



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 190**

51 Int. Cl.:
C12N 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03776860 .3**

86 Fecha de presentación : **06.10.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1554374**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.07.2005**

54 Título: **Procedimiento para el cultivo a gran escala de linfocitos T en un sistema homogéneo.**

30 Prioridad: **04.10.2002 IT MI02A2118**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es: **ABIOGEN PHARMA S.p.A.**
Via Meucci, 36
56121 Localita Ospedaletto, Pisa, IT

72 Inventor/es: **Trasciatti, Silvia;**
Nolli, Maria, Luisa;
Cavenaghi, Luigi y
De Bernardi, Nadia

74 Agente: **Esteban Pérez-Serrano, María Isabel**

ES 2 279 190 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el cultivo a gran escala de linfocitos T en un sistema homogéneo.

5 **Campo de la invención**

El campo de la invención se refiere al cultivo de células *in vitro* y a la expansión a gran escala de células humanas aisladas.

10 **Técnica anterior**

Un enfoque de la terapia antitumoral se basa en la utilización de células dotadas de actividad citotóxica o de líneas celulares aisladas *ex vivo*.

15 A principios de los 90, se aislaron diversas líneas celulares de linfocito T derivadas de niños con leucemia linfoblástica aguda de célula T, denominada TALL. Entre estas se incluían las líneas celulares T: TALL-104, TALL-107, TALL103/2, descritas por O'Connor *et al.* (Blood, 1991, 77:1534-1545) y por Cesano y Santoli (*In vitro* Cell. Dev. Biol., 1992, 28:648-656). Presentan características tan interesantes que en la actualidad son utilizadas satisfactoriamente en el tratamiento de tumores en modelos animales y en humanos (Cesano *et al.*, Blood 1991, 87:393-403; 20 Cesano *et al.*, Cancer Res., 1996, 56:3021-3029, US 5.272.082; US 5.683.690; US 5.702.702).

Las líneas celulares TALL están dotadas con actividad citotóxica, específicamente antitumoral, y son activas contra diferentes tipos de tumores: la característica principal de estas células es que no son restringidas por MHC (Cesano *et al.*, J. Immunol., 1993, 151, 2943-2957) y, por lo tanto, pueden ser administradas a cualquier paciente, independientemente del fenotipo de antígenos de histocompatibilidad. Además, a diferencia de algunos tipos de linfocitos citotóxicos, tales como por ejemplo TIL y LAK, las líneas celulares TALL no necesitan, tras la administración *in vivo*, un tratamiento concomitante con linfoquinas. Esta es una ventaja adicional de dichas células, ya que la administración simultánea de linfoquinas presenta diversas desventajas.

30 Además, los linfocitos TALL han sido ensayados satisfactoriamente en diversos tumores. Estas son las razones por las que son consideradas como una alternativa terapéutica interesante. Sin embargo, los sistemas de expansión celulares utilizados hasta la fecha resultan limitativos debido a que las células preparadas para la inmunoterapia adoptiva derivan de cultivos realizados en matraces individuales, tal como se describe en Cesano *et al.*, Cancer Res., 1996 56:4444-4452 y Visonneau *et al.*, Clin. Cancer Res., 1997, 3:1789-1797), aunque los aparatos de cultivos celulares a gran 35 escala, tales como los utilizados en la preparación de anticuerpos monoclonales y proteínas recombinantes, han sido extensamente utilizados. Por lo tanto, resulta altamente deseable un sistema de cultivo a gran escala adecuado para células de este tipo.

Resumen

40 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para el cultivo y la expansión a gran escala de linfocitos TALL basado en la utilización de un sistema de cultivo homogéneo, *en el que dicho sistema de cultivo es una pila multicámara*. La expresión "cantidad a gran escala de linfocitos TALL" se refiere a, por lo menos, 1×10^9 células.

45 Particularmente, el sistema homogéneo o fermentador utilizado en el procedimiento reivindicado es un dispositivo *Cell-factory*TM, que consiste preferentemente de una pila de 10 cámaras. Los linfocitos que pueden ser expandidos según el presente procedimiento son seleccionados de entre el grupo que comprende TALL-104, TALL-107, TALL103/2, opcionalmente modificados genéticamente.

50 Según una forma de realización adicional, la invención concierne un procedimiento de muestreo celular, estando dicho procedimiento basado en el sellado del cuello de llenado de la bolsa lo que crea, por lo menos, una cámara de muestra que contiene un número de células suficiente para el muestreo.

55 **Descripción de las figuras**

La Figura 1 es una gráfica que muestra los niveles de glucosa y la densidad celular de las células TALL cultivadas en matraz.

60 Los parámetros siguientes fueron determinados en 15 matraces de TALL: N° de células/ml (—♦—) y los niveles de glucosa (barras verticales).

Descripción detallada de la invención

65 La invención se refiere a un procedimiento para la expansión a gran escala de linfocitos TALL, en el que, por lo menos 1×10^9 células son cultivadas en un sistema homogéneo que comprende una única unidad de fermentación.

ES 2 279 190 T3

Los linfocitos TALL (leucemia linfoblástica aguda de células T) son líneas de linfocitos T citotóxicos derivadas a partir de un paciente pediátrico con leucemia linfoblastoide y entre las mismas se incluyen las líneas TALL-104, TALL-107, TALL-103/2, tal como se describe en O'Connor *et al.*, Blood, 1991, 77, 1534:1545, y en Cesano y Santoli, *In vitro* Cell. Dev. Biol., 1992, 28, 648-656). La línea celular preferente es la TALL-104. Las células TALL pueden

Hasta la fecha, han sido amplificadas exclusivamente en matraces individuales hasta un máximo obtenible de aproximadamente 1×10^8 células/matraz T175.

Por lo tanto, la preparación de bolsas que contienen cantidades de células terapéuticamente eficaces comprendidas en el intervalo desde 10^5 células a 10^{12} células, preferentemente en el intervalo de 1×10^7 a 1×10^{10} , y todavía más preferentemente en el intervalo de 1×10^8 a $2,5 \times 10^9$, implicaba, hasta la fecha, la amplificación simultánea de un gran número de matraces individuales.

Según las definiciones de la invención el crecimiento en matraces individuales representa un sistema de cultivo heterogéneo ya que cada matraz representa un microentorno de cultivo diferente. Por lo tanto, y según las directrices de FDA: "Guidance for Industry: Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy" (CBER, Marzo 1998, Punto III) del Departamento de Salud de EEUU (que recomienda un control por separado de cada mezcla de células preparada en un sistema independiente) las células derivadas a partir de cada matraz individual según los procedimientos de la técnica anterior representan lotes diferentes y, por lo tanto, deben ser controlados de manera independiente. De esto se sigue que el desarrollo de un sistema de cultivo de células homogéneo para utilización terapéutica, y especialmente de células TALL, representa una ventaja enorme también en lo que concierne a los controles de lotes.

