

REIVINDICACIONES

1. Un método a gran escala para crioconservar células inmunitarias, el método comprende:
 - (a) proporcionar un recipiente que comprende una muestra que comprende células inmunitarias suspendidas en un medio de crioconservación, donde el volumen de la muestra es al menos un 5 por ciento menor que el volumen de capacidad total del recipiente, y donde el volumen de la muestra es de al menos 10 mL;
 - (b) enfriar el recipiente desde una temperatura por encima de la temperatura de congelación de la muestra hasta una temperatura de alrededor de -80 °C o menos en un proceso de múltiples etapas a una velocidad controlada para minimizar la entalpía de fusión latente;
 - (c) almacenar las células en fase de vapor de nitrógeno líquido, mediante lo cual se crioconservan las células inmunitarias.
2. El método de la reivindicación 1, donde la velocidad controlada para minimizar la entalpía de fusión latente comprende dos o más etapas de reducción de la temperatura a una velocidad de entre 0,75 °C por minuto y 30 °C por minuto, hasta una temperatura final de -80 °C o menos.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el tiempo total para lograr la crioconservación de las células inmunitarias es de menos de 120 minutos, menos de 110 minutos, menos de 100 minutos, menos de 90 minutos, menos de 80 minutos, menos de 70 minutos o menos de 60 minutos.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las células inmunitarias han sido aisladas recientemente o se congelan y descongelan al menos una vez.
5. El método de la reivindicación 1, donde las células inmunitarias son linfocitos citolíticos naturales (NK) naturales o modificados, linfocitos T alfa beta, linfocitos T gamma delta, células madre pluripotentes inducidas (iPSC), linfocitos T o NK derivados de iPSC, linfocitos T reguladores (Tregs), células madre hematopoyéticas (HSC), células estromales mesenquimales (MSC), células dendríticas, macrófagos o linfocitos B.
6. El método de la reivindicación 1, donde las células inmunitarias son linfocitos NK derivados de la sangre del cordón umbilical modificados con receptores quiméricos para el antígeno (CAR).
7. El método de la reivindicación 1, donde el volumen de capacidad total del recipiente

es de aproximadamente 50 mL.

8. El método de la reivindicación 1, donde el volumen de capacidad total del recipiente es de alrededor de 50 mL y el volumen de la muestra es de menos de 40 mL.

9. El método de la reivindicación 8, donde el volumen de la muestra es de alrededor de 10 mL, alrededor de 15 mL, alrededor de 20 mL, alrededor de 25 mL, alrededor de 30 mL, alrededor de 31 mL, alrededor de 32 mL, alrededor de 33 mL, alrededor de 34 mL, alrededor de 35 mL, alrededor de 36 mL, alrededor de 37 mL, alrededor de 38 mL, alrededor de 39 mL, alrededor de 40 mL, alrededor de 41 mL, alrededor de 42 mL, alrededor de 43 mL, alrededor de 44 mL o alrededor de 45 mL.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el recipiente es un criovial o una bolsa criogénica.

11. El método de la reivindicación 10, donde el recipiente es un criovial.

12. El método de la reivindicación 11, donde el criovial tiene una dimensión interior de entre 10 mm y 18 mm.

13. El método de la reivindicación 12, donde el criovial tiene una dimensión externa de alrededor de 13,5 mm.

14. El método de la reivindicación 11, donde el criovial tiene una altura de entre alrededor de 40 mm y 50 mm.

15. El método de la reivindicación 14, donde el criovial tiene una altura de alrededor de 48,3 mm.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde el recipiente es resistente al DMSO.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las células inmunitarias están presentes en una concentración de entre alrededor de 6 y 120 millones de células por mL.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el medio de crioconservación comprende un crioprotector, una albúmina, un disacárido y una solución cristalóide apirógena e isotónica.

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el medio de crioconservación comprende seroalbúmina humana (HSA), cloruro de sodio, gluconato de sodio, acetato de sodio trihidratado, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, sulfóxido de dimetilo (DMSO) y trehalosa.

20. Un método a gran escala para descongelar células inmunitarias crioconservadas, el método comprende:

- (a) calentar un baño de agua a una temperatura en el intervalo de 37 °C a 70 °C;
- (b) transferir un recipiente que comprende células inmunitarias crioconservadas de acuerdo con la reivindicación 1 al baño de agua precalentado; y
- (c) agitar el recipiente a una velocidad de entre alrededor de 100 y alrededor de 250 RPM durante un período de tiempo adecuado, para obtener de ese modo células inmunitarias descongeladas.

