

## DESCRIPCIÓN

Terapia de células T con receptor de antígeno quimérico específico de CD19

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo médico. Particularmente, la presente invención se refiere a una terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de CD19 basada en un nuevo scFv y a su uso para tratar neoplasias malignas CD19+.

### 10 **Estado de la técnica**

La modificación por ingeniería genética de las células autólogas para expresar CAR, redireccionándolas así para eliminar células tumorales, es una modalidad terapéutica revolucionaria para el tratamiento del cáncer y, en particular, para las neoplasias malignas de células B CD19+.

Los CAR se componen de una región extracelular responsable de unir un antígeno particular y una región intracelular que promueve la proliferación y actividad citotóxica de células T. La unión del CAR al antígeno seleccionado está mediada habitualmente por un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo monoclonal. La región derivada de scFv da como resultado una afinidad media-alta e interacción independiente del CMH del CAR con su ligando. Como CAR de segunda generación, este scFv se combina con un dominio coestimulador intracelular (habitualmente CD28 o 4-1BB) y un dominio citotóxico proactivador (CD3z).

Después de unos resultados iniciales decepcionantes con los CAR de primera generación, los ensayos clínicos más recientes con células T con CAR anti-CD19 de segunda generación han mostrado resultados notables en pacientes con leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica aguda (LLA). Varios grupos académicos, incluyendo la Universidad de Pensilvania, el Centro contra el Cáncer Memorial Sloan Kettering, Instituto Nacional del Cáncer y el Centro de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson, iniciaron estos estudios básicos usando constructos de CAR ligeramente diferentes que están actualmente en evaluación en varios ensayos clínicos multicéntricos internacionales. Dos de estos productos de CAR (tisagenlecleucel y axicabtagén ciloleucel) basados en el scFv derivado del anticuerpo monoclonal denominado clon FMC63 fueron aprobados recientemente por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos y la Agencia Europea de Medicamentos para su uso clínico. En cuanto a la eficacia, las tasas de respuesta oscilan desde el 50 hasta el 85 %, dependiendo del tipo de neoplasia maligna de células B y el constructo de CAR, con una supervivencia sin cáncer y global bastante notable. En cuanto a la seguridad, los pacientes que responden a la terapia desarrollan habitualmente aplasia de células B persistente y síndrome de liberación de citocinas transitorio que podrían ser graves en una pequeña proporción de los pacientes.

Pese a estos llamativos resultados, este enfoque terapéutico sólo está disponible en un puñado de centros y no se sabe cuándo y a qué coste esto podría estar disponible en otros lugares.

Por tanto, la presente invención se centra en desarrollar una nueva terapia de células T con receptor de antígeno quimérico específico de CD19 basada en un nuevo scFv diferente del anticuerpo monoclonal denominado clon FMC63 para el tratamiento de neoplasias malignas CD19+.

### 45 **Descripción de la invención**

#### **Breve descripción de la invención**

50 Tal como se explicó anteriormente, la presente invención se refiere a una terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de CD19 y a su uso para tratar neoplasias malignas CD19+.

Según los resultados proporcionados en la presente invención (véase el ejemplo 1), las células CART de la invención son muy citotóxicas contra células CD19+ *in vitro*, induciendo la secreción de citocinas proinflamatorias y la proliferación de células CART. *In vivo*, las células CART de la invención pueden controlar totalmente la progresión de la enfermedad en un modelo de ratón NSG con xenoinjerto de LLA de células B. Basándose en los datos preclínicos, puede concluirse que las células CART de la invención son claramente funcionales contra células CD19+.

60 Por otro lado, la presente invención muestra (véase el ejemplo 2) la producción de 28 productos de células T con CAR en el contexto de un ensayo clínico en fase I para neoplasias malignas de células B CD19+. El sistema incluye selección de células CD4-CD8, transducción lentiviral y expansión de células T usando IL-7/IL-15. 27 de los 28 productos de células T con CAR fabricados cumplían la lista completa de especificaciones y se consideraron productos válidos. La expansión de células *ex vivo* duró un promedio de 8,5 días y tenía una tasa de transducción media del 30,6 %±13,44. Todos los productos obtenidos presentaron actividad citotóxica contra células CD19+ y eran competentes en la secreción de citocinas proinflamatorias. La cinética de expansión fue más lenta en las

células de los pacientes en comparación con las células de los donantes sanos. Sin embargo, la potencia del producto era comparable. El fenotipo del subconjunto de células T con CAR era muy variable entre los pacientes y se determinó en su mayoría mediante el producto inicial. T<sub>CM</sub> y T<sub>EM</sub> fueron los fenotipos de células T predominantes obtenidos. El 38,7 % de células T con CAR obtenidas presentaron un fenotipo T<sub>N</sub> o T<sub>CM</sub>, en promedio, que son los subconjuntos capaces de establecer una memoria de células T de larga duración en los pacientes. Un análisis en profundidad para identificar factores individuales que contribuyan al fenotipo óptimo de células T reveló que la expansión de células *ex vivo* conduce a un número reducido de células T<sub>N</sub>, T<sub>SCM</sub> y T<sub>EFF</sub>, mientras que aumentan las células T<sub>CM</sub>, tanto debido a la expansión de célula como a la expresión de CAR. En general, estos resultados muestran un sistema viable para producir células T con CAR de calidad clínica para pacientes muy tratados previamente, y que los productos obtenidos cumplen las normas de calidad actuales del campo. La expansión reducida *ex vivo* puede proporcionar productos de células T con CAR con persistencia *in vivo* aumentada.

Finalmente, es de suma importancia considerar que la administración de las células T con CAR de la invención se han evaluado y se han obtenido resultados que confirman que la terapia es segura y eficaz (véase el ejemplo 3).

Así, la primera realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo, F(ab')<sub>2</sub>, Fab, scFab o scFv (a continuación en el presente documento anticuerpo, F(ab')<sub>2</sub>, Fab, scFab o scFv de la invención) que comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH), en el que dicha VH comprende polipéptidos de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y VL comprende polipéptidos de LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y en el que HCDR1 consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1, HCDR2 consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2, HCDR3 consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3, LCDR1 consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4, LCDR2 consiste en la secuencia SEQ ID NO: 5 y LCDR3 consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6.

Particularmente, las secuencias de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son las siguientes:

HCDR1 (SEQ ID NO: 1): FAFSSYWMNWV

HCDR2 (SEQ ID NO: 2): GQIYPGDGDT

HCDR3 (SEQ ID NO: 3): RKRITAVIT

LCDR1 (SEQ ID NO: 4): RASESVDNFGNSFMH

LCDR2 (SEQ ID NO: 5): IYIASNLES

LCDR3 (SEQ ID NO: 6): HQNNEDPLTF

En una realización preferida, el anticuerpo, F(ab')<sub>2</sub>, Fab, scFab o scFv de la invención comprende una región variable de cadena ligera (dominio VL) y una región variable de cadena pesada (dominio VH), en el que el dominio VL consiste en SEQ ID NO: 7 y el dominio VH consiste en SEQ ID NO: 8.

Particularmente, las secuencias de VL y VH son las siguientes:

VL (SEQ ID NO: 7)

TGNIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFG

NSFMHWYQQKSGQPRLLIYIASNLESGVPARFSGSGSRDTFTLTIDPVEADDAATYY

CHQNNEDPLTFGAGTKLELK

*Nota:* las CDR están subrayadas.

VH (SEQ ID NO: 8)

HSQIQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGFAFSSYWMNWVKQRPGGLEWIGQIYP

GDGDTKYNVKFRGKATLTADESSSTAYIQLTSLTSEDSGVYFCARKRITAVITTVFD

VWGAGTTVTVSS

*Nota:* las CDR están subrayadas.

La segunda realización de la presente invención se refiere a un CAR (a continuación en el presente documento CAR de la invención) que comprende un scFv que a su vez comprende un dominio VL, un dominio VH y un espaciador, en el que el dominio VL consiste en SEQ ID NO: 7 y el dominio VH consiste en SEQ ID NO: 8.

En una realización preferida, el CAR de la invención comprende además un dominio transmembrana, un dominio de señalización coestimulador y/o un dominio de señalización intracelular.

5 En una realización preferida, el dominio bisagra y transmembrana consiste en CD8a de SEQ ID NO: 9, el dominio de señalización coestimulador consiste en 4-1BB de SEQ ID NO: 10 y el dominio de señalización intracelular consiste en CD3δ de SEQ ID NO: 11.

Particularmente, las secuencias de CD8a, 4-1BB y CD3δ son las siguientes:

10 CD8a (SEQ ID NO: 9)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG  
VLLLSLVITLYC

15 4-1BB (SEQ ID NO: 10)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

CD3δ (SEQ ID NO: 11)

RVKFSRSA  
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNEL  
20 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

En una realización preferida, el CAR de la invención comprende SEQ ID NO: 12.

Particularmente, la secuencia del CAR de la invención es la siguiente:

25 CAR (SEQ ID NO: 12)

[VL + espaciador + VH + CD8a + 4-1BB + CD3δ]

TGNIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFG  
NSFMHWYQQKSGQPRLLIYIASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYY  
CHQNNEDPLTFGAGTKLELK  
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

HSQIQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGFAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYP  
GDGDTKYNVVKFRGKATLTADESSSTAYIQLTSLTSEDSGVYFCARKRITAVITTVFD  
VWGAGTTVTVSS

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG  
VLLLSLVITLYC

30 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL  
RVKFSRSA

DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNEL  
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

*Nota:* las CDR están subrayadas.

35 La tercera realización de la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica para el CAR de la

invención, preferiblemente un ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 13.

Particularmente, la secuencia del ácido nucleico que codifica para el CAR de la invención es la siguiente:

5 Vector de lentivirus (SEQ ID NO: 13)

[Promotor EF1A + péptido líder CD8 + VL + espaciador + VH + CD8a + 4-1BB + CD3δ]

CGCCTTTTCCGGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCCGTGAA  
CGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGT  
TCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTC  
CACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGG  
GAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCTCGTGCTTGAGTTGAGG  
CCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTG  
TCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTGTATGACCTGCTGCGA  
CGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG  
TATTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACA  
TGTTCCGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAG  
TCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCC  
CGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGAT  
GGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGG  
GAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAG  
CCGTCGCTTCATGTGACTCCACTGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTA  
GTTCTCGTGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCG  
ATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCAC  
TTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGTAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTC  
10 AAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAAGGTGTCATGA  
GCCTCATCCCGAATG GCT CTG CCT GTC ACT GGA CTG CTG CTG TCA CTG GGG  
CTG CTG CTG CAC GCC GCA AGA CCA

ACC GGT AAC ATC GTG CTG ACT CAG AGC CCA GCA TCC CTG GCC GTC TCA  
CTG GGA CAG CGG GCT ACC ATC AGC TGC AGA GCA AGC GAG TCC GTG GAC  
AAC TTC GGA AAT TCC TTT ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG TCT GGC CAG  
CCC CCT CGA CTG CTG ATC TAT ATT GCC TCT AAC CTG GAG AGT GGC GTG  
CCA GCT AGG TTC TCT GGC AGT GGG TCA CGC ACA GAC TTT ACC CTG ACA  
ATT GAT CCC GTC GAA GCC GAC GAT GCC GCT ACC TAC TAT TGC CAC CAG  
AAC AAC GAG GAC CCA CTG ACT TTC GGA GCA GGG ACA AAA CTG GAA CTG  
AAG

GGTGGAGGCGGGAGC GGAGGAGGCGGGTCG GGAGGAGGAGGATCG  
GGTGGCGGAG GCTCA

CAT TCT CAG ATT CAG CTG CAG CAG TCAGGG GCA GAG CTG GTG CGG CCA  
GGG TCC TCA GTC AAG ATT AGT TGT AAG GCT TCA GGC TTT GCT TTC AGC  
TCC TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAA CAG CGA CCA GGA CAG GGA CTG GAG  
TGG ATC GGA CAG ATC TAC CCC GGA GAC GGC GAT ACA AAG TAT AAT GTC  
AAA TTT CGG GGC AAG GCC ACC CTG ACA GCT GAC GAG TCT AGT TCA ACC  
GCC TAC ATC CAG CTG ACT TCA CTG ACC AGC GAA GAT TCC GGC GTG TAT  
TTC TGC GCT CGA AAG CGG ATC ACT GCA GTC ATT ACC ACA GTG TTT GAC  
GTG TGG GGG GCA GGA ACT ACC GTG ACC GTC AGC TCC