Además, la amplificación en un sistema heterogéneo, que comprende un número de matraces individuales, puede provocar altos riesgos de contaminación debido a las repetidas operaciones de manipulación que deben ser realizadas por el operario.

Las células TALL normalmente crecen en suspensión pero, de manera inesperada, no pueden ser amplificadas o expandidas en sistemas conocidos para la producción a escala industrial de células de este tipo, por ejemplo, matraz spinner o miniPERM. Por lo tanto, cuando la cantidad de células a producir excede 10^9 , tal como por ejemplo en el caso de la producción de dosis terapéuticas de $2,5 \times 10^9$ células por lo menos, las etapas de expansión celular se hacen extremadamente complejas ya que los mayores matraces (T175) disponibles comercialmente permiten la obtención de entre $1,5 \times 10^8$ y 2×10^8 células TALL, como máximo.

El presente solicitante ha observado, de manera inesperada, que dichas células pueden ser cultivadas y expandidas eficazmente en un sistema homogéneo tal como una *Cell-factory*TM que es normalmente utilizada para las células dependientes de anclaje. A la inversa, el matraz spinner u otros fermentadores utilizados convencionalmente para el cultivo a gran escala de células en suspensión, por ejemplo, células de hibridoma que presentan características de crecimiento similares a las de las células TALL, resultan ser inapropiados.

La expresión "producción a gran escala" se refiere a la producción de, por lo menos, 1×10^9 células TALL en un sistema homogéneo.

En el procedimiento de la invención, los datos referentes al número de células presentan una tolerancia de aproximadamente el 5%, que representa el posible error en el recuento de células determinado en una cámara de Burker. Por ejemplo, la indicación de 1×10^6 células realmente se refiere a un número de células comprendido en el intervalo de $0,95 \times 10^6$ células y $1,05 \times 10^6$ células. El error de medición es variable y depende del procedimiento de medición adoptado.

Según el procedimiento de la invención, la expansión TALL en una *Cell-factory*TM es preferentemente precedida de una preexpansión que comprende una serie de expansiones volumétricas en el mismo matraz (donde matraz se refiere a un contenedor de cultivo celular) por medio de adiciones sucesivas de medio completo fresco al cultivo y por medio de pasos de transferencia del cultivo completo a matraces de mayor volumen y finalmente a los matraces de mayor volumen y superficie disponibles comercialmente, tales como los matraces T175.

Según una característica preferente de la presente invención, la preexpansión es realizada hasta obtener aproximadamente entre 3×10^8 células y 4×10^8 células totales, de las cuales aproximadamente entre 2×10^8 células y $2,5 \times 10^8$ células son utilizadas para la inoculación en cada *Cell-factory*TM y aproximadamente entre 1×10^8 células y $1,5 \times 10^8$ células se mantienen en paralelo en matraces de cultivo T175.

La división del cultivo de células, realizado para devolver los valores de densidad celular a los valores de inóculo óptimos, es decir entre $0,7 \times 10^8$ células/ml y 1×10^8 células/ml, es referida en la presente memoria como "paso de transferencia". A esta densidad las células alcanzan rápidamente una densidad aproximada de $2,5 \times 10^9$ células/ml.

Preferentemente, la preamplificación es llevada a cabo en un medio completo, más preferentemente IMDM, que contiene glutamina 2 mM, suero fetal bovino (FBS) en una concentración de entre 2% y 20%, preferentemente 5% y citoquinas, preferentemente interleuquinas, y más preferentemente IL-2 o IL-15. Preferentemente, se añade IL-2 en una cantidad de 100 IU/ml cada intervalo de entre 48 y 72 horas. En el sistema homogéneo, el medio de la etapa de

ES 2 279 190 T3

amplificación es el mismo que el de la etapa de preamplificación, pero el suero fetal bovino es sustituido, por lo menos parcialmente, con suero humano AB. Dicha sustitución puede también ser realizada previamente a la transferencia celular al sistema de cultivo celular homogéneo, por ejemplo, en los últimos pasos de transferencia de la etapa de preamplificación. IMDM puede ser sustituido por otro medio de cultivo, tal como por ejemplo RPMI, Ham's-F12, etcétera. Preferentemente, el medio está libre de antibióticos.

Un medio, preferentemente IMDM que contiene glutamina 2 mM pero libre de antibióticos es referido, en la presente memoria, como "medio completo"; puede estar suplementado con FBS o suero humano.

Las interleuquinas, preferentemente IL-2 o IL-15, son añadidas al medio de cultivo celular cada intervalo de entre 48 y 72 horas, en una concentración final de entre 50 IU/ml y 150 IU/ml, más preferentemente de 100 IU/ml.

Las células son incubadas a 37°C y en una mezcla de aire que comprende preferentemente entre 5% y 12% de CO₂, preferentemente 10% de CO₂, preferentemente 10% CO₂. Todos los pasos de transferencia que prevén operaciones de manipulación de células o medio de cultivo son realizados en condiciones estériles, por ejemplo, en una campana de flujo laminar vertical Biohazard (clase 100).

Según una forma de realización particularmente preferente, el cultivo de preamplificación es iniciado a partir de un tubo o vial de cultivo de MCB congelado (banco de células primario), almacenado en nitrógeno líquido y que contiene entre 1x10⁷ células/tubo/ml y 2x10⁷ células/tubo/ml que es descongelado en un baño termostático a 37°C.

El contenido del vial es añadido, en una campana de flujo laminar, con un volumen entre 8 y 10 veces superior de solución de descongelación fría (IMDM completo que contiene FBS al 20%). Las células son centrifugadas (a 1.500 rpm durante 10 minutos). Una vez que los sobrenadantes han sido aspirados, se añaden a los sedimentos celulares 10 ml de medio completo y las células resuspendidas son transferidas a un matraz T25. Se añade IL-2 diluido con medio completo, a una concentración final de aproximadamente 100 IU/ml. Cuando la densidad celular obtenida es tal que las células ocupan toda la superficie del matraz, tal como se observa con un microscopio invertido, el cultivo celular es expandido en dos veces el volumen del medio (y amplificado en dos matraces T25). Con este fin, un volumen igual de medio fresco es añadido y el cultivo es dividido en dos matraces iguales para restablecer la densidad celular óptima (densidad celular de inóculo), que generalmente se encuentra en el intervalo de 0,7x10⁶ células/ml y 1x10⁶ células/ml, y donde el volumen de cada matraz corresponde al volumen inicial.

Para mantener un intercambio de gas óptimo en el medio de cultivo, el volumen del medio de cultivo celular óptimo en un matraz T25 se encuentra comprendido en el intervalo de 7 ml a 12 ml, preferentemente, 10 ml; para un matraz T75 el intervalo es de 20 ml a 60 ml, preferentemente de 40 ml; para un matraz T175 el intervalo es de 40 ml a 200 ml. Los volúmenes anteriores son aproximados y son referidos como condiciones de densidad celular óptima.

