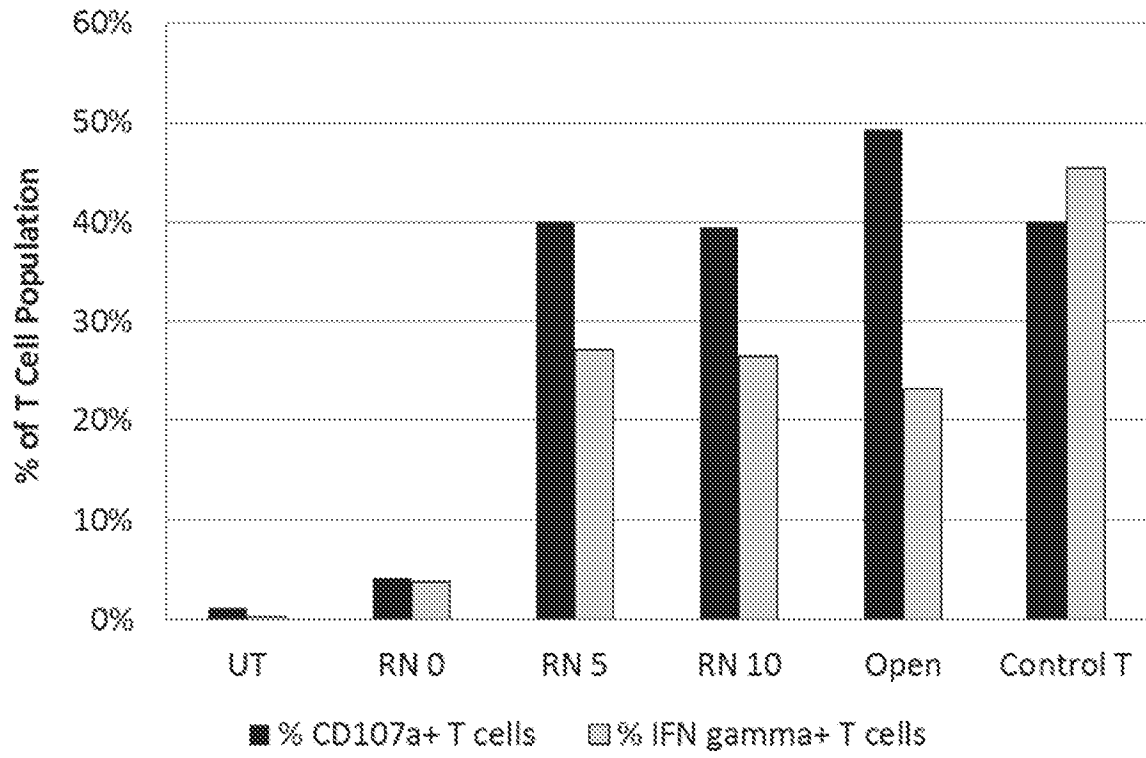


FIG. 12