ACA ACT ACG CCG GCG CCG AGA CCA CCT ACA CCT GCA CCA ACT ATT GCC  
TCT CAG CCA CTG AGT CTG CGC CCC GAG GCA TGT CGA CCT GCC GCT GGC  
GGG GCT GTG CAC ACC AGG GGC CTA GAC TTC GCC TGC GAT ATC TATATT  
TGG GCT CCA CTG GCA GGA ACC TGT GGC GTG CTG CTG CTG TCT CTG GTC  
ATC ACA CTG TAC TGC

AAA AGA GGC AGG AAG AAA CTG CTG TAT ATT TTC AAG CAG CCC TTT ATG  
AGA CCT GTG CAG ACA ACT CAG GAG GAA GAC GGG TGC AGC TGT AGG TTC  
CCT GAG GAA GAG GAA GGA GGC TGT GAG CTG

CGC GTG AAA TTT TCT CGG AGT GCA GAT GCC CCA GCT TAC CAG CAG GGC  
CAG AAC CAG CTG TAT AAC GAG CTG AAT CTG GGG CGG AGA GAG GAA TAC  
GAC GTG CTG GAT AAG AGG CGC GGG CGA GAT CCA GAA ATG GGA GGA  
AAA CCC CAG CGA CGG AAG AAC CCT CAG GAG GGA CTG TAC AAT GAA CTG  
CAG AAG GAC AAA ATG GCA GAG GCC TAT TCC GAA ATC GGG ATG AAA GGA  
GAA AGA AGG CGC GGC AAG GGG CAT GAT GGC CTG TAT CAG GGA CTG TCA  
ACC GCA ACA AAA GAT ACT TAT GAT GCT CTG CAC ATG CAG GCT CTG CCC  
CCG CGG TAA

- 5 La cuarta realización de la presente invención se refiere a una célula que comprende el CAR de la invención o el ácido nucleico que codifica para el CAR de la invención (a continuación en el presente documento células con CAR de la invención).

- 10 En una realización preferida, la célula es una célula T (a continuación en el presente documento células CART de la invención) o una célula NK.

La quinta realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica (a continuación en el presente documento composición farmacéutica de la invención) que comprende una pluralidad de células de la invención y, opcionalmente, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 15 La sexta realización de la presente invención se refiere a las células o la composición farmacéutica de la invención, para su uso como medicamento, preferiblemente en el tratamiento de neoplasias malignas CD19+, más preferiblemente en el tratamiento de leucemia linfocítica aguda, linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica o cualquier trastorno CD19+.

Alternativamente, la sexta realización se refiere a un método para tratar neoplasias malignas CD19+, más preferiblemente leucemia linfocítica aguda, linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica o cualquier trastorno CD19+, que comprende la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de las células o la composición farmacéutica de la invención.

En una realización preferida, se llevó a cabo una administración fraccionada de la composición celular de la invención, particularmente un fraccionamiento progresivo de la dosis. El fraccionamiento progresivo de la dosis significa que los pacientes recibieron al menos dos, preferiblemente al menos tres fracciones de la composición de la invención, en las que el porcentaje de células administradas se aumenta progresivamente en cada fracción consecutiva. En una realización preferida, el fraccionamiento progresivo de la dosis comprende una primera fracción (alrededor del 10 %) en el día 0, seguido por la segunda fracción (alrededor del 30 %) y la tercera fracción (alrededor del 60 %).

Así, los primeros pacientes recibieron una única infusión intravenosa de la composición de la invención, pero, como prueba de concepto del fraccionamiento progresivo de la dosis, los siguientes pacientes recibieron la primera fracción (alrededor del 10 %) en el día 0, seguido por la segunda fracción (alrededor del 30 %) y la tercera fracción (alrededor del 60 %). La segunda fracción se administró preferiblemente 24-48 horas después de la primera fracción, y la tercera fracción se administró preferiblemente 24-48 horas después de la segunda fracción, sólo si el paciente no presentaba signos o síntomas de CRS.

El motivo de esta propuesta de administración fraccionada progresiva fue evitar la toxicidad, ya que se detectaron tres casos de toxicidad mortal.

En una realización preferida, la dosis total de la composición celular de la invención depende del paciente específico que va a tratarse (tal como se explica en los ejemplos). Las dosis típicas son  $0,1-5 \times 10^6$  células/kg, preferiblemente  $0,5-5 \times 10^6$  células/kg, más preferiblemente  $1-5 \times 10^6$  células/kg. Preferiblemente, la dosis total se fracciona en tres fracciones tal como se explicó anteriormente.

Con el propósito de la presente invención se definen los siguientes términos:

- El término “que comprende” significa que incluye, pero no se limita a, cualquiera cosa que siga a la expresión “que comprende”. Por tanto, el uso del término “que comprende” indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.
- Por “que consiste en” se indica que incluye, y se limita a, cualquier cosa que siga la expresión “que consiste en”. Por tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.
- “Excipiente o portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un compuesto que puede incluirse opcionalmente en las composiciones de la invención y que no provoca ningún efecto toxicológico adverso al paciente.
- Por “dosis terapéuticamente eficaz” de una composición de la invención se entiende una cantidad que, cuando se administra tal como se describe en el presente documento, otorga aproximadamente una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que padece una neoplasia maligna. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la edad, el estado general del sujeto, la gravedad del estado que va a tratarse, el modo de administración, etc. Una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto habitual en la técnica usando experimentación de rutina, basándose en la información proporcionada en el presente documento.
- “Fab” son fragmentos de anticuerpo con un tamaño de alrededor de 50 KDa, son los dominios de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo, que contiene un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera. Los fragmentos que contienen tioles con puentes disulfuro se denominan “fragmentos Fab”, mientras que los que carecen del grupo funcional tiol se denominan “fragmentos Fab’”. Para producir fragmentos “Fab”, pueden emplearse dos métodos diferentes. El método principal es a través de la escisión enzimática/química del anticuerpo completo, en el que el anticuerpo completo se escinde mediante una enzima (tal como papaína, pepsina y ficina) para formar fragmentos “F(ab’)2”, seguido por la reducción de esos fragmentos para proporcionar fragmentos “Fab”. Un método alternativo es a través de la síntesis recombinante de fragmentos de anticuerpo “F(ab’)2”, seguido por reducción química de estos fragmentos para proporcionar unidades Fab. Un fragmento “F(ab’)2”, que retiene una pequeña parte de la región bisagra de Fc, tiene dos regiones de unión a antígeno que pueden aumentar la afinidad por el antígeno. La reducción de fragmentos “F(ab’)2” produce dos fragmentos Fab’ monovalentes, que tienen un grupo sulfhidrilo libre que es útil para la conjugación con otras moléculas. Aunque la utilización de métodos de escisión enzimática/química para generar fragmentos “Fab” es conveniente y eficaz, requiere una gran cantidad de anticuerpo monoclonal como material de partida. Un fragmento “Fab” de cadena sencilla (scFab)

puede conducir a la mejora de la función y producción de fragmentos “Fab”. Según algunos estudios, los fragmentos “scFab” muestran una capacidad de unión a antígeno superior en comparación con “Fab” y compensan algunas de las desventajas de la producción de Fab soluble en *E. coli*.

- El término “fragmento variable de cadena sencilla” o “scFv” se refiere a una proteína de fusión que comprende los dominios variables de la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL) de un anticuerpo unidos entre sí con un ligador peptídico. El término también incluye un Fv estabilizado con disulfuro (dsFv). Los métodos de estabilización de scFv con enlaces disulfuro se divulgan en Reiter *et al.*, 1996. Nat Biotechnol. 14(10):1239-45.
- La expresión “fraccionamiento progresivo de la dosis” significa que los pacientes recibieron al menos dos, preferiblemente al menos tres fracciones de la composición de la invención, en las que el porcentaje de células administradas se aumenta progresivamente en cada fracción consecutiva. En una realización preferida, el fraccionamiento progresivo de la dosis comprende una primera fracción (alrededor del 10 %) en el día 0, seguido por la segunda fracción (alrededor del 30 %) y la tercera fracción (alrededor del 60 %).

### Descripción de las figuras

Figura 1. Actividad antitumoral *in vitro* del CAR de la invención. (A) Ensayo de citotoxicidad de células CART19 frente a células NALM6. Se muestra el porcentaje de células diana que sobreviven, en relación con las no tratadas, (media de 3 experimentos  $\pm$  EEM). Los paneles de la derecha muestran gráficos de citometría de flujo representativos a una razón E:T =1:8 (B) Proliferación de células T con CAR19 *in vitro* medida mediante ensayo con CFSE. Los paneles de la izquierda muestran imágenes de citometría de flujo representativas. El panel de la derecha muestra la cuantificación del índice de proliferación (PI). Se muestra la media de 3 experimentos  $\pm$  EEM. (C) Producción de citocinas (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-10) de células CART19 en cocultivo con células NALM6, medida mediante ELISA. Se muestra la media de 3 experimentos  $\pm$  EEM. (\*) indica significación estadística,  $p < 0,05$ . n.s. indica no estadísticamente significativo.

Figura 2. Actividad antitumoral *in vitro* del CAR de la invención. (A) el panel superior muestra un desarrollo cronológico del diseño experimental. Los paneles inferiores muestran imágenes bioluminiscentes que muestran la progresión de la enfermedad en diferentes días. Los animales indicados mediante (#) se sacrificaron en el día 16 debido a una progresión de la enfermedad avanzada. El resto de los animales se sacrificaron en el día 17. (B) Detección de células tumorales (CD19+) en la médula ósea de ratones mostrada en (a) (media $\pm$ DE). (C) Detección de células tumorales (CD19+) en sangre.

Figura 3. Comparación de la actividad antitumoral de las células CART de la invención con células CART basadas en FMC63. El panel superior muestra un desarrollo cronológico del diseño experimental (\*Im, imagen bioluminiscente; \*BI, muestra de sangre). Los paneles inferiores muestran imágenes de bioluminiscencia que muestran la progresión de la enfermedad en diferentes días.

Figura 4. Expansión de las células con CAR de la invención en CliniMACS Prodigy. (A) Cinética de expansión de células con CAR de la invención (número de células total). Los puntos grises indican productos individuales. Los triángulos negros indican media $\pm$ DE y curva de ajuste. (B) Cinética de expansión de células CAR19+ (red) y número de células total (negro). Se representa media $\pm$ DE. (C) Cinética de expansión de células con CAR de la invención (número de células total) que compara controles sanos y diferentes tipos de enfermedad. Se representa media $\pm$ EEM. (D) Porcentaje de células positivas para CD3 y CAR19 tal como se determina mediante citometría de flujo. También se indica media $\pm$ DE. Los paneles de la derecha muestran una imagen representativa de citometría de correspondiente a la tinción de CAR19 y CD3 en células con CAR de la invención (productos finales) y células T de control (no transducidas).

Figura 5. Potencia celular de las células con CAR de la invención. (A) Ensayo de citotoxicidad después de 4 h de cocultivo de células con CAR de la invención con células NALM6, en las razones indicadas. Se indica media $\pm$ DE de todos los 27 productos de células T con CAR. (#) la línea de trazos indica el mínimo de nivel de citotoxicidad de células con CAR de la invención para un producto que va a considerarse válido. (B) Niveles de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y granzima B medidos en los sobrenadantes de los ensayos de citotoxicidad. La razón E:T 0 indica que no hay células diana. (\*) indica significación estadística,  $p < 0,05$ . (C) Comparación del potencial citotóxico de células con CAR de la invención después de 4 h de cocultivo con células NALM6, en las razones indicadas. Se muestra media $\pm$ DE. “n.s.” indica no estadísticamente significativo (prueba no paramétrica). (D) Comparación de los niveles de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y granzima B medidos en los sobrenadantes del ensayo de citotoxicidad a una razón E:T de 1:1. “HD” indica donantes sanos. “n.s.” indica no estadísticamente significativo (prueba paramétrica aplicada a IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  y prueba no paramétrica aplicada a granzima B).