Tras la descongelación, la densidad celular óptima es normalmente alcanzada después de un intervalo de 3 días a 7 días, preferentemente después de 5 días. Después de aproximadamente 3 días, las células son transferidas de 2 matraces T25 a 2 matraces T75; las células que permanecen en el matraz, si hay alguna, son recogidas; IL-2 es añadido al medio fresco según la concentración indicada anteriormente.

Después de aproximadamente 3 días, las células son transferidas de 2 matraces T75 a 2 matraces T175. Las células que permanecen en las matraces T75, si hay alguna, son recogidas con un lavado en medio completo para alcanzar un volumen final de 40 ml y se les añade IL-2 en proporción. Después de un intervalo de 2 a 3 días, las células son transferidas de 2 matraces T175 a 4 matraces T175 de 20 ml, en las que se añade inmediatamente el mismo volumen de medio completo e IL-2 en proporción. Después de 2 días, las células son transferidas de las 4 matraces T175 a 8 matraces T175. A cada matraz se le añaden aproximadamente 20 ml de medio completo e IL-2 en proporción. Después de aproximadamente 2 días, a las 8 matraces T175 se les añaden aproximadamente 40 ml de medio completo que comprende suero humano en una concentración comprendida en el intervalo de 2% a 10%, preferentemente en el intervalo de 4% a 6%, más preferentemente de 5%, e IL-2 en proporción.

El volumen de recogida final del matraz T175 normalmente está comprendido en el intervalo de 140 ml a 180 ml. La etapa de preamplificación es completada después de aproximadamente 15 días con un número de células comprendido en el intervalo de 0,9x10⁹ a 1,1x10⁹ (cuyo valor generalmente corresponde a 8 matraces T175, cada uno conteniendo una suspensión celular de 160 ml) en un medio que contiene suero humano en una concentración final comprendida en el intervalo de 2% a 5%, preferentemente en el intervalo de 3% a 4%, y opcionalmente suero fetal bovino (FBS) en una concentración final de 0% a 5%, preferentemente de 1,5% a 3%.

El paso de transferencia desde el medio que contiene FBS al medio que contiene suero humano preferentemente se realiza durante los dos últimos pasos de transferencia de la etapa de preamplificación en matraz, preferentemente T175, preferentemente mediante diluciones sucesivas del cultivo que contiene FBS con medio fresco que contiene suero humano.

El inóculo en la *Cell-factory*TM es realizado con un número de células comprendido en el intervalo de 1,5x10⁷/cámara a 2,5x10⁷/cámara en un volumen comprendido entre 1/6 y 1/10, preferentemente 1/8, de la capacidad de volumen final de la *Cell-factory*TM. Para el inóculo en una *Cell-factory*TM de 10 cámaras con una capacidad final de 2 litros, el inóculo es realizado con entre 1,5x10⁸ y 2,5x10⁸ en un volumen de medio comprendido entre 200 ml y 330 ml de me-

dio, preferentemente entre 230 ml a 270 ml, añadiendo inmediatamente el mismo volumen de medio completo fresco que contiene un máximo de 10%, preferentemente 5%, de suero humano y citoquinas, preferentemente interleuquinas, más preferentemente IL-2 o IL-15, y todavía más preferentemente IL-2, en una concentración final de entre 80 IU/ml y 120 IU/ml, preferentemente de 100 IU/ml.

Cada 3-5 días, preferentemente cada 4 días, tiempo durante el cual las células generalmente se duplican, se añade un volumen de medio completo correspondiente al volumen contenido en la *Cell-factory*TM para continuar el crecimiento y la expansión celular a un volumen final máximo de 2 litros/*Cell-factory*TM de 10 cámaras y a un número de células comprendido entre $1,5 \times 10^9$ y $2,5 \times 10^9$.

La amplificación de células TALL en la *Cell-factory*TM requiere de la adición de medio fresco que contiene suero humano en una cantidad máxima de 10%, preferentemente entre 3% y 7%, más preferentemente entre 4% y 6% y todavía más preferentemente de 5%. Por lo tanto, en la etapa de amplificación en el sistema de cultivo homogéneo según la invención, preferentemente se utiliza poco o ningún suero fetal bovino. Las trazas de FBS, si existen, que pueden estar presentes al final del procedimiento de la invención son el resultado de diluciones sucesivas del medio que contiene FBS con el medio que contiene suero humano.

Brevemente, según un esquema general de procedimiento, tanto en la etapa de preamplificación en matraz como en la etapa de expansión en el sistema homogéneo, la densidad celular, del inóculo nunca es inferior a $0,7 \times 10^6$ células/ml (valor que corresponde al valor que puede obtenerse dividiendo el cultivo celular en 2 o en 3 cada intervalo de 48 horas a 72 horas) y preferentemente es de $0,75 \times 10^6$ /ml. A la inversa, en la etapa final de crecimiento, un poco antes de la recogida, nunca excede el valor 2×10^6 y es preferentemente de $1,5 \times 10^6$.

Los volúmenes y el número de células según el procedimiento de la invención en el que el inóculo es realizado en una *Cell-factory*TM de 40 cámaras con una capacidad máxima de medio de 8 litros y capaz de proporcionar una cantidad total de células cultivadas en un sistema homogéneo individual en el intervalo de aproximadamente 8×10^9 a 10×10^9 , han sido calculados proporcionalmente.

Según el procedimiento de la presente invención, por lo menos una bolsa que contiene la dosis terapéutica más alta de células TALL, es decir $2,5 \times 10^9$ células (bolsas que contienen entre 1×10^8 células y $2,5 \times 10^9$ células), puede ser producidas mediante un sistema de cultivo homogéneo. Por lo tanto, según una forma de realización adicional de la invención, el procedimiento abarca también la preparación de bolsas congeladas de linfocitos TALL en una cantidad de por lo menos 2×10^9 , caracterizada por el hecho de que dichas células TALL son expandidas en un sistema de cultivo homogéneo, en la que dicho sistema es una pila multicámara. Las bolsas utilizadas presentan un volumen variable y, por lo tanto, contienen dosis terapéuticas celulares diferentes. Preferentemente, se utilizan bolsas para congelar y para infundir, más preferentemente, se utilizan bolsas de congelación Cryocyte, de Baxter.

Para preparar las bolsas para utilización terapéutica, las células de la *Cell-factory*TM durante la recogida, se colocan en un tubo estéril de 50 ml y son irradiadas, según los procedimientos conocidos en la técnica, en un acelerador de partículas beta (betatron). El procedimiento ha sido validado para proporcionar la misma cantidad de partículas que se proporcionan mediante una fuente tradicional, tal como Cs137. El procedimiento que utiliza el betatron presenta la ventaja de que no es radioactivo y provoca una irradiación uniforme de la solución. Una vez irradiadas, las células son centrifugadas (a 1.500 rpm durante 10 minutos). En este punto, se recoge una muestra de células para realizar ensayos cualitativos.