- 21. El método de la reivindicación 20, donde el período de tiempo adecuado es de 5-15 minutos.
- 22. El método de la reivindicación 21, donde el período de tiempo adecuado es de alrededor de 10 minutos.
- 23. El método de la reivindicación 20, donde la agitación se produce en un baño de agua con agitador orbital.
- 24. El método de la reivindicación 23, donde la agitación de las células en el baño de agua con agitador orbital se realiza a una velocidad de alrededor de 120-150 RPM.
- 25. El método de 23, donde el baño de agua con agitación orbital tiene una temperatura de alrededor de 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C o 75 °C.
- 26. El método de la reivindicación 23, donde el baño de agua con agitación orbital tiene una temperatura de alrededor de 60 °C.
- 27. El método de la reivindicación 20, donde el recipiente tiene un volumen de capacidad total de alrededor de 50 mL y un volumen de muestra entre alrededor de 8 mL y 45 mL.
- 28. El método de la reivindicación 20, donde las células inmunitarias son linfocitos citolíticos naturales (NK) naturales o modificados, linfocitos T alfa beta, linfocitos T gamma delta, linfocitos T o NK derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), linfocitos T reguladores (Tregs), macrófagos, células dendríticas, células madre hematopoyéticas (HSC), células estromales mesenquimales (MSC) o linfocitos B.
- 29. El método de la reivindicación 20, donde las células inmunitarias crioconservadas son linfocitos NK o linfocitos T modificados para que comprendan un receptor quimérico para el antígeno (CAR).
- 30. El método de la reivindicación 20, donde las células inmunitarias descongeladas tienen una viabilidad posterior a la descongelación del 90 %, 95 %, 97 % o más.
- 31. El método de la reivindicación 20, donde las células inmunitarias descongeladas conservan una función in vitro y/o in vivo similar a la de las células inmunitarias recién aisladas.
- 32. El método de la reivindicación 20, que comprende además la etapa de administrar

las células inmunitarias descongeladas a un sujeto que las necesite.

33. Un método para cambiar la temperatura de una muestra que contiene células inmunitarias desde una primera temperatura por encima de la temperatura de congelación de la muestra hasta una temperatura final de -80°C o menos, mediante lo cual se crioconserva la muestra a la temperatura final, el método comprende las siguientes etapas:

(a) colocar la muestra a una primera temperatura por encima de la temperatura de congelación de la muestra;

(b) reducir la primera temperatura hasta una segunda temperatura a una primera velocidad controlada, donde la segunda temperatura es al menos 2°C menor que la primera temperatura;

(c) reducir la segunda temperatura hasta una tercera temperatura a una segunda velocidad controlada, donde la tercera temperatura es al menos 40°C menor que la segunda temperatura;

(d) aumentar la tercera temperatura hasta una cuarta temperatura a una tercera velocidad controlada, donde la cuarta temperatura es al menos 20°C mayor que la tercera temperatura;

(e) reducir la cuarta temperatura hasta una quinta temperatura a una cuarta velocidad controlada, donde la quinta temperatura es al menos 10°C menor que la cuarta temperatura; y

(f) reducir la quinta temperatura hasta la temperatura final a una quinta velocidad controlada, donde la temperatura final es de -80°C o menos.

34. El método de la reivindicación 33, donde la primera temperatura es de alrededor de 4°C a 1°C .

35. El método de la reivindicación 33, donde la primera velocidad controlada es de entre alrededor de $0,75^{\circ}\text{C}$ y $1,25^{\circ}\text{C}$ por minuto.

36. El método de la reivindicación 33, donde la segunda temperatura es de alrededor de -2°C .

37. El método de la reivindicación 33, donde la segunda velocidad controlada es de entre alrededor de 20°C y 30°C por minuto.

38. El método de la reivindicación 33, donde la tercera temperatura es de alrededor de -60°C .

39. El método de la reivindicación 33, donde la tercera velocidad controlada es de entre alrededor de 5°C y 15°C por minuto.

40. El método de la reivindicación 33, donde la cuarta temperatura es de alrededor de -

25 °C.

41. El método de la reivindicación 33, donde la cuarta velocidad controlada es de entre alrededor de 0,75 °C y 1,25 °C por minuto.
42. El método de la reivindicación 33, donde la quinta temperatura es de alrededor de -40 °C.
43. El método de la reivindicación 33, donde la quinta velocidad controlada es de entre alrededor de 7 °C y 15 °C por minuto.
44. El método de la reivindicación 33, donde la temperatura final es de -80 °C o menos.
45. Un método que comprende la crioconservación de células inmunitarias modificadas adecuadas para la terapia celular, el método comprende (1) proporcionar un recipiente que comprende una muestra que comprende células inmunitarias suspendidas en un medio de crioconservación, donde el volumen de la muestra es al menos un 5 por ciento menor que el volumen de capacidad total del recipiente, donde el volumen de la muestra es de al menos 10 mL; y (2) congelar en etapas una población de células inmunitarias modificadas a una velocidad controlada para minimizar el impacto de la entalpía de fusión latente, donde la congelación en etapas comprende enfriar las células a una velocidad de entre 0,75 °C por minuto y 30 °C por minuto hasta una temp. final de -80 o menos, mediante lo cual se crioconservan las células.