Figura 6. Caracterización del subconjunto de las células con CAR de la invención. (A) Razón CD4/CD8 de productos de aféresis, después de células CD4-CD8 y del producto final. (B) Variación de la razón CD4/CD8 durante la expansión de células. El panel izquierdo corresponde a productos con una razón inicial  $< 1$ . El panel derecho

corresponde a productos con una razón inicial > 1. (C) Eficacia de transducción de CAR19 en células CD4 y CD8. Se muestra media±DE. (D) Porcentaje de subpoblaciones de células T dentro de los productos iniciales (selección de células CD4-CD8) y productos finales (células CAR- y CAR+). (E) Diferencias en MFI para CD45RA y CCR7 en productos iniciales y finales. El panel inferior muestra análisis apareado para MFI de CCR7. (\*) indica significación estadística, p<0,05. n.s. indica no estadísticamente significativo.

Figura 7. Desenlace clínico de pacientes con leucemia linfocítica aguda. (A–D) Supervivencia libre de progresión (A), supervivencia global (B), supervivencia *in vivo* de células con CAR de la invención, tal como se mide mediante la persistencia de aplasia de células B (C), y mortalidad relacionada con el procedimiento (D) de pacientes con leucemia linfocítica aguda que pertenecen al conjunto de análisis completo modificado (n=38) según el tipo de administración (cohortes 1 y 2 frente a cohorte 3).

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se ilustra por medio de los ejemplos expuestos a continuación sin la intención de limitar su alcance de protección.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. DESARROLLO DEL CAR ANTI-CD19 DE LA INVENCION

#### Ejemplo 1.1. Materiales y métodos

##### Ejemplo 1.1.1. Donantes, líneas celulares y anticuerpo monoclonal anti-CD19

Todos los protocolos fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional correspondientes. Se obtuvieron capas leucoplaquetarias de sangre de donantes sanos del banco de sangre local de referencia (Banc de Sang i Teixits, Barcelona). Se adquirieron las líneas de células NALM6, HL60, K562 y 300.19 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Se cultivaron estas cuatro líneas celulares en medio RPMI + FBS al 10 % + antibióticos. También se adquirió la línea de células HEK293T de la ATCC (#CRL-11268) y se cultivó en DMEM+FBS al 10 %+antibióticos. Se hicieron crecer todas las líneas celulares a 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub>. Se produjeron células transfectadas estables 300.19-hCD19 usando ADNc de pUNO1-CD19 (InvivoGen, San Diego, CA).

Se generó el anticuerpo monoclonal murino anti-CD19 de la invención en el Departamento de Inmunología (Hospital Clínic de Barcelona) y se confirmó su especificidad anti-CD19.

##### Ejemplo 1.1.2. Clonación de CAR19 y producción de lentivirus

Se extrajo la secuencia correspondiente a las regiones VL y VH del anticuerpo de la invención de célula de hibridoma usando el Mouse Ig-Primer Set (Novagen, n.º de cat. 69831-3). Se sintetizó la secuencia completa de CAR19 (incluyendo péptido señal, anticuerpo scFv, regiones bisagra y transmembrana de CD8, 4-1BB y CD3z) mediante GeneScript y se clonaron en el vector lentiviral de 3ª generación pCCL (proporcionado amablemente por el Dr. Luigi Naldini; San Raffaele Hospital, Milán), bajo el control del promotor EF1α.

Para producir partículas lentivirales para estudios preclínicos, se transfectaron células HEK293T con el vector de transferencia (pCCL-EF1α-CAR19) junto con plásmidos de empaquetamiento pMDLg/pRRE (Addgene, #12251), pRSV-Rev (Addgene, #12253) y plásmido de envuelta pMD2.G (Addgene, #12259), usando polietilimina lineal MW 25000 (PEI) (Polysciences, n.º de cat. 23966-1). En resumen, se sembraron 6x10<sup>6</sup> células HEK293T 24 h antes de la transfección en placas de 10 cm. En el momento de la transfección se diluyeron 14 µg de ADN total (6,9 µg de vector de transferencia, 3,41 µg de pMDLg/pRRE, 1,7 µg de pRSV-Rev y 2 µg de pMD2.G) en DMEM libre de suero. Se añadieron 35 µg de PEI a la mezcla y se incubaron 20 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron complejos ADN-PEI en las células cultivadas en 7 ml de medio DMEM completo. Se reemplazó el medio 4 h más tarde. Se recogieron los sobrenadantes virales 48 h más tarde y se clarificaron mediante centrifugación y filtración usando un filtro de 0,45 µm. Se concentraron los sobrenadantes virales usando ultracentrifugación a 26.000 rpm durante 2 h 30 min. Se volvieron a suspender los sedimentos que contenían los virus en medio XVivo15 completo y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

##### Ejemplo 1.1.2. Titulación de lentivirus

Se determinó el número de unidades de transducción (TU/ml) mediante el método de dilución limitante. En resumen, se sembraron células HEK293T 24 h antes de la transducción. Luego, se prepararon diluciones 1:10 del sobrenadante viral y se añadieron encima de las células en medio DMEM completo + Polybrene 5 µg/ml. Se tripsinizaron las células 48 h más tarde y se marcaron con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón con fragmento F(ab')<sub>2</sub> AffiniPure conjugado con APC (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 115-136-072) antes de analizarse mediante citometría de flujo. Se usó una dilución correspondiente al 2-20 % de células positivas para calcular el

título viral.

#### Ejemplo 1.1.3. Transducción de células T y condiciones de cultivo

Se obtuvieron PBMC de donantes sanos a partir de las capas leucoplaquetarias mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll) después de la donación consentida siguiendo las instrucciones del Comité de Ética. Mientras que se eliminaron los monocitos mediante adhesión en placa convencional, se cultivaron las células restantes en medio celular X-VIVO 15 (Cultek, #BE02-060Q), suero humano AB al 5 % (Sigma, n.º de cat. H4522), penicilina-estreptomycin (100 ug/ml) e IL-2 (50 IU/ml; Miltenyi Biotec). Luego se activaron y se expandieron las células durante 24 h usando perlas conjugadas con AcM CD3 y CD28 (Dynabeads, Gibco, #11131D) y se transdujeron 24 h más tarde con el lentivirus mediante incubación durante la noche en presencia de Polybrene (Santa Cruz, #sc-134220) a 8 µg/ml. Fue necesario un periodo de expansión celular de 6-8 días antes de realizar los experimentos. Se usaron tres transducciones celulares diferentes usando tres donantes de PBMC diferentes para realizar los experimentos por triplicado.

#### Ejemplo 1.1.4. Citometría de flujo

Se usaron los siguientes AcM contra proteínas humanas, todos de BD Biosciences: CD3-FITC, CD4-BV421, CD8-APC, CD19-PE y CD33-PE. Se usó 7-AAD como marcador de viabilidad (ThermoFisher, #A1310). Se detectó la expresión de CAR19 con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón con fragmento F(ab')<sub>2</sub> AffiniPure conjugado con APC (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 115-136-072). Se hicieron atravesar las muestras el citómetro de flujo de clasificación celular activada por fluorescencia BD FACSCanto II (BD Biosciences) y se analizaron los datos usando el software BD FACSDiva.

#### Ejemplo 1.1.5. Ensayos *in vitro* de eficacia antitumoral

Se cocultivaron CART19 o células T no transducidas (UT) durante 16 h, a menos que se indique lo contrario, con líneas de células diana tumorales (NALM6 o HL60) o células tumorales de LLA de células B primarias, en diferentes razones de células efectoras con respecto a dianas (E:T), manteniendo un número fijo de células diana. Luego, se transfirieron las células a tubos TruCOUNT (BD, n.º de cat. 340334) y se incubaron con AcM contra CD4, CD8, CD19 (o CD33) y 7-AAD humanas. Se determinó la citotoxicidad calculando el número de células diana que sobreviven (identificadas como células negativas para 7-AAD/positivas para CD19 o CD33, para células diana NALM6 y HL60, respectivamente). Se paró la adquisición después de un número fijo de perlas y se calculó el número de células absoluto, permitiendo la comparación entre las diferentes razones E:T. Se analizaron los sobrenadantes de cocultivo para determinar la producción de citocinas (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-10) mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (BD OptEIA). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Se midió la proliferación de células con CAR en respuesta al antígeno CD19 usando un ensayo con CFSE. En resumen, se marcaron las células con CAR con CFSE 1 µM, se lavaron y se cultivaron con o sin estímulos de proliferación (células IL-2 50U/ml, NALM6 o K562). Se añadieron NALM6 o K562 en una razón E:T=1:1. Se paró el ensayo después de 96 h y se tiñeron las células con anti-CD4 y anti-CD8. Se midió la tinción con CFSE en células CD4+ y CD8+, y se calculó el índice de proliferación (PI) (PI=suma del número de células en diferentes generaciones / número calculado de células originales).

#### Ejemplo 1.1.6. Modelo de xenoinjerto *in vivo* de eficacia antitumoral y seguridad

Los estudios en animales fueron aprobados por CEEA-UB, el Comité de Ética competente para la experimentación en animales.

A ratones NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2r<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) de tres meses de edad se les infundieron por vía intravenosa (vena de la cola) células tumorales NALM6 (1 x 10<sup>6</sup> células/ratones) que expresan proteína fluorescente verde (GFP) y luciferasa. Luego se les asignó aleatoriamente a los ratones o bien células con CAR (10 x 10<sup>6</sup>/ratones), o bien células UT (10 x 10<sup>6</sup> células/ratones) o bien vehículo.

Se les infundieron células con CAR o UT tres días después de la infusión de NALM6. Se evaluó el crecimiento tumoral semanalmente mediante obtención de imágenes por luminiscencia (detector Hamamatsu) después de la administración intravenosa de D-luciferina. Se sacrificaron los ratones en los días 16-17 y se midió la carga tumoral en muestras de sangre y médula ósea mediante citometría de flujo.

#### Ejemplo 1.1.7. Producción de células con CAR a escala de paciente

Se obtuvieron las leucocitaféresis de donantes sanos de la Unidad de Aféresis en el Hospital Clínic de Barcelona con consentimiento informado y aprobado por el Comité de Ética del hospital. Se realizaron procedimientos de aféresis usando el dispositivo Amicus (Fresenius Kabi, Lake Zurich, IL). Se requirió un mínimo de 1 x 10<sup>8</sup> células T diluidas en 50 ml de plasma. Se cultivaron las células en el sistema CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec) usando medio TexMACS® complementado con suero AB humano al 3 % y con IL-7, IL-15 (Miltenyi Biotec #170-076-111 y

#170-076-114, respectivamente). Para determinar la activación de las células T, se usó TransACT, calidad BPF (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 170-076-156).

## Ejemplo 1.2. Resultados

### Ejemplo 1.2.1. Validación de anticuerpo monoclonal anti-hCD19 de la invención

El anticuerpo monoclonal anti-hCD19 de la invención reacciona contra la línea celular de linfoma de ratón 300.19 transfectada con hCD19, pero no con células no transfectadas. El anticuerpo monoclonal anti-hCD19 de la invención también reacciona con un subconjunto de células de sangre periférica humanas, tal como se esperaba. El anticuerpo monoclonal anti-hCD19 reacciona con líneas de células B Raji y Daudi, mientras que no se observa reactividad cuando se usan líneas de células T mieloides o linfocitos citolíticos naturales, coherente con el patrón de expresión de CD19. Además, se muestra que la preincubación de células Daudi con anticuerpo FMC63 anti-CD19, bloquea la unión del anticuerpo monoclonal, confirmando su especificidad por CD19. Finalmente, se precipitó una banda de alrededor de 100 KDa de células Daudi usando anticuerpo monoclonal anti-hCD19, coherente con el peso molecular esperado de CD19. Todos estos datos juntos indican que el anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo muy sensible y específico para una proteína CD19 humana.