Las células irradiadas junto con los componentes de la suspensión final y las bolsas estériles son colocadas en una campana de flujo laminar. Las células son resuspendidas en la solución congelada que comprende Rimso 50 (DMSO al 50%) (20%) y 5% de albúmina humana (80%) en 8 ml a 30 ml de medio, más preferentemente en 10 ml a 25 ml de medio completo que contiene dosis de células TALL en el intervalo de 1×10^8 a $2,5 \times 10^9$. Preferentemente, la densidad celular en las bolsas está comprendida en el intervalo de 10^6 células/ml a 10^8 células/ml. Las células irradiadas pueden ser almacenadas a 4°C durante un intervalo de tiempo no superior a 24 horas, antes de ser congeladas.

La concentración celular es evaluada mediante recuento, con microscopio, en una cámara de Burkner, o mediante otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Las bolsas son llenadas en condiciones estériles.

Una vez que las bolsas han sido llenadas, son selladas, por ejemplo, mediante sellado por calor, transversalmente al cuello de llenado de la bolsa, en dos, preferentemente tres puntos, para crear una o preferentemente dos cámaras que contienen células, y en las que dichas células se denominan "muestras auténticas" para el objetivo de la presente invención. Las alícuotas celulares contenidas en las dos porciones de bolsa se encuentran separadas pero provienen del mismo lote de cultivo.

Según una forma de realización preferente de la invención, el volumen de la suspensión celular contenido en las cámaras se encuentra en el intervalo de 0,1 ml a 1 ml, preferentemente 0,3 ml, y el número células/cámara resulta suficiente para, por lo menos, una serie de controles de calidad y/o esterilidad adecuados. Las células de la cámara o cámaras correspondientes a las muestras auténticas, pueden ser retiradas fácilmente sin abrir la bolsa completa.

Dichas cámaras que contienen las “muestras auténticas”, el procedimiento de sellado del cuello de la bolsa en uno o más puntos y el procedimiento de formación de las muestras auténticas de la bolsa representan objetivos adicionales de la presente invención.

5 Las bolsas para la crioconservación y la infusión son congeladas a -80°C .

Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de bolsas congeladas de linfocitos TALL en una cantidad de por lo menos 1×10^9 células, en el que dicha cantidad deriva a partir de un sistema de cultivo homogéneo individual.

10 Los controles de calidad sobre las células amplificadas según el procedimiento de la invención pueden ser realizados antes de la congelación después de la recogida desde el sistema de cultivo homogéneo así como después de la congelación, y están destinados a comprobar la estabilidad de las propiedades, tales como las cantidades porcentuales de marcadores inmunológicos y la actividad biológica de las células TALL del producto terminado. Las células
15 producidas según la invención son estables también después de la congelación.

Los controles de calidad preferentemente comprenden las siguientes mediciones realizadas según los procedimientos conocidos en la técnica:

20 - viabilidad, preferentemente determinada mediante el ensayo de exclusión azul tripán; debe ser por lo menos de 80%;

- actividad biológica, preferentemente determinada mediante un ensayo de citotoxicidad (medición de adenilato
25 quinasa), aunque también pueden realizarse ensayos alternativos; debe ser superior a 60% de la lisis de las células objetivo, K562, en una relación 10/1;

- niveles de endotoxina, preferentemente determinados mediante el ensayo colorimétrico del lisado de amebocitos del limulus; deben ser $\leq 0,5$ EU/ml;

30 - fenotipo de marcadores inmunológicos, preferentemente determinado mediante inmunofluorescencia (FACS), que debe proporcionar valores de por lo menos el 90% de los marcadores conocidos como $\text{CD}3^{+}$, $\text{CD}8^{+}$, $\text{CD}56^{+}$;

- proliferación, preferentemente realizada mediante un ensayo de incorporación de ^3H -TdR, la medición de incorporación después de 72 horas debe ser, por lo menos, igual o superior a dos veces el valor del ruido de fondo.
35

Según el procedimiento de la presente invención, los parámetros medidos, tales como el porcentaje de marcadores inmunológicos, la actividad biológica y la actividad de los marcadores metabólicos, tales como por ejemplo el nivel de glucosa del medio de cultivo, son menos variables en las células cultivadas en el sistema homogéneo que los medidos en las células cultivadas en un sistema de cultivo heterogéneo.
40

De hecho, en el sistema de cultivo homogéneo *Cell-factory*TM, el porcentaje de marcadores inmunológicos expresados en las células TALL es de por lo menos el 90%, más preferentemente de por lo menos el 95%, más preferentemente de por lo menos el 98%, para $\text{CD}3^{+}$ y $\text{CD}56^{+}$; y de por lo menos el 90%, más preferentemente de por lo menos el 93% para $\text{CD}8^{+}$, mientras que es inferior para las células cultivadas en matraz. El valor de expresión del marcador $\text{CD}56^{+}$,
45 que resulta preferentemente de por lo menos 95%, preferentemente de por lo menos 97%, es superior en el procedimiento de la invención que en células cultivadas en el sistema de matraz heterogéneo. También, la actividad biológica determinada mediante el ensayo de citotoxicidad en las células objetivo, que son normalmente preferentemente K562, es superior que el límite aceptable y es siempre superior al 70% comparado con el control, que consiste en un número adecuado de células en las que la lisis se ha inducido completamente.
50

También los niveles de glucosa medidos prueban que las condiciones metabólicas de las células son más homogéneas en las células cultivadas en *Cell-factory*TM según el procedimiento de la invención respecto a las cultivadas en matraces (Figura 1): de hecho, mientras que las mediciones en matraz proporcionaron concentraciones de glucosa comprendidas en el intervalo de 300 mg/dl a 400 mg/dl, las mediciones en *Cell-factory*TM proporcionan valores
55 comprendidos en el intervalo de 350 mg/dl a 380 mg/dl.

Según una forma de realización simplificada, el procedimiento de la invención comprende cualquier etapa de preamplificación de cultivo de células TALL realizado según los procedimientos conocidos en la técnica, comprendiendo un inóculo en una pila multicámara de 2×10^7 células/cámara, en un volumen inicial de 1/10 a 1/6 del volumen final de la pila multicámara, y una etapa de amplificación celular en una pila multicámara, preferentemente en una *Cell-factory*TM de 10 cámaras (con una capacidad final de aproximadamente 2 l), con un total de inóculo de aproximadamente 2×10^8 células en aproximadamente 250 ml.
60

Bajo las condiciones adoptadas en el presente procedimiento, en la expansión a gran escala de la *Cell-factory*TM, la relación entre la densidad de inóculo mínima y la densidad de recuperación máxima al final del ciclo de expansión resulta optimizada. De hecho, según el procedimiento de la presente invención, al final del ciclo de expansión el número de células es aproximadamente diez veces superior (pasa de entre $1,5 \times 10^8$ células y $2,5 \times 10^8$ células a entre $1,5 \times 10^9$ células y $2,5 \times 10^9$ células), mientras que el volumen es sólo 8 veces mayor. Las ventajas adicionales del sistema
65

ES 2 279 190 T3

de cultivo homogéneo son: 1) la eliminación de las condiciones de heterogeneidad del cultivo celular, 2) la reducción del número de manipulaciones y, por lo tanto, la reducción de la posibilidad de contaminación, 3) la reducción de horas de trabajo del personal y la reducción del coste de personal.