### Ejemplo 1.2.2. Evaluación *in vitro* de la eficacia del CAR

Se clonó el ScFv del anticuerpo anti-CD19 de la invención en marco con el resto de los dominios de señalización de CAR en un vector lentiviral (pCCL). Para la evaluación de la eficacia del CAR19, se activaron PBMC aisladas de capas leucoplaquetarias usando Dynabeads CD3 y CD28 y se transdujeron posteriormente usando lentivirus que contiene CAR19. Después de un periodo de expansión, se confirmó la expresión de CAR19 en células T mediante citometría de flujo. El porcentaje de células con CAR varió entre el 20 y el 56 % dependiendo del experimento.

Se midió la citotoxicidad de las células con CAR mediante la erradicación *in vitro* de la línea de células NALM6 positivas para CD19. Para este propósito, se desarrolló un ensayo basado en citometría de flujo para cuantificar el número de células CD19+ viables (véase la sección de Materiales y métodos). Se eliminaron casi completamente las células NALM6 después de 16 h de cocultivo incluso después de razones E:T muy bajas (1 célula efectora por cada 8 células diana). También se observó un efecto citotóxico menor de las células no transducidas (UT) debido a la aloreactividad (figura 1A). También se sometió a prueba la especificidad de las células diana midiendo la supervivencia de una línea de células HL60 negativa para CD19 en cocultivo con células con CAR. Tal como se esperaba, no se apreció destrucción mediada por CAR en este caso. También se sometió a prueba la citotoxicidad de células con CAR contra células de LLA de células B primarias, demostrando una eficacia similar. Todos estos datos juntos indican que las células con CAR presentan un efecto citotóxico potente y específico contra células positivas para CD19 *in vitro*.

Para caracterizar mejor la respuesta de células con CAR tras la unión a CD19, se midió la proliferación celular usando un ensayo con CFSE convencional en un punto de tiempo de 96 h. La unión a antígeno debería ser capaz de promover la expansión de células con CAR para eliminar un tumor *in vivo*. Tal como se muestra en la figura 1B, las células con CAR proliferaron en contacto con la línea de células CD19+ NALM6 y en respuesta a IL-2 (en un grado menor). No se observó proliferación en ausencia de estímulo o en contacto con una línea de células negativas para CD19 (K562), confirmando que la proliferación celular estaba mediada por el reconocimiento de CD19.

Finalmente, se midió la producción de células con CAR de citocinas en el sobrenadante de los cocultivos célula efectora-diana después de 16 h y se analizó usando un ensayo ELISA. Se compararon los niveles de citocinas de los cocultivos usando células con CAR o UT (figura 1C). Mientras que las células UT no mostraron un aumento en IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , las células con CAR mostraron un aumento significativo en estas dos citocinas proinflamatorias. Tal como se esperaba, se observó un aumento muy leve y no significativo en la citocina antiinflamatoria IL-10.

### Ejemplo 1.2.3. Comparación de la actividad citotóxica de células con CAR de la invención con otros constructos de CART19

Para investigar cómo actúan las células con CAR, que contienen el scFv del anticuerpo de la invención, en comparación con otras células CART19 actualmente en uso para el tratamiento de neoplasias malignas CD19+, se clonó el scFv del anticuerpo FMC63 en el vector. El resto del constructo de CAR permaneció igual, así se podría comparar directamente la eficacia de ambos fragmentos scFv. Para estos análisis, se transdujeron PBMC con un lentivirus que contenía cada uno de los constructos de CAR. Se confirmó la expresión de la proteína de CAR19 mediante inmunotransferencia de tipo Western. Luego se comparó la actividad citotóxica del anticuerpo de la invención y las células CART de FMC63 *in vitro*. No había diferencia significativa en la potencia citotóxica entre ambos CAR, lo que indica que scFv del anticuerpo de la invención es igualmente capaz de unirse a CD19 y desencadenar una respuesta citotóxica.

### Ejemplo 1.2.4. Evaluación *in vivo* de la eficacia de CAR

Para evaluar la eficacia de las células CART19 *in vivo*, se realizó un experimento de xenoinjerto en ratones NSG.

Se asignó aleatoriamente los ratones a la administración de vehículo (A), células UT (B), células con CAR (C), células NALM6 (D), NALM6 más células UT (E) y NALM6 más células con CAR (F). Los ratones correspondientes a los grupos D, E y F se inocularon con células NALM6-Luc+GFP+ (CD19+) a través de la vena de la cola en el día 1. En el día 4, a ratones que pertenecían a los grupos B, C, E y F se les infundieron o bien células UT o bien células con CAR.

Tal como se muestra en la figura 2A, se observó claramente progresión de la enfermedad durante un periodo de 2 semanas tras la infusión de células NALM6 en el grupo NALM6 (5 de los 6 animales progresaron) y en el grupo NALM6 + células UT (4 de los 4 animales progresaron). Sin embargo, no se detectó enfermedad en ninguno de los ratones que pertenecían al grupo NALM6 + CAR (0 de los 6 ratones progresaron). Se completó el experimento, y se sacrificaron los animales en los días 16-17, cuando los animales que pertenecían al grupo NALM6 comenzaron a mostrar signos evidentes de enfermedad. Para confirmar los datos de la obtención de imágenes bioluminiscentes, se procesaron células de médula ósea y sangre para la citometría de flujo. La tinción con anticuerpo anti-CD19 humano confirmó la presencia de células tumorales en los grupos NALM6 y NALM6 + UT, mientras que no se detectaron porcentajes significativos de células tumorales en los otros grupos (figuras 2B-2C) en comparación con el control.

También la figura 3 muestra la comparación de actividad antitumoral de las células CART de la invención con células CART basadas en FMC63. El panel superior muestra un desarrollo cronológico de diseño experimental (\*Im, imagen bioluminiscente; \*BI, muestra de sangre). Los paneles muestran imágenes de bioluminiscencia que muestran la progresión de la enfermedad en diferentes días.

#### Ejemplo 1.2.5. Producción de lentivirus de CAR19 a gran escala

Habiendo demostrado la eficacia y especificidad de las células con CAR *in vivo* e *in vitro*, se procedió a ajustar y estandarizar las condiciones para la producción de células con CAR a escala de paciente.

Para producir suficiente sobrenadante lentiviral para completar el ensayo clínico, se aumentó a escala el método de producción de virus y se realizó el procedimiento completo dentro de una instalación de sala limpia siguiendo las directrices de BPF, aunque se consideró que el sobrenadante lentiviral era un reactivo intermedio en cuanto a la aprobación de la agencia del medicamento. Cada lote consistió en 4 l de virus no concentrado y el tiempo de producción/lote fue de 12 días. Se usó HEK293T como línea celular de empaquetamiento. Antes de comenzar la producción, se preparó un banco de células maestras y un banco de células de trabajo de HEK293T, así todos los lotes se produjeron usando HEK293T del mismo pase. Para cada producción, en primer lugar se expandieron HEK293T en matraces T175 durante 2 pases (expandiendo desde  $80 \times 10^6$  células hasta un mínimo de  $2829 \times 10^6$  células). Luego se transfirieron las células a cuatro cámaras de cultivo celular CellStack de 10 capas (Corning) y un CellStack de 1 capa para controlar la proliferación celular. Se llevó a cabo transfección de plásmidos al día siguiente usando 3,86 mg de PEI, 763  $\mu$ g de vector de transferencia, 377  $\mu$ g de pMDLg/pRRE, 188  $\mu$ g de pRSV-Rev y 221  $\mu$ g de pMD2.G por litro. Se recogieron los sobrenadantes virales 2 días más tarde y se clarificaron usando una membrana de PVDF de 0,45  $\mu$ m. Finalmente, se concentraron 4 l de sobrenadante viral y se sometieron a diafiltración usando un sistema de filtración de flujo tangencial KrosFlo® Research Ili (Spectrum Labs) y fibras huecas de mPES de 500 kD. Se usaron 2 l de PBS como tampón de diafiltración. Se concentró cada lote hasta 100 ml, se tomaron alícuotas en bolsas de 10 ml y se guardaron a -80 °C hasta su uso. También se guardaron pequeñas alícuotas para análisis de determinación del título viral, esterilidad y pureza. Para la validación del protocolo, se produjeron 3 lotes virales y se analizaron. Los resultados de los análisis realizados en estos 3 lotes se muestran en la tabla 1. El título viral del virus concentrado congelado osciló entre 1,1 y  $2,2 \times 10^8$  TU/ml. Las pruebas de control de calidad indicaron que los tres lotes eran negativos para crecimiento bacteriano-fúngico, micoplasma o lentivirus competentes para la replicación (RCL). También se confirmó la identidad del virus mediante amplificación PCR de los principales componentes del virus.

Tabla 1

| Parámetro                                                   | Método                 | Criterios de aceptación   | Lote 1                    | Lote 2                    | Lote 3                    |
|-------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Aspecto                                                     | inspección visual      | disolución<br>amarillenta | disolución líquida turbia | disolución líquida turbia | disolución líquida turbia |
| Título viral                                                | dilución limitante     | $>3.75 \times 10^7$ TU/ml | $>2.29 \times 10^8$ TU/ml | $>1.68 \times 10^8$ TU/ml | $>1.10 \times 10^8$ TU/ml |
| Esterilidad                                                 | crecimiento microbiano | estéril                   | estéril                   | estéril                   | estéril                   |
| Micoplasma                                                  | PCR                    | ausente                   | ausente                   | ausente                   | ausente                   |
| Identidad                                                   | PCR                    | positivo                  | positivo                  | positivo                  | positivo                  |
| RCL<br>(lentivirus<br>competente<br>para la<br>replicación) | PCR en tiempo real     | ausente                   | ausente                   | ausente                   | ausente                   |

#### Ejemplo 1.2.6. Producción de células con CAR

Se produjeron células con CAR usaron CliniMACS Prodigy (Miltenyi). Se sometieron los productos de aféresis a selección positiva para CD4 y CD8 y luego se cultivaron  $100 \times 10^6$  células T y se activaron usando anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. 24 h después de la activación, se transdujeron las células con lentivirus CAR19 a una MOI=10. Se cultivaron células en medio que contenía IL-7 y IL-15 hasta que se alcanzó el número de células deseado (normalmente 8-9 días). Se recogió el producto en NaCl al 0,9 % + HSA al 0,5 %. Para someter a prueba la consistencia y robustez del método de producción, se realizaron tres procedimientos usando productos de aféresis de tres donantes sanos diferentes. El objetivo era alcanzar un mínimo de  $35 \times 10^6$  células con CAR y una eficacia de transducción  $\geq 20$  %.

El tiempo de expansión varió entre 8 y 11 días. Se dejó avanzar la serie de ARI0001/01 hasta el día 11 para someter a prueba la capacidad de expansión de las células T de Prodigy pero se paró antes el resto de las series (día 9 y día 8 respectivamente) ya que el número mínimo de células requerido ya se había alcanzado. Se obtuvo una media de  $3780 \times 10^6$  células totales, y se terminó el porcentaje de transducción promediado al 35,8 % en el momento de la expansión celular. Por tanto, se alcanzaron los criterios de aceptación en los tres procedimientos. Una lista completa de las pruebas de calidad realizadas en los productos finales y los criterios de aceptación que se definieron para cada uno de ellos se proporciona en la tabla 2. Tal como se muestra en la misma tabla, todos los productos de CAR obtenidos cumplieron los criterios de aceptación establecidos para todos los parámetros en cuanto a pureza, seguridad y potencia.

Tabla 2

| Parámetro                                       | Método                                                                   | Criterios de aceptación                                                                                                                                                                                                                | ARI0001/01                | ARI0001/02                | ARI0001/03                |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Aspecto                                         | inspección visual                                                        | disolución líquida turbia                                                                                                                                                                                                              | disolución líquida turbia | disolución líquida turbia | disolución líquida turbia |
| Número de células CAR19+                        | recuento de células en cámara de Neubauer y citometría de flujo          | 35 x 10 <sup>6</sup> células para un paciente de 70 kg (>0.5 x 10 <sup>6</sup> células/kg)                                                                                                                                             | 1,495 x 10 <sup>6</sup>   | 1,746 x 10 <sup>6</sup>   | 1,340 x 10 <sup>6</sup>   |
| células CAR19+ (%)                              | citometría de flujo                                                      | ≥20%                                                                                                                                                                                                                                   | 26,0                      | 41,9                      | 39,7                      |
| células CD3+ (%)                                | citometría de flujo                                                      | ≥70%                                                                                                                                                                                                                                   | 97,9                      | 98,6                      | 98,6                      |
| Viabilidad celular (%)                          | recuento de células en cámara de Neubauer con exclusión con azul tripano | ≥70%                                                                                                                                                                                                                                   | 97,9                      | 98,1                      | 98,0                      |
| Esterilidad                                     | crecimiento microbiano                                                   | estéril                                                                                                                                                                                                                                | estéril                   | estéril                   | estéril                   |
| Micoplasma                                      | PCR                                                                      | ausente                                                                                                                                                                                                                                | ausente                   | ausente                   | ausente                   |
| Endotoxina                                      | ensayo cromogénico                                                       | ≤0,5 UE/ml                                                                                                                                                                                                                             | ≤0,5 UE/ml                | ≤0,5 UE/ml                | ≤0,5 UE/ml                |
| Virus casuales                                  | PCR                                                                      | ausente                                                                                                                                                                                                                                | ausente                   | ausente                   | ausente                   |
| Número de copias de transgenes/célula           | PCR en tiempo real                                                       | ≤10 copias/célula                                                                                                                                                                                                                      | 1,45                      | 2,32                      | 2,51                      |
| RCL (lentivirus competente para la replicación) | PCR en tiempo real                                                       | ausente                                                                                                                                                                                                                                | ausente                   | ausente                   | ausente                   |
| Potencia citotóxica                             | citometría de flujo                                                      | (a) fracción superviviente de células NALM6 usando una razón E:T de CART19 de 1:1 <70% o (b) diferencia en la fracción superviviente de células NALM6 entre CART19 frente a células T no transducidas usando una razón E:T de 4:1 >50% | (a) 14,9; (b) 90,9        | (a) 40,4; (b) 64,6        | (a) 43,0; (b) 67,0        |

## EJEMPLO 2. PRODUCCIÓN DE CÉLULAS T CON CAR

### Ejemplo 2.1. Materiales y métodos

5

#### Ejemplo 2.1.1. Pacientes y muestras

10

En el momento de la presentación de este original, se habían producido 28 productos de 27 pacientes inscritos en el ensayo clínico en fase I para neoplasias malignas de células B CD19+. Entre los 27 pacientes, 22 tenían LLA (14 pacientes adultos y 8 pacientes pediátricos), 4 tenían NHL y 1 LLC. Todos los pacientes incluidos en el ensayo clínico habían tenido una recaída de su enfermedad. Los regímenes de pretratamiento de los pacientes se resumen en la tabla 3.

Tabla 3

| ID del pac. | Edad | Sexo | Enfermedad | Líneas de tratamiento antes de la leucocitaféresis                                            | HCT alogénico |
|-------------|------|------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| T01         | 27   | M    | LLA        | PETHEMA 2011, blinatumomab, radioterapia                                                      | Sí (+DLI)     |
| T02         | 25   | M    | PMLBCL     | R-CHOP, R-ESHAP, HCT autólogo, radioterapia, brentuximab, GSK525762, nivolumab                | No            |
| T03         | 7    | F    | LLA        | SEHOP 2013, SEHOP 2016, inotuzumab, metotrexato + ciclofosfamida + antraciclina + prednisona  | Sí (+DLI)     |
| T04         | 19   | F    | PMLBCL     | R-CHOP, R-ESHAP, HCT autólogo, radioterapia, BURKIMAB, gemcitabina + vinorelbina + procarbina | No            |
| T05         | 51   | M    | DLBCL      | BURKIMAB, HCT autólogo, ciclofosfamida + prednisona, GSK525762, metotrexato, ciclofosfamida   | No            |
| T06         | 20   | F    | LLA        | PETHEMA 2011, PETHEMA 2008                                                                    | Sí            |
| T07         | 19   | M    | LLA        | PETHEMA 2011, FLAG-Ida                                                                        | Sí            |
| T08         | 53   | F    | LLC        | FCR, BR, ibrutinib, venetoclax, obinituzumab, idelalisib                                      | No            |
| T09         | 8    | M    | LLA        | SEHOP 2008, SEHOP 2013                                                                        | No            |
| T13         | 20   | M    | LLA        | GRAAL 2003, FLAG-Ida, blinatumomab                                                            | Sí (x2)       |
| T11         | 34   | F    | LLA        | PETHEMA 2011, Hyper-CVAD, inotuzumab                                                          | Sí            |
| T12         | 3    | F    | LLA        | SEHOP 2013, SEHOP 2016, vincristina + prednisona                                              | Sí            |
| T14         | 27   | M    | LLA        | PETHEMA 2008, FLAG-Ida, PETHEMA 2011                                                          | Sí            |
| T15         | 30   | M    | LLA        | PETHEMA 2011, FLAG-Ida, FLAG-Ida + blinatumomab, FLAG-Ida + inotuzumab                        | Sí (x2 + DLI) |
| T16         | 10   | M    | LLA        | SEHOP 2013                                                                                    | Sí            |
| T17         | 23   | M    | LLA        | PETHEMA 2011, FLAG-Ida, PETHEMA 2008, PFM-90, inotuzumab                                      | Sí            |
| T19         | 9    | F    | LLA        | PETHEMA, SEHOP 2015, radioterapia                                                             | No            |
| T20         | 35   | M    | LLA        | PETHEMA 2011, FLAG-Ida, PETHEMA 2011, metotrexato + vincristina + dexametasona                | Sí            |
| T21         | 13   | F    | LLA        | SEHOP 2013, SEHOP 2016, prednisona                                                            | Sí            |
| T22         | 29   | M    | LLA        | PETHEMA 2008, dasatinib, FLAG-Ida + ponatinib, FCR                                            | Sí            |
| T24         | 19   | M    | LLA        | PETHEMA 2011, FLAG-Ida                                                                        | No            |
| T25         | 47   | F    | LLA        | PETHEMA 2011, FLAG-Ida, PETHEMA 2011                                                          | Sí            |
| T26         | 8    | F    | LLA        | SEHOP                                                                                         | Sí            |
| T27         | 22   | M    | LLA        | PETHEMA 2008, FLAG-Ida, PETHEMA 2011                                                          | No            |
| T30         | 31   | M    | LLA        | PETHEMA 2008, blinatumomab                                                                    | Sí (+DLI)     |
| T32         | 23   | M    | LLA        | PETHEMA 2008, PETHEMA 2011, vindesina + prednisona inotuzumab                                 | Sí (x2)       |
| T34         | 45   | F    | DLBCL      | R-CHOP, R-ESHAP, BURKIMAB, radioterapia                                                       | No            |

Abreviaturas: LLA, leucemia linfocítica aguda; DLBCL, linfoma difuso de células B grandes; PMLBCL, linfoma de células B grandes mediastínico primario; LLC, leucemia linfocítica crónica; DLI, infusión de linfocitos del donante; HCT, trasplante de células hematopoyéticas; FCR, fludarabina + ciclofosfamida + rituximab; BR, bendamustina + rituximab; FLAG-Ida, fludarabina + citarabina + idarubicina + G-CSF; PETHEMA, Programa Español de Tratamientos en Hematología; SEHOP, Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica; GRAAL, Grupo para la Investigación de Leucemia Linfocítica Aguda en Adultos

Se sometieron pacientes adultos a leucocitaféresis en la Unidad de Aféresis, Hospital Clínic, y pacientes pediátricos en la Unidad de Aféresis del Hospital Sant Joan de Déu/BST, después de firmar un consentimiento informado. Se realizaron procedimientos de aféresis usando un dispositivo Amicus (Fresenius Kabi, Lake Zurich, IL). Se requirió un mínimo de  $1 \times 10^8$  células T totales diluidas en 50 ml de plasma. Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación (Celm) del Hospital Clínic. HCB/2017/0001. Ensayo clínico: CART19-BE-01. Eudra: 2016-002972-29.

#### Ejemplo 2.1.2. Producción de células con CAR de la invención

Se conectaron productos de aféresis a un conjunto de tubos del sistema CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec). Se retiraron los eritrocitos y las plaquetas mediante centrifugación en gradiente de densidades en la unidad Centricult. Se seleccionaron las células restantes usando perlas magnéticas recubiertas con CD4 y CD8. Se eluyeron las células seleccionadas en la "bolsa de reaplicación". Después de la selección, se usaron  $1 \times 10^8$  células T (de la bolsa de reaplicación) para iniciar el cultivo celular. Se crioconservaron las células restantes en bolsas y viales que iban a usarse como células de control para ensayos de calidad de productos y como reserva en caso de fallo de producción. Se cultivaron células usando el medio TexMACS® complementado con suero AB humano al 3 % (obtenido del banco de sangre. BST) y con 155 UI/ml de IL-7 y 290 UI/ml de IL-15 (Miltenyi Biotec #170-076-111 y #170-076-114, respectivamente). Se activaron inmediatamente las células usando TransACT de calidad de BPF (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 170-076-156) y se transdujeron 24 h más tarde usando lentivirus que contenía CAR19 a MOI=10. Se programó un lavado del cultivo celular 48 h después de la transducción. Luego se mantuvieron las células en cultivo con agitación creciente hasta que se alcanzó el número de células deseado (normalmente 7-10 días después del inicio del cultivo celular). Finalmente, se eluyeron las células en 100 ml de NaCl al 0.9 % + HSA al 1 %, se tomaron alícuotas según la dosis deseada de células con CAR de la invención y se crioconservaron hasta la infusión.

El objetivo era lograr 2 dosis de células/paciente de células con CAR de la invención. La dosis de células diana planeada varió dependiendo de la enfermedad del paciente. Normalmente,  $1 \times 10^6$  células con CAR de la invención (células/kg) para pacientes con LLA y LLC, y  $5 \times 10^6$  de células con CAR de la invención (células/kg) para pacientes con NHL.

#### Ejemplo 2.1.3. Anticuerpos monoclonales

Se detectó expresión de CAR19 con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón con fragmento F(ab')<sub>2</sub> AffiniPure conjugado con APC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-136-072). Se determinó la composición del producto que comprende las células con CAR de la invención mediante citometría de flujo usando tinción con los siguientes anticuerpos (todos de BD): CD45-APC, CD3-BV421, CD4-FITC, CD8-PerCPCy5.5, CD19-PECy7, CD16-PE, CD56-PE.

Para los experimentos de caracterización de subconjuntos de células T, se detectaron células CAR+ usando una quimera de proteína recombinante CD19-Fc (R&D, n.º de cat. 9269-CD-050) y un anticuerpo secundario F(ab)<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humana marcado con FITC (Life Technologies, n.º de cat. H10101C). Se combinó esta tinción con los siguientes anticuerpos monoclonales (todos de BD): CD3-BV421, CD8-APC.Cy7, CD45RA-PECy7, CD45RO-APC, CCR7-PerCPCy5.5, CD28-BV510 y CD95-PE (o CD27-PE). Se definieron subpoblaciones de células T de la siguiente manera: T<sub>N</sub>: CD45RA+, CCR7+; T<sub>SCM</sub>: CD45RA+, CCR7+, CD95+; T<sub>CM</sub>: CD45RA-, CCR7+; T<sub>EM</sub>: CD45RA-, CCR7- y T<sub>EFF</sub>: CD45RA+, CCR7-.