5 Una ventaja adicional del procedimiento según la invención, que es una consecuencia de la reducción del riesgo de contaminación con respecto a los sistemas de cultivo en múltiples matraces, es la utilización de un medio de cultivo libre de antibióticos.

10 Todavía otra ventaja adicional del procedimiento según la invención es la utilización de una concentración de suero humano preferentemente de 10% máximo. Por lo tanto, según el procedimiento de la invención, se obtiene una amplificación celular satisfactoria con una concentración de suero humano comprendida preferentemente en el intervalo de 4% a 6%.

15 Por lo tanto, realizando la etapa de expansión en *Cell-factory*TM, el procedimiento completo para la preparación de la bolsa para la utilización terapéutica de TALL resulta optimizado y resulta adecuado para la aplicación a gran escala.

20 Las ventajas del procedimiento de expansión TALL según la presente invención puede resumirse de la manera siguiente: i) los controles de calidad se limitan a una única unidad de muestreo que corresponde a una única unidad de producción (*Cell-factory*TM); a la inversa, la posibilidad de contaminación se incrementa cuando la expansión es obtenida mediante la amplificación en un número mucho mayor de unidades de fermentación individuales, realizadas en tiempos diferentes y, por lo tanto, propensas a mayores riesgos de contaminación; ii) la utilización de un número limitado de biorreactores resulta en aproximadamente el 30% de ahorro en tiempo y un 25% de reducción del coste.

25 Debe observarse que, según los procedimientos conocidos en la técnica anterior para este tipo de células, la cantidad de 2×10^9 células, correspondiente a aproximadamente 25 bolsas de 10^8 células o a 1 bolsa de $2,5 \times 10^9$ células se obtuvo con 35 matraces T175 y con un volumen de medio completo de 2,8 l. Se sigue que, mediante este procedimiento según la presente invención, el ahorro en materia prima (suero humano, medio, citoquinas) es de hasta aproximadamente el 30%.

30 Una ventaja adicional se obtiene en el número de controles realizados en los lotes finales, que consisten de un máximo de 1×10^8 células en un sistema heterogéneo conocido en la técnica anterior y de un número 10 veces superior en el lote producido mediante el sistema homogéneo descrito en la presente invención. En la práctica, esto significa que el número de controles es 10 veces inferior.

Ejemplos experimentales

1. Materiales

40 Matraces: Falcon, Beckton Dickinson;
fábrica de células: cat No. 164327 o 170009, Nunc A/S, Dinamarca; www.nuncbrand.com;
45 medio de cultivo: Iscove's Modified Dulbecco Medium, Biowhittaker 12-722, suplementado con glutamina;
CM (medio completo) que contiene glutamina y suero;
suero fetal bovino: Biowhittaker, USA;
50 suero humano, tipo AB, Biowhittaker;
IL-2 Proleuquina 1, Chiron;
55 solución salina: salina tamponada con fosfato, Biowhittaker,
albúmina humana (5%), Farma Biagini;
RIMSO 50, Baxter,
60 bolsas para crioconservación e infusión, Cryocite Baxter.

2. Procedimientos

65 Todos los cultivos celulares fueron realizados en un entorno estéril, en campana de Biohazard. En cada adición o retirada, los canales de entrada fueron desinfectados con isopropanol o con la llama.

2.1. Preparación del medio

Los lotes de suero se incomplementaron en un baño termostático a 56°C durante 1 hora. Las botellas de suero incomplementado fueron mantenidas a 4°C y fueron utilizadas en el intervalo de un mes después de la fecha de incomplementación.

2.2. Medio completo para la etapa de preamplificación

A una botella de 500 ml de IMDM se añadió FBS incomplementado (50 ml); la botella fue identificada con el lote. El medio completo fue almacenado a 4°C y fue calentado a temperatura ambiente antes de ser utilizado. El medio completo fue utilizado en el intervalo de un mes a partir de la fecha de preparación.

2.3. Medio completo para aumentar a escala *Cell-factory*TM

Se añadieron 25 ml de suero humano AB incomplementado a una botella de 500 ml de IMDM. El medio fue almacenado a 4°C y fue calentado a temperatura ambiente antes de ser utilizado. El medio completo fue utilizado en el intervalo de un mes a partir de la fecha de preparación.

2.4. Preparación de IL-2

La interleuquina (18x10⁶ IU/vial) fue resuspendida en 20 ml de PBS para obtener aproximadamente 9,10⁵ IU/ml. La solución resultante fue filtrada mediante filtros de 0,22 µm y los viales fueron dispensados en alícuotas de 1 ml. Las alícuotas fueron almacenadas a -80°C.

Esta solución (1 ml) fue diluida con medio completo, correspondiente al medio del capítulo 2.2 para la etapa de preamplificación, a continuación con un medio correspondiente al capítulo 2.3 para la etapa de amplificación, para obtener una solución de 10⁴ IU/ml. Dicha solución fue añadida a la suspensión celular, mediante la dilución de la misma (1/100) con el medio de cultivo.

2.5. Controles del procedimiento

Bioburden: La contaminación microbiana fue determinada en el medio completo utilizado para el cultivo de la líneas celulares TALL (EMDM + suplementada con suero). El medio resultante fue filtrado a través de una membrana con poros de 0,45 µm, el filtro fue quitado mediante una lanceta estéril y colocado en un medio apropiado para la visualización de la contaminación por microorganismos (el medio utilizado era agar tripticasa de soja). El filtro fue colocado en una placa. La presencia de mohos fue detectada después de la incubación a 20°C-25°C durante por lo menos 3 días, y la presencia de bacterias fue detectada después de una incubación adicional a 30°C-35°C durante por lo menos 3 días. Las placas fueron inspeccionadas visualmente para comprobar el crecimiento de microorganismos (máximo, 100 CFU AT).

Monitorización microbiológica: Las campanas utilizadas para el procesamiento TALL fueron controladas para comprobar si había microorganismos presentes durante el procedimiento. Mientras el operario estaba trabajando en las células (vertiendo, llenando las bolsas), un plato Petri con agar TSB fue expuesto en la campana, fue cubierto una vez terminado el procedimiento y fue incubado a 20°C-25°C durante por lo menos 3 días para detectar la presencia de mohos y fue incubado a 30°C-35°C durante por lo menos 3 días, para detectar la presencia de bacterias. Se encontraron microorganismos durante el muestreo en dos casos en las operaciones de manipulación de matraces, mientras que no se detectó contaminación en las operaciones de manipulación de las fábricas celulares.