Para la medición de citocinas intracelulares, se usaron los siguientes anticuerpos, todos de BD: CD3-BV450, CD8-APC.H7, CD4-BV500, IFN $\gamma$ -PerCP.Cy5.5, TNF $\alpha$ -PE.

Para el experimento de exposiciones repetidas, los anticuerpos usados fueron los siguientes, todos de BD: CD3-APC, CD4-BV510, CD8-APC.Cy7, CD19-PE.

Para los análisis de citometría de flujo, se adquirieron células usando un dispositivo FACS Canto II, BD y se analizaron posteriormente usando el software FlowJo.

#### Ejemplo 2.1.4. Controles de calidad de productos

Se realizó un ensayo de potencia de productos mediante citometría de flujo. Se usó PCR en tiempo real para medir el número de copias/célula y para evaluar la presencia de lentivirus competentes para la replicación (RCL) en el

producto final. Se determinó la esterilidad del producto, la ausencia de micoplasma, endotoxina y virus casual mediante un laboratorio certificado. El virus casual incluyó la determinación de la presencia de virus del VIH entre otros. Debido a que los métodos de detección del VIH convencionales también detectan la presencia del transgén lentiviral usado para transducir las células, se usó un ensayo de PCR alternativo basado en la detección del gen Env para discriminar entre la infección por VIH y la transducción lentiviral.

#### Ejemplo 2.1.5. Medición de citocinas

Se midió el nivel de citocinas usando paneles de perlas magnéticas de citocina/quimiocina humana Milliplex MAP (Millipore). Se usaron un kit 10-plex para IFN $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-12(P40), IL-17, IL-2, IL-4 y IP-10, un kit 3-plex para IL-8, IL-15 y MIP1A (n.º de cat. HCYTOMAG-60K) y un kit 1-plex para granzima B (n.º de cat. HCD8MAG-15K). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se procesaron las muestras en un sistema Luminex 200.

Alternativamente, se midió la producción de citocinas intracelular (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) mediante citometría de flujo. En resumen, en primer lugar se marcaron las células para los marcadores extracelulares CD4, CD8 y CD3 y se incubaron 15 min. Luego se fijaron las células usando disolución de lisis 1X BD (n.º de cat. 349202) y se incubaron durante 15 min adicionales. Después de 2 lavados, se permeabilizaron las células usando tampón de FACS + saponina al 0,1 %, y se incubaron durante 15 min. Luego se incubaron las células con anti-IFN $\gamma$  y anti-TNF $\alpha$ , durante 30 min a 4 °C. Después de esto, se lavaron las células en PBS y se analizaron.

#### Ejemplo 2.1.6. Expansiones de células T a pequeña escala

Se cultivaron 0,5x10<sup>6</sup> células T con medio celular X-Vivo 15 (Cultek, n.º de cat. BE02-060Q), suero humano AB al 5 % (Sigma, n.º de cat. H4522), penicilina-estreptomicina (100  $\mu$ g/ml) y la citocina indicada: 50 UI/ml de IL-2 (Miltenyi Biotec) o 155 UI/ml de IL-7 y 290 UI/ml de IL-15 (Miltenyi Biotec). Se añadieron citocinas al medio cada 48 h. 24 h después de descongelar, se activaron las células con Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco, n.º de cat. 11131D) según las instrucciones del fabricante. Se transdujeron las células después 24 h adicionales con una MOI de 10 y luego se expandieron durante 11 días a una concentración de 0,5 x10<sup>6</sup> a 1,5x10<sup>6</sup> células T/ml.

#### Ejemplo 2.1.7. Expansión de células T después de exposiciones repetidas con células diana

Para analizar la capacidad de proliferación de las células T después del encuentro con el antígeno, se sembró un cocultivo de células T con CAR y células NALM6 a una razón de 1:1 (250.000 células cada uno). Después de 4 días de incubación, se tomó una alícuota del cultivo y se analizó para determinar el número de células T. Se marcaron las células con CD3, CD4, CD8 y CD19, y luego se añadieron 20  $\mu$ l de perlas (CountBright, n.º de cat. C36950, Invitrogen) a la muestra para determinar el número absoluto de células. Este procedimiento se repitió 3 veces.

#### Ejemplo 2.1.8. Estadística

Se evaluó la significación estadística usando el software SPSS. Se usó la prueba de la T no apareada a menos que se especifique lo contrario. Se usó el método de U-Mann Whitney para la comparación de variables con distribuciones no normales. Se consideró significación estadística cuando el valor de p era  $\leq 0,05$ .

### Ejemplo 2.2. Resultados

#### Ejemplo 2.2.1. Expansión de células T con CAR

Se obtuvieron 28 productos de aféresis de 27 pacientes incluidos en el ensayo clínico. Para un paciente, se obtuvo el producto de aféresis dos veces debido a un fallo en la producción de células con CAR de la invención (los productos T10 y T13 pertenecen al mismo paciente). La descripción de los productos de aféresis se presenta en la tabla 4. Se sometieron los productos de aféresis de los pacientes a selección magnética CD4+ y CD8+ usando el sistema CliniMACS Prodigy. En todos los casos excepto para uno (paciente T27), se obtuvo el número mínimo de células T (100x10<sup>6</sup>) (tabla 4). En el paciente T27, se inició el cultivo celular con 50x10<sup>6</sup> células.

Tabla 4

| ID. del pac. | Enfermedad     | Productos de aféresis |                         |           | Selección con CD4-CD8 |           |                                           |
|--------------|----------------|-----------------------|-------------------------|-----------|-----------------------|-----------|-------------------------------------------|
|              |                | WBC ( $\times 10^9$ ) | Linf. ( $\times 10^9$ ) | CD3+ (%)* | CD4+ (%)*             | CD8+ (%)* | Número de células total ( $\times 10^6$ ) |
| T01          | LLA en adultos | 7.15                  | 6.40                    | 24.80     | 12.60                 | 10.70     | 960                                       |
| T02          | NHL            | 3.31                  | 1.56                    | 32.50     | 11.40                 | 19.80     | 1,200                                     |
| T03          | LLA pediátrica | 4.59                  | 3.50                    | 49.38     | 22.67                 | 26.71     | 1,580                                     |
| T04          | NHL            | 4.04                  | 0.85                    | 13.50     | 6.60                  | 6.20      | 488                                       |
| T05          | NHL            | 7.71                  | 4.23                    | 30.00     | 12.10                 | 15.50     | 1,800                                     |
| T06          | LLA en adultos | 3.64                  | 3.19                    | 28.80     | 10.60                 | 16.20     | 720                                       |
| T07          | LLA en adultos | 4.91                  | 3.84                    | 29.00     | 4.40                  | 19.80     | 1,900                                     |
| T08          | LLC            | 2.88                  | 2.30                    | 19.70     | 8.80                  | 10.10     | 1,560                                     |
| T09          | LLA pediátrica | 4.27                  | 3.24                    | 21.50     | 11.30                 | 8.80      | 1,442                                     |
| T10          | LLA en adultos | 1.00                  | 0.72                    | 15.30     | 7.90                  | 6.10      | 350                                       |
| T11          | LLA en adultos | 2.08                  | 0.98                    | 13.90     | 7.90                  | 4.40      | 360                                       |
| T12          | LLA pediátrica | 8.40                  | 6.21                    | 2.20      | 1.70                  | 0.50      | 150                                       |
| T13          | LLA en adultos | 1.29                  | 0.64                    | 26.90     | 8.40                  | 15.60     | 250                                       |
| T14          | LLA en adultos | 3.22                  | 2.31                    | 38.90     | 17.80                 | 18.00     | 2,160                                     |
| T15          | LLA en adultos | 2.88                  | 1.28                    | 26.10     | 8.70                  | 14.50     | 1,050                                     |
| T16          | LLA pediátrica | 1.98                  | 1.22                    | 22.60     | 4.80                  | 15.90     | 400                                       |
| T17          | LLA en adultos | 8.55                  | 2.82                    | 27.90     | 7.40                  | 19.20     | 1,400                                     |
| T19          | LLA pediátrica | 1.09                  | 0.20                    | 22.50     | 12.80                 | 7.50      | 250                                       |
| T20          | LLA en adultos | 3.73                  | 2.23                    | 28.60     | 7.20                  | 20.70     | 760                                       |
| T21          | LLA pediátrica | 4.50                  | 2.20                    | 36.20     | 18.60                 | 14.20     | 400                                       |
| T22          | LLA en adultos | 8.37                  | 3.16                    | 42.00     | 21.40                 | 19.50     | 750                                       |
| T24          | LLA en adultos | 25.85                 | 22.00                   | 4.10      | 1.20                  | 0.70      | 200                                       |
| T25          | LLA en adultos | 0.83                  | 0.46                    | 32.50     | 5.50                  | 25.70     | 1,520                                     |
| T26          | LLA pediátrica | 0.84                  | 0.51                    | 6.50      | 1.40                  | 4.60      | 200                                       |
| T27          | LLA en adultos | 0.33                  | 0.10                    | 10.00     | 3.30                  | 6.10      | 50                                        |
| T30          | LLA en adultos | 2.06                  | 1.48                    | 46.50     | 13.20                 | 28.80     | 871                                       |
| T32          | LLA en adultos | 2.23                  | 0.69                    | 52.00     | 19.30                 | 27.40     | 2,000                                     |
| T34          | NHL            | 6.71                  | 3.54                    | 23.50     | 12.60                 | 9.70      | 993                                       |

\*% de células con respecto a WBC

Los resultados de la expansión celular en CliniMACS Prodigy para los 27 productos se presentan en la figura 4A-B. Se expandieron las células durante un promedio de 8,5 días, intervalo de 7 a 10. El número de células total promedio obtenido en el producto final fue de  $2548 \times 10^6$ , intervalo de  $600 \times 10^6$  a  $5200 \times 10^6$ . En un paciente en el que se comenzó el cultivo celular con  $50 \times 10^6$  células, el producto final también cumplió los criterios de aceptación. En este caso particular, se mantuvo el cultivo celular durante 13 días, obteniendo finalmente  $3300 \times 10^6$  células. Cuando se compararon con donantes sanos (usados en las 3 series de validación previas), las células de los pacientes parecen expandirse más lentamente, incluso si el número de series realizadas con donantes sanos es limitado (figura 4C).

Se analizaron los productos en cuanto a aspecto, cantidad, identidad, pureza, seguridad y potencia.

#### Ejemplo 2.2.2. Pureza de los productos y eficacia de transducción

5 Se caracterizó el producto final en cuanto a viabilidad celular, porcentaje de células CD3+ y porcentaje de células CAR+. Estos datos se resumen en la tabla 5.