Ejemplo 1

Descongelación y amplificación a escala de laboratorio

Se preparó una solución de descongelación que comprende medio IMDM suplementado con 20% de FBS y se mantuvo a 4°C previamente a su utilización.

Una ampolla que contenía células congeladas fue tomada del tambor de nitrógeno líquido, fue descongelada adecuadamente, y fue diluida (1:10) con el medio de descongelación. Las células fueron centrifugadas a baja velocidad durante 10 minutos. El sedimento fue resuspendido en 10 ml de medio completo, se transfirió a un matraz T25, y se le añadió IL-2 hasta una concentración de 100 IU/ml.

Las células fueron incubadas a 37°C durante 5 días en un entorno que contenía 10% de CO₂.

Después de un incubación de 5 días, las células fueron divididas (1:2) en un medio fresco que contenía la misma concentración de interleuquinas-2 y se dejaron crecer hasta la confluencia, que se mantuvo durante 2 días. Las células fueron recogidas con cuidado del matraz y fueron transferidas a un matraz T75 que contenía un volumen final de medio de 20 ml y la misma concentración de IL-2 (100 IU/ml). Una vez que se alcanzó la confluencia en aproximadamente 2-3 días, las células se dejaron reposar durante 2 días adicionales y a continuación fueron amplificadas en un matraz T175 con un volumen final de medio de 40 ml e IL-2 (100 IU/ml). Dos días más tarde, se añadieron 40 ml adicionales

ES 2 279 190 T3

de medio completo con interleuquina; las células se dejaron crecer durante 2 días adicionales y se dividieron (1:2) en otros 2 matraces T175 en un volumen final de 80 ml/T175.

La morfología y la densidad de las células fueron examinadas con un microscopio. A continuación, las células fueron llevadas a un volumen final de 150 ml/matraz en medio completo al 5% (IMDM que contenía suero humano AB) y se añadió IL-2 en proporción.

Las células se dividieron (1:2) en el mismo número de matraces T175 en un volumen final de 150 ml.

10 Ejemplo 2

Crecimiento dinámico de las células TALL en fermentador miniPERM y matraz spinner

Las células fueron descongeladas, cultivadas en T25 y amplificadas hasta un número de 7×10^5 células/ml para la inoculación en 0,5 l de matraz spinner o en miniPERM.

Se realizaron una serie de mediciones, destinadas a fijar los parámetros del crecimiento, en las matraces T75: las células fueron divididas cuando alcanzaron una concentración de por lo menos 1×10^6 /ml. Para mantener una viabilidad celular alta (mínimo de 90%) y una velocidad de división celular más elevada, la dilución celular nunca fue inferior a 7×10^5 células/ml y el crecimiento celular nunca superó 2×10^6 /ml. En la máxima concentración celular, el nivel de glucosa era de aproximadamente entre 320 mg/ml y 380 mg/ml. En T175, en un volumen final de 80 ml, se obtuvo una concentración de $1,25 \times 10^6$ células/ml, que corresponde a un total de aproximadamente 100×10^6 células/matraz.

Se calculó que, para una mayor viabilidad durante la congelación/descongelación, el número mínimo de células/vial tenía que ser superior a $1,2 \times 10^7$. También se observó que las células congeladas en la etapa de crecimiento logarítmico, a su vez alcanzaron la etapa de crecimiento logarítmico después de la descongelación, en un intervalo de 9 a 10 días, mientras que las células congeladas en otras etapas de ciclo de crecimiento presentaron un mayor tiempo de reposo (de entre 10 y 12 días).

Matraces spinner. El matraz spinner de 0,5 l presentaba un volumen de trabajo de 300 ml. La inoculación se realizó con $1,5 \times 10^7$ células; la velocidad de giro se fijó a 3 rpm; se midió la viabilidad celular 48 horas después y se observó que era igual al 50%. 120 horas después, todas las células estaban muertas.

Además, se realizaron 3 ensayos de amplificación en miniPERM (un biorreactor con una gran superficie con respecto a su volumen, ideal para la expansión de células en suspensión, tales como las células de hibridoma) utilizando 10% de CO_2 y adoptando las condiciones específicas siguientes:

- inoculación con 7×10^7 células en 30 ml a 10 rpm. La viabilidad celular ya empezó a decrecer después de 48 horas y todas las células estaban muertas después de 4 días. En el segundo ensayo, la velocidad de giro se redujo a 5 rpm. En el tercer día de crecimiento, la viabilidad celular era de 52%; al sexto día todas las células estaban muertas. En el tercer ensayo, la inoculación se redujo a 3×10^7 células y la velocidad de giro se redujo a 4 rpm. Aunque todas las células estaban muertas al quinto día de cultivo, en el segundo día la viabilidad celular todavía era bastante alta (80%); esto sugirió la importancia de la centrifugación para la supervivencia de las células.

Ambos ensayos de fermentación preliminar habían demostrado que las células TALL no podían crecer en las condiciones de crecimiento a gran escala tradicionales normalmente utilizados para células en suspensión o independientes de anclaje.

Ejemplo 3

Amplificación a gran escala de TALL en *Cell-factory*TM

Una suspensión celular (250 ml), obtenida a partir del cultivo en T175, como en el Ejemplo 1, y que contiene aproximadamente $0,8 \times 10^6$ células/ml, fue inoculada en una *Cell-factory*TM de 10 cámaras; se añadió la misma cantidad de medio completo. Cuatro días después, se añadió medio completo (500 ml x 3 veces) hasta un volumen total de 2 l.

La *Cell-factory*TM fue vaciada en viales estériles de 250 ml (que fueron centrifugados) y se lavaron con PBS estéril; las células fueron recuperadas en viales y centrifugadas de nuevo. Ocho días después de la inoculación, las células recuperadas de una *Cell-factory*TM eran aproximadamente $2,35 \times 10^9$.

En un ciclo de producción típico en una *Cell-factory*TM de 10 cámaras, se realizaron 72 inoculaciones y amplificaciones a partir de un único vial congelado MCB (banco de células primario). Duración total: 120 días, cultivo celular total: 144 litros. Las células obtenidas eran aproximadamente $1,44 \times 10^{11}$.

La Tabla 1 muestra los datos obtenidos a partir de una fermentación de una *Cell-factory*TM de 10 cámaras y de una *Cell-factory*TM de 40 cámaras, respectivamente.

ES 2 279 190 T3

TABLA 1

Rendimiento obtenido en una Cell-factoryTM de 10 cámaras y en una Cell-factoryTM de 40 cámaras

	Cell factory 10 (2 litros)	Cell factory 40 (8 litros)
N° inoculaciones	72	31
Días	120	120
Volúmen (litros)	144	248
N° de células	$1,44 \times 10^{11}$	$2,48 \times 10^{11}$

El contenido celular de *Cell-factory*TM fue combinado en un vial estéril de 50 ml e irradiado, como es conocido en la técnica, en un acelerador de partículas beta (betatron). El procedimiento había sido validado para proporcionar la misma cantidad de partículas que las proporcionadas mediante una fuente tradicional, tal como Cs137. El procedimiento que utiliza el betatron presenta la ventaja de que no es radioactivo y que provoca una irradiación uniforme de la solución.

Preparación de las bolsas. Una vez irradiadas, las células fueron centrifugadas (a 1.500 rpm durante 10 minutos). Se recogió una muestra de células para ensayos cualitativos y se almacenó a 4°C antes de ser congelada.

Las células irradiadas, junto con los componentes de la suspensión final y las bolsas estériles, se colocaron en una campana de flujo laminar. Las células fueron resuspendidas en la solución de congelación, que comprende Rimso 50 (DMSO al 50%) (20%) y 5% de albúmina humana (80%), dependiendo de la cantidad de células necesaria para una dosis terapéutica. Las células se contaron con un microscopio en una cámara de Burkner y las bolsas fueron llenadas con el volumen adecuado en condiciones estériles. Una vez que las bolsas fueron llenadas, el cuello de llenado fue sellado en tres puntos; de esta manera, cada bolsa formó una muestra auténtica.

El ciclo *Cell-factory*TM → irradiación → bolsas fue repetido un número de veces suficiente para obtener el número de células requerido por el lote.

Controles de esterilidad

Se realizaron, de manera continua, controles de esterilidad Bioburden, monitorización microbiológica y monitorización de micoplasma en el medio y en las campanas.

Ejemplo 4

Controles en el producto terminado y comparación entre el crecimiento a escala de laboratorio y el crecimiento a gran escala

Medición de los niveles de glucosa: Los niveles de glucosa fueron medidos en una muestra de 15 matraces (de entre los 35 matraces correspondientes a la cantidad de células en una *Cell-factory*TM) una vez recogidas las células para la preparación de la bolsa. Tal como se muestra en la Figura 1, la concentración de glucosa y el número de células son altamente variables; a la inversa, en una *Cell-factory*TM de 10 cámaras, una vez recogidas (después de 6-10 días) la glucosa muestra un valor (aproximadamente de 380 mg/dl) y las células presentaban una densidad (2×10^9 células/ml). Los diferentes niveles de glucosa y las diferentes concentraciones celulares observadas en el matraz son indicativos de condiciones metabólicas no homogéneas: de hecho, los niveles altos de glucosa se correlacionan con una baja actividad metabólica del cultivo celular, mientras que los niveles bajos de glucosa corresponden a una alta actividad metabólica del cultivo celular.

Control de calidad del producto final

Se realizaron los controles listados en la Tabla 2 en las células irradiadas. Los límites de aceptabilidad de los valores se muestran en la columna de la derecha.

TABLA 2

Ensayo	Procedimiento	Límites
Viabilidad	Ensayo de exclusión del azul tripán	> 80%
Actividad biológica	Ensayo de citotoxicidad	> 60% lisis de las células objetivo K562 en una relación 10/1
Endotoxinas	Ensayo colorimétrico del lisado de amebocitos del limulus	$\leq 0,5$ EU/ml
Fenotipo	Inmunofluorescencia (FACS)	$\geq 90\%$ CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD56 ⁺
Proliferación	Incorporación ³ H-TdR	$\leq$ dos veces el ruido de fondo después de 4 días de incubación

Ensayo de viabilidad

La determinación se realizó diluyendo 100 μ g de suspensión celular antes de hacer bolsas con una solución azul tripán de 100 μ l. Después de una dilución adecuada, se realizó un control con un microscopio contando las células muertas en la cámara de Burker.

Actividad biológica

La determinación de la citotoxicidad se realizó en la suspensión celular, antes de hacer las bolsas, con un kit Toxilight™ (BioWhittakerLT07-217). El procedimiento está basado en la medición de adenilato quinasa mediante luminiscencia. La adenilato quinasa es liberada de las células cuando éstas pierden la integridad de la membrana y convierte el sustrato ADP en ATP en presencia de Mg⁺⁺, permitiendo de esta manera, su medición. La determinación fue realizada colocando 10⁵ células objetivo K562 en una microplaca de varios tubos; las células preparadas según el procedimiento fueron añadidas, en cantidades de 10⁶, 5x10⁵ y 2,5x10⁶, para obtener relaciones T/K (o efector/objetivo) iguales a 10,5 y 2,5, respectivamente.

Una vez que las células objetivo fueron incubadas durante la noche, el porcentaje de lisis de K562 producido mediante las células preparadas según el procedimiento de la presente invención, era siempre $\geq 70\%$ del máximo consistente en una muestra de 10⁵ células K562 sometidas a lisis por ultrasonidos.

Endotoxinas

El contenido de endotoxinas fue determinado en una muestra con el cuello preparado como se ha indicado anteriormente, con un pH neutral, utilizando un kit para el ensayo cromogénico LAL y aplicando el procedimiento descrito en *European Pharmacopeia*, 4ª edición, 2002, pp. 140-145.

Fenotipo

La determinación del fenotipo mediante la medición de los marcadores celulares antes de hacer las bolsas fue realizada mediante inmunofluorescencia (FACS) con marcadores inmunológicos adecuados (CD3⁺, CD8⁺, CD56⁺) disponibles en Molmed's Quality Control Labs.

ES 2 279 190 T3

TABLA 3

Marcadores fenotípicos de células T-ALL cultivadas en matraz y en *Cell-factory*TM después de la recogida de células

Amplificación	CD3	CD8	CD56	Actividad citotóxica	³ H timidina
Matraz	> 90%	> 90%	> 90%		≤ 2 veces el ruido de fondo tras 4 días de incubación
Media Cell-factory TM	> 98%	> 93%	≥ 97%	≥ 70%	≤ 2 veces el ruido de fondo tras 4 días de incubación
Lote 1	Pre	99%	90	98	
	Post	99%	-	99	
Lote 2	Pre	99	98	99	
	Post	99	93	99	
Lote 3	Pre	99	97	92	
	Post	99	94	95	
Pre: preirradiación; Post: postirradiación; Media: media					

40 Ensayo de proliferación

La ausencia de proliferación T-ALL fue determinada mediante la medición de la incorporación de timidina tritiada. Una muestra de la suspensión celular tomada antes de hacer las bolsas fue incubada en microplacas a diferentes concentraciones en medio completo (IMDM + suero + IL-2) durante 4 días. Se añadió ³H-TdR (2 µCi/ml, 50 µl/tubo). Después de 3 horas de incubación a 37°C, la radioactividad fue medida. El valor de cpm referente a las células TALL debe ser menor o igual al doble del valor del ruido de fondo.