Tabla 5

| ID del pac. | Viabilidad celular | % de CD3+ | % de CAR+ | Estéril | Micoplasma | Endotoxina | Virus casual | Copias de transgén/célula | RCL     | Potencia |
|-------------|--------------------|-----------|-----------|---------|------------|------------|--------------|---------------------------|---------|----------|
| T01         | 100                | 94.7      | 39.3      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 1.05                      | Ausente | 13.9     |
| T02         | 95                 | 96.5      | 28        | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 0.92                      | Ausente | 6.0      |
| T03         | 90                 | 96.0      | 30        | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 0.97                      | Ausente | 2.7      |
| T04         | 98                 | 98.1      | 22.8      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 0.66                      | Ausente | 17.2     |
| T05         | 93                 | 98.4      | 22.9      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 0.9                       | Ausente | 41.4     |
| T06         | 96                 | 87.1      | 43.6      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 1.55                      | Ausente | 0.6      |
| T07         | 96                 | 97.3      | 20.4      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 0.73                      | Ausente | 18.6     |
| T08         | 92                 | 98.7      | 20.7      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 1.62                      | Ausente | 21.4     |
| T09         | 100                | 99.1      | 20.6      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 0.77                      | Ausente | 8.7      |
| T10         | 98                 | 98.7      | 14.5*     | -       | -          | -          | -            | -                         | -       | -        |
| T11         | 94                 | 99.7      | 25        | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 2.31                      | Ausente | 0.04     |
| T12         | 98                 | 99.4      | 20        | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 0.43                      | Ausente | 14.4     |
| T13         | 95                 | 99.2      | 20.4      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 0.57                      | Ausente | 3.5      |
| T14         | 98                 | 99.2      | 62.2      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 1.99                      | Ausente | 0.01     |
| T15         | 93                 | 97.5      | 34.4      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 1.98                      | Ausente | 1.4      |
| T16         | 91                 | 98.7      | 26.6      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 1.46                      | Ausente | 0.1      |
| T17         | 96                 | 94.8      | 26        | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 1.47                      | Ausente | 0.2      |
| T19         | 93                 | 90.6      | 22.6      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 0.99                      | Ausente | 0.3      |
| T20         | 94                 | 98.3      | 20.8      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 1.15                      | Ausente | 0.02     |
| T21         | 91                 | 99.4      | 48.2      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 1.59                      | Ausente | 0.0      |
| T22         | 82                 | 97.3      | 44.1      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 2.1                       | Ausente | 0.0      |
| T24         | 97                 | 99.7      | 23.8      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 1.55                      | Ausente | 4.18     |
| T25         | 94                 | 98.2      | 41.5      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 2.92                      | Ausente | 0.06     |
| T26         | 97                 | 98.5      | 23        | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 0.4                       | Ausente | 28.0     |
| T27         | 98                 | 96.5      | 23.2      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 0.62                      | Ausente | 4.3      |
| T30         | 95                 | 85.7      | 26        | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 2.08                      | Ausente | 0.2      |
| T32         | 97                 | 98.2      | 35.6      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 1.93                      | Ausente | 0.2      |
| T34         | 94                 | 99.1      | 71.5      | Estéril | Ausente    | <0.5 UE/ml | Ausente      | 2.93                      | Ausente | 0.02     |

\*Valor por debajo de los criterios de aceptación

Todos los productos cumplieron los criterios de aceptación para la viabilidad celular y el porcentaje de células CD3+ (>70 % para ambos parámetros). El valor más bajo detectado para la viabilidad celular fue del 91 % y el 85,7 % para células CD3+ (figura 4D).

Para analizar el porcentaje de células CAR+, en primer lugar se validó el método de detección basándose en el uso de un anticuerpo anti-IgG de ratón con F(ab')<sub>2</sub> conjugado con APC. Para este fin, se modificó mediante ingeniería un vector en el que se coexpresaron CAR19 y GFP. La correlación entre células GFP+APC+ o GFP-APC- era del 93,5 %, indicando así que el método de detección tenía buena sensibilidad y especificidad.

Usando este sistema de detección, se evaluó el porcentaje de células CAR+ (células con CAR de la invención) en los productos de los pacientes. Todos los productos excepto uno cumplieron con la especificación de >20 % de células con CAR de la invención. En un producto (T10) sólo se detectaron el 14,5 % de células con CAR de la invención. Por consiguiente, este producto se consideró un fallo de producción. Se repitió la producción de células T con CAR para este paciente a partir de una 2ª aféresis (T13). Esta vez, pudo obtenerse un producto válido. La media (±DE) del porcentaje de células CAR+ en esta serie fue 30,6±13,44 (figura 4B-4D), ligeramente menor que las eficacias de transducción logradas en expansiones a pequeña escala (45,3 %). No se observaron diferencias significativas en la eficacia de transducción entre donantes sanos y pacientes (35,8 % frente a 30,6 %), o entre las diferentes enfermedades. También se investigó el porcentaje de células CAR+ a lo largo del tiempo durante la expansión celular. Se detectó un alto grado de variabilidad entre los pacientes, con el porcentaje de células CAR+ aumentado en algunos pacientes mientras que disminuía en otros. En cuanto al número de dosis de células obtenidos por paciente, considerando un peso convencional de 70 kg para adultos y 25 kg para pacientes pediátricos, se obtuvo rápidamente un mínimo de 2 dosis de célula (en el día 7) para todos los pacientes con LLA (dosis de 1x10<sup>6</sup> de células con CAR de la invención; células/kg). Para pacientes con NHL (dosis de 5x10<sup>6</sup> de células con CAR de la invención; células/kg), se obtuvieron 2 dosis de células para 3 de los 4 pacientes, en el día 9. En realidad, el número de dosis de células obtenidas para LLA excedió ampliamente las necesidades (9 dosis de células para pacientes adultos y 25,4 para pacientes pediátricos), indicando que el tiempo de expansión celular *ex vivo* podría reducirse si es necesario, en estos grupos de pacientes. Para NHL, el número promedio de dosis de células con CAR de la invención obtenidas fue de 2,5. Sólo un paciente con LLC se ha producido hasta ahora. Las células T de este paciente crecieron más lento y requirieron 10 días de expansión, obteniendo finalmente 398x10<sup>6</sup> células con CAR de la invención.

También se evaluó la transducción de CAR19 en cuanto a copias de ADN/célula. Tal como se muestra en la tabla 5, se detectó CAR19 en todos los productos, dentro de un intervalo de 0,4 a 2,9 copias/célula (todos por debajo del límite considerado seguro de <10 copias/célula). Tal como se esperaba, se obtuvo una correlación positiva entre el porcentaje de células CAR+ y las copias de ADN/célula, validando además ambas técnicas.

#### Ejemplo 2.2.3. Potencia de los productos

Se analizó el potencial citotóxico *in vitro* para cada producto antes de la infusión. Se inició un cocultivo del producto final con una línea de células NALM6 a diferentes razones E:T. Se midió el porcentaje de células CD19+ vivas mediante citometría de flujo después de 4 h. Como control, también se midió la actividad citotóxica de las células CD4+CD8+ no transducidas del mismo paciente. Se consideraron productos válidos cuando la fracción superviviente de células CD19+ con células con CAR de la invención, en una razón 1:1, era menor del 70 %. Los resultados se presentan en la tabla 5 y la figura 5A. Todos los productos obtenidos cumplieron la especificación de menos del 70 % de fracción superviviente CD19+ en una razón E:T de 1:1, indicando que todos los productos preparados tenían una capacidad intrínseca de eliminar células CD19+.

También se midió el nivel de citocinas en el sobrenadante de los ensayos de citotoxicidad. Tal como se esperaba, se observaron niveles aumentados de citocinas proinflamatorias tales como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  cuando las células con CAR de la invención se cocultivaron con NALM6, en comparación con células con CAR de la invención solas. El nivel de granzima B también se aumentó significativamente (figura 5B) coherente con la actividad citotóxica de células con CAR de la invención.

Se compararon células T con CAR producidas de pacientes con las obtenidas de controles sanos en cuanto a actividad citotóxica y producción de citocinas. Tal como se muestra en la figura 5C, las células T con CAR de pacientes y donantes sanos mostraron un potencial citotóxico similar (incluso ligeramente mayor para las células de pacientes aunque esto no fue estadísticamente significativo). La producción de citocinas proinflamatorias (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) y granzima B también era comparable (figura 5D).

#### Ejemplo 2.2.4. Caracterización de subconjuntos de células T

Se analizó adicionalmente la composición de los productos en cuanto a razón CD4/CD8 y los subconjuntos T<sub>N</sub>, T<sub>SCM</sub>, T<sub>CM</sub>, T<sub>E</sub> y T<sub>EM</sub>. Se invirtió la razón CD4/CD8 (razón CD4/CD8 < 1) en un gran subconjunto de pacientes que eran candidatos para una terapia con células T con CAR (figura 6A). La razón promedio CD4/CD8 era de 0,93±0,67 en los productos de aféresis. Esta razón no se alteró significativamente después de la selección de células CD4 y CD8 en la gran mayoría de los pacientes. Sin embargo, se detectó un aumento significativo en la proporción de células

CD4 durante la expansión celular. La razón CD4/CD8 aumentó desde  $0,64 \pm 0,61$  después de la selección de células CD4-CD8, hasta  $1,61 \pm 1,04$  en el producto final. Un análisis más profundo de estos datos reveló que en pacientes que comenzaban con una razón CD4/CD8  $< 1$ , la proporción de células CD4+ tendía a aumentar durante la expansión celular, mientras que en pacientes en los que se obtuvo una razón CD4/CD8  $> 1$  después de la selección de células, la proporción de células CD4+ tendía a disminuir (figura 6B). Por tanto, la diferencia en la razón CD4/CD8 ( $\Delta$ CD4/CD8) antes y después de la expansión celular era significativamente diferente dependiendo de la razón inicial. La eficacia de la transducción difirió entre los subconjuntos CD4+ y CD8+, como CD4 mostró un porcentaje significativamente mayor de células CAR+ (figura 6C).

En cuanto a los subconjuntos  $T_N$ ,  $T_{SCM}$ ,  $T_{CM}$ ,  $T_E$  y  $T_{EM}$ , se observó un alto grado de variabilidad entre los productos finales de los pacientes (figura 6D). Esta alta variabilidad está ejemplificada por el diferente nivel de expresión de CD45RA y CCR7 en muestras de diferentes pacientes (figura 6E) y no puede atribuirse a las diferentes enfermedades. Dentro de las células T CAR+ del producto final, los fenotipos de memoria (CM y EM) predominaron en la gran mayoría de los pacientes. El porcentaje promedio y la DE para cada subpoblación en las células CAR+ del producto final son las siguientes:  $T_N$ :  $7,71 \pm 13,9$ ,  $T_{SCM}$ :  $5,26 \pm 12,0$ ,  $T_{CM}$ :  $31,01 \pm 16,7$ ,  $T_{EM}$ :  $35,11 \pm 17,7$  y  $T_E$ :  $4,2 \pm 9,5$ . El análisis de células CD4 y CD8 mostró por separado que las células CD8 tienen un fenotipo más  $T_N$ ,  $T_{SCM}$  y  $T_{CM}$  que las células CD4. También se analizó cómo estos subconjuntos variaron durante la expansión celular *ex vivo* comparando subconjuntos de células T en el producto inicial (después de la selección de células CD4-CD8) y en el final, y si la expresión de CAR influyó en las subpoblaciones de células T (células CAR- frente a CAR+). Tal como se muestra en la figura 6D, se observó un aumento robusto en la proporción de  $T_{CM}$  durante la expansión celular mientras que las células  $T_N$  y  $T_{EFF}$  disminuyeron. Estos cambios en los subconjuntos de células T pueden atribuirse a una disminución en la expresión de CD45RA que se espera tras la activación celular (figura 6E).

No se detectaron cambios estadísticamente significativos en los subconjuntos de células T entre células CAR- y CAR+ en el producto final, aunque se observó un aumento adicional en  $T_{CM}$ , y consecuentemente una disminución en las células  $T_{EFF}$ , en células CAR+ en comparación con CAR- (figura 6D). De manera consistente, también se detectó un pequeño aumento en la expresión de CCR7 en células CAR+ frente a células CAR- (figura 6E). El impacto de la expresión de CAR sobre CCR7 se exploró adicionalmente en expansiones a pequeña escala independientes (véase la siguiente sección). También se evaluaron los cambios en la expresión de CD27, CD28 y CD95 mediante citometría de flujo. Se aumentó SCD95 durante la expansión celular y disminuyó CD27. CD28 no mostró cambios significativos durante la expansión, aunque presentaron una mayor expresión en CAR+ en comparación con células CAR-.