La Tabla 3 muestra los datos referentes a la proliferación de un lote de células cultivado en matraz y en *Cell-factory*TM, respectivamente.

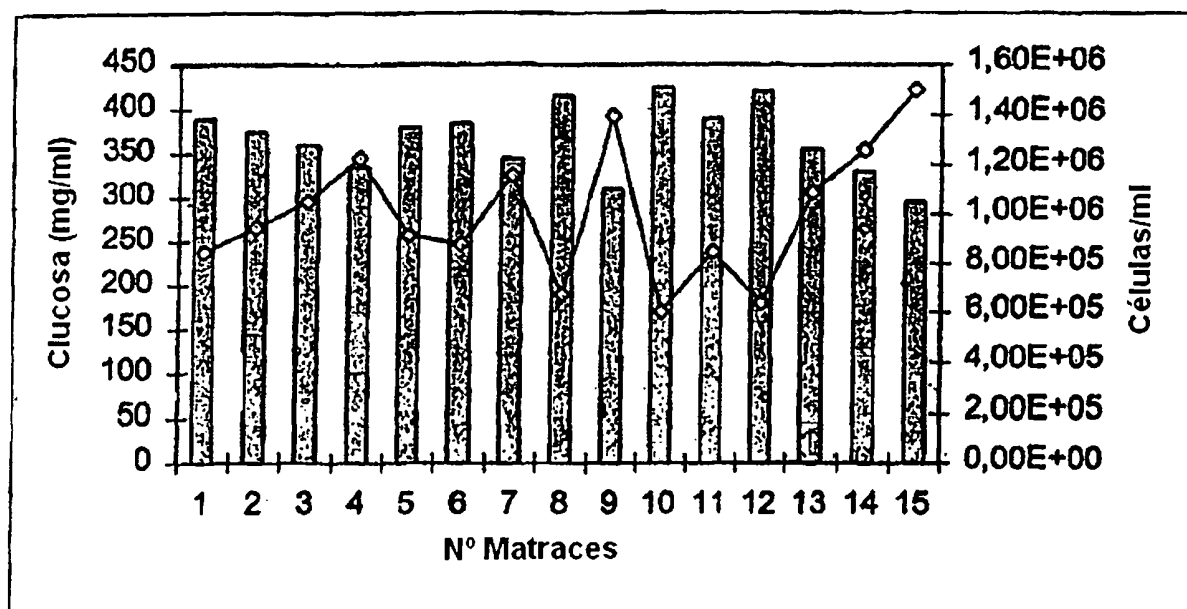
La tabla 4 muestra los datos referentes a la medición (de diferentes preparaciones) de la presencia de marcadores inmunológicos, de viabilidad celular, esterilidad y contaminación por micoplasma, si existe, después de la irradiación del cultivo.

Tabla 4. Medición de marcadores en células TALL después de la irradiación

N° de muestras	Células	CD3	Citofluorometría		Incorporación de ^3H -Timidina		Esterilidad	Mico
			CD8	CD56	Muestra	Ruido de fondo		
2	$2,5 \times 10^9$	99,59	94,8	92,51	24	27	OK	Negativo
6	$2,5 \times 10^9$	99,8	91,34	97,17	33	27	OK	Negativo
8	$2,5 \times 10^9$	99,88	93	97,84	37	26	OK	Negativo
18	1×10^8	99,59	94,8	92,51	24	27	OK	Negativo
Citofluorometría								
N° de muestras	Células	CD3	CD8	CD56	Muestra	Ruido de fondo	Esterilidad	Mico
1	$2,5 \times 10^9$	99,54	94,63	95,83	23	24	OK	Negativo
1	$2,5 \times 10^9$	99,44	96,24	98,51	37	26	OK	Negativo
8	1×10^8	99,54	93,36	99,79	34	25	OK	Negativo
Citofluorometría								
N° de muestras	Células	CD3	CD8	CD56	Muestra	Ruido de fondo	Esterilidad	Mico
7	$0,5 \times 10^9$	99,8	92,3	97,05	82	60	OK	Negativo
11	$0,5 \times 10^9$	99,54	93,36	99,79	29	29	OK	Negativo

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la expansión de linfocitos TALL, en el que por lo menos 1×10^9 células son cultivadas en condiciones homogéneas en una unidad de fermentación individual **caracterizada** porque que dicha unidad de fermentación es una pila multicámara.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que dicha unidad de fermentación es una *Cell-factory*TM.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la expansión en el sistema homogéneo es precedida por un procedimiento de preexpansión en matraz hasta obtener un número de células comprendido en el intervalo $0,7 \times 10^8$ y 1×10^8 .
4. Procedimiento según la reivindicación 3 en el que la densidad celular del inóculo es por lo menos de $0,7 \times 10^6$ células/ml y preferentemente es igual a $0,75 \times 10^6$ células/ml y, en el momento de la recogida, la densidad es inferior a 2×10^6 células/ml, preferentemente inferior a 1×10^6 .
5. Procedimiento según la reivindicación 2 en el que la *Cell-factory*TM es una unidad de 10 cámaras.
6. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que los linfocitos TALL se seleccionan de entre el grupo que comprende las líneas celulares: TALL-104, TALL-107, TALL-103/2, opcionalmente modificadas genéticamente.
7. Procedimiento según la reivindicación 6 en el que las TALL son linfocitos TALL-104.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el medio de cultivo completo en la etapa de amplificación en la *cell-factory* también comprende un máximo de 10% de suero humano, preferentemente en el intervalo de 4% a 6%, todavía más preferentemente de 5%, opcionalmente suero fetal en una concentración de 0% a 10% e interleuquina en una concentración de 100 IU/ml.
9. Procedimiento según la reivindicación 8 en el que la interleuquina-2 es añadida al cultivo celular cada 48-90 horas.
10. Procedimiento según la reivindicación 8 en el que el cultivo celular es llevado a cabo en un medio libre de antibióticos.
11. Procedimiento para la preparación de bolsas congeladas de linfocitos TALL en una cantidad de por lo menos 1×10^9 **caracterizado** por el hecho de que comprende el procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10.
12. Procedimiento según la reivindicación 11 en el que la bolsa es sellada transversalmente al cuello de llenado de la bolsa en por lo menos dos puntos para crear por lo menos una cámara que contiene un volumen de cultivo celular comprendido en el intervalo de 0,1 ml a 1 ml, separada físicamente del cultivo contenido en la bolsa para realizar controles de calidad.
13. Procedimiento para la preparación de una dosis terapéutica de por lo menos 1×10^9 linfocitos TALL en un cultivo homogéneo **caracterizado** por el hecho de que comprende el procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10.
14. Procedimiento según la reivindicación 13 en el que los linfocitos son TALL-104.



Número de células/ml (-♦-), niveles de glucosa (barras verticales)

Figura 1