#### Ejemplo 2.2.5. Expansiones de células T con CAR a pequeña escala

Para evaluar adicionalmente el impacto de las condiciones de cultivo o la expresión de CAR sobre la proporción de la razón CD4/CD8 o el fenotipo de las células T, se repitieron expansiones celulares de células seleccionadas de pacientes en un experimento a pequeña escala, en diferentes condiciones. Se seleccionaron 6 de los pacientes (3 adultos con LLA y 3 con NHL) de los que estaban disponibles células sobrantes congeladas después de la selección de células CD4-CD8. Se expandieron las células de los pacientes en 4 condiciones diferentes: (1a) IL2 - células T no transducidas, (1b) IL2 - células T con CAR, (2a) IL7/IL15 - células T no transducidas, (2b) IL7/IL15 - células T con CAR. Se expandieron las células entre 17 y 100 veces a lo largo de un periodo de 11 días. Las células T transducidas con CAR19 se expandieron menos (o lentamente) en comparación con las equivalentes no transducidas, y las células hechas crecer con IL2 se expandieron más que las IL7/IL15 (en ambas condiciones no transducidas y con CAR19). La transducción de células o las citocinas usadas no condicionaron la razón CD4/CD8 de una manera uniforme. Sin embargo, tal como se detectó previamente en los productos expandidos usando el sistema Prodigy, en pacientes que comenzaban con una razón CD4/CD8  $> 1$  (T04 y T34), la razón tendió a disminuir, mientras que en pacientes que comenzaban con una razón CD4/CD8  $< 1$  (T02, T15, T22 y T34), la razón tendió a aumentar. En realidad, ya que se mantuvieron las expansiones durante más tiempo en las expansiones a pequeña escala que en el sistema Prodigy, se observó que la razón CD4/CD8 puede fluctuar de una manera más o menos pronunciada, pero tiende a CD4/CD8=1 si las células se cultivan durante periodos de tiempo más largos.

De manera interesante, se encontraron diferencias significativas en cuanto a subconjuntos de células T dependiendo de las condiciones de cultivo. Las citocinas usadas en el medio de crecimiento no proporcionaron diferencias significativas en cuanto a los diferentes subconjuntos en esta serie de pacientes. Sin embargo, se apreció una diferencia significativa y uniforme en las células que expresan CAR19 frente a las células T no transducidas para la mayoría de los subconjuntos. La transducción con CAR19 dio como resultado un porcentaje mucho mayor de subconjuntos  $T_N$ ,  $T_{SCM}$  y  $T_{CM}$  independientemente de la citocina usada en los medios de cultivo. Por el contrario, se disminuyeron las células  $T_{EM}$  en las células CAR19+ en comparación con las muestras no transducidas. En este caso, no se observó diferencia en MFI de CD45RA entre células no transducidas y CAR19+ que pueden tener en cuenta para la disminución en  $T_N$  y  $T_{SCM}$ , ya que en ambas condiciones, se activaron células y proliferaron *ex vivo*. Sin embargo, se observó un aumento significativo en la expresión de CCR7 en células CAR19+ en comparación con células no transducidas. Este aumento explica un mayor porcentaje de subconjuntos  $T_N$ ,  $T_{SCM}$  y  $T_{CM}$  y menor  $T_{EM}$ . El aumento en la expresión de CCR7 tras la activación de 4-1BB se ha descrito previamente en monocitos y también se ha propuesto para células T con CAR. Para someter a prueba si la activación de 4-1BB es responsable del aumento en CCR7 se observa en las células CAR+, se modificó el constructo de CAR cambiando el dominio

coestimulador a CD28. Luego se dejaron transducir o no transducir células T de un donante sano con los CAR que contienen 4-1BB o CD28 y se expandieron *in vitro* durante 10 días. De nuevo, se observó un aumento en la expresión CCR7 en la fracción positiva para CAR de las células transducidas con el constructo que contiene 4-1BB, en comparación con células no transducidas o células CAR+ que contienen CD28. Tal como se esperaba, el porcentaje de células T<sub>CM</sub> también es mayor en células CAR+ que contienen 4-1BB.

Finalmente, también se comparó la funcionalidad de las células T con CAR fabricadas con el sistema Prodigy y expansiones a pequeña escala. Para esta comparación, se usaron células de 3 pacientes expandidas con IL-7/IL-15. Se midió la producción de citocinas proinflamatorias, potencial citotóxico y expansión de células T después de ajustarlas para el mismo porcentaje de células CAR+. Se midió la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  después del cocultivo de células T con CAR con NALM6 a una razón 1:1, en un punto de tiempo de 4 h. Se midió el nivel de estas dos citocinas tanto mediante tinción intracelular como las citocinas presentes en el medio, proporcionando resultados uniformes. Las células fabricadas en el sistema Prodigy produjeron de manera uniforme ligeramente más IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  que las células fabricadas en expansiones a pequeña escala. Sin embargo, estas diferencias no eran estadísticamente significativas. En cuanto a potencial citotóxico, las células producidas mostraron con ambos métodos resultados comparables. Finalmente, la expansión de células T tras exposiciones repetidas con células diana recién obtenidas (NALM6) fue ligeramente mayor en células fabricadas con el sistema Prodigy que con las expansiones a pequeña escala, aunque no se alcanzó significación estadística. Por tanto, se concluye que las células fabricadas con el sistema Prodigy son funcionalmente comparables, o incluso ligeramente más activas, que las producidas en expansiones a pequeña escala.

Tomando todos estos datos juntos, se concluye que la expansión celular *ex vivo* provoca una pérdida de T<sub>N</sub> y T<sub>EFF</sub>, que se observa tanto en el sistema Prodigy como en las expansiones a pequeña escala. Por el contrario, las células T<sub>CM</sub> se acumulan mucho, tanto en la expansión *ex vivo* como como resultado de la expresión de CAR (en CAR que contienen 4-1BB como dominio coestimulador). Las células producidas en el sistema Prodigy son funcionalmente similares a las producidas en expansiones a pequeña escala.

### EJEMPLO 3. TERAPIA CELULAR EN PACIENTES CON NEOPLASIAS MALIGNAS CD19+ CON RECIDIVA O RESISTENTES AL TRATAMIENTO

#### Ejemplo 3.1. Materiales y métodos

##### Ejemplo 3.1.1. Población de pacientes

El estudio llevado a cabo fue un estudio piloto abierto, multicéntrico, con un solo grupo que evaluaba la seguridad y eficacia de las células con CAR de la invención en pacientes con neoplasias malignas de células B R/R. Los pacientes elegibles debían tener todo de los siguientes: (i) neoplasia maligna de células B positiva para CD19, incluyendo LLA, DLBCL, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma folicular o linfoma de células del manto; (ii) edad desde 2 hasta 80 años; (iii) estado de rendimiento de ECOG 0-2; (iv) esperanza de vida estimada desde 3 meses hasta 2 años; y (v) acceso venoso adecuado. Los criterios de exclusión clave incluyeron los antecedentes de neoplasia maligna a menos que haya estado en remisión durante más de 3 años; insuficiencia renal, hepática, pulmonar o cardíaca grave; terapia inmunodepresora activa; infección por VIH; infección por VHB o VHC activa; e infección activa que requiera terapia sistémica. Digno de mención, ni afectación del SNC ni HCT alógeno anterior fueron criterios de exclusión para este ensayo. Todos los pacientes proporcionaron consentimiento informado por escrito. La Agencia Española de Medicamentos (AEMPS) y las Juntas de Revisión Institucionales/Comités de Ética de cada sitio de estudio aprobaron el ensayo, que se realizó según los principios de la Declaración de Helsinki.

##### Ejemplo 3.1.2. Diseño del estudio, procedimientos y tratamiento

El punto final principal era la seguridad tal como se determinó mediante la mortalidad relacionada con el procedimiento y la toxicidad de grado 3-4 en el día +100 y un año. Los acontecimientos adversos (AA) de especial interés fueron el síndrome de liberación de citocinas (CRS), neurotoxicidad (actualmente conocida como síndrome de neurotoxicidad asociado con células efectoras [ICANS]) y una segunda neoplasia. Se clasificaron los AA según los criterios de terminología comunes (CTC), versión 4.0. Para CRS, se usó un sistema de clasificación. Los puntos finales secundarios incluyeron la tasa de respuesta objetiva como por los criterios NCCN, Lugano o IWLLC; la supervivencia libre de progresión (PFS), la supervivencia global (OS), la duración de respuesta (DOR), la duración de aplasia de células B y el impacto de la terapia en la calidad de vida.

Antes de la infusión de células con CAR de la invención, los pacientes recibieron fludarabina a 30 mg/m<sup>2</sup>/día más ciclofosfamida a 300 mg/m<sup>2</sup>/día en los días -6, -5, y -4. En el día 0, los pacientes recibieron una única infusión intravenosa de células con CAR de la invención a una dosis de 0,5-5 × 10<sup>6</sup> células/kg (más tarde modificada para administración fraccionada, véase a continuación).

El tamaño de muestra original fue de 10 pacientes (cohorte 1). Cinco meses después del inicio del estudio, una modificación principal aumentó el tamaño de la muestra a 39 pacientes y permitió que pacientes con o bien recuperación de células B normal en el plazo de 3 meses (recuperación de células B temprana), recidiva de la

enfermedad positiva para CD19 o enfermedad resistente al tratamiento positiva para CD19 recibieran una segunda dosis de células con CAR de la invención (cohorte 2). Doce meses después del inicio del estudio, con 19 pacientes ya inscritos, una segunda modificación aumentó el tamaño de la muestra a un total de 54 pacientes (cohorte 3) y ordenó la administración fraccionada de células con CAR de la invención (10 %, 30 % y 60 % de la dosis total) contingente en la falta de CRS después de la primera y/o segunda fracción, y también la administración temprana de tocilizumab en pacientes con CRS de grado 2. Esta segunda modificación estuvo motivada por 3 casos de toxicidad de grado 5.

#### Ejemplo 3.1.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue puramente descriptivo, con acontecimientos adversos y tasas de respuesta presentadas con intervalos de confianza del 95 % exactos de Clopper-Pearson. La mortalidad relacionada con el procedimiento (PRM) se calculó como una incidencia acumulada que consideraba la recidiva de la enfermedad como un acontecimiento de competencia. OS, PFS, DOR y la persistencia de aplasia de células B, se representaron gráficamente usando el método de Kaplan-Meier. Se evaluó el impacto de la persistencia de aplasia de células B sobre PFS usando el método de Mantel-Byar. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando SAS versión 9.4 (SAS Institute, Cary, NC) y R versión 3.6 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

#### Ejemplo 3.2. Resultados

##### Ejemplo 3.2.1. Características iniciales

Se reclutaron cincuenta y ocho pacientes en el estudio, pero cuatro de ellos nunca pasaron la fase de selección: dos pacientes no cumplían con los criterios de inclusión/exclusión y dos fueron derivados finalmente a terapia con productos comerciales que estaban disponibles en el momento. De los 54 pacientes restantes, 47 recibieron terapia con células con CAR de la invención, 19 en las cohortes 1-2 (una única infusión de dosis) y 28 en la cohorte 3 (infusión fraccionada). A estos 47 pacientes (conjunto de análisis completo modificado [mFAS]) se les diagnosticó LLA (38), DLBCL (4, uno de ellos una transformación de Richter de LLC), linfoma de células B mediastínico primario (2), linfoma folicular (2) y LLC (1). Las características iniciales de los pacientes incluidos en el mFAS se muestran en la tabla 6.

Tabla 6

| Característica                                           | Cohortes 1 y 2<br>(infusión única) | Cohorte 3<br>(infusión<br>fraccionada) | Todos los<br>pacientes |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|
| Leucemia linfocítica<br>aguda                            | n = 15                             | n = 23                                 | n = 38                 |
| Edad (a), mediana<br>(intervalo)                         | 20 (3–35)                          | 29 (4–67)                              | 24.5 (3–<br>67)        |
| Sexo femenino, n (%)                                     | 4 (27)                             | 10 (44)                                | 14 (37)                |
| Estado de rendimiento de ECOG<br>≥ 1, n (%)              | 4 (31)                             | 5 (22)                                 | 9 (25)                 |
| Regímenes anteriores,<br>mediana (intervalo)             | 4 (3–10)                           | 4 (2–8)                                | 4 (2–<br>10)           |
| Antes de inotuzumab, n (%)                               | 4 (27)                             | 9 (39)                                 | 13 (34)                |
| Antes de blinatumomab, n (%)                             | 3 (20)                             | 6 (26)                                 | 9 (24)                 |
| Antes de HCT alogénico,<br>n (%)                         | 11 (73)                            | 22 (96)                                | 33 (87)                |
| Recuento de blastocitos<br>de la médula ósea ≥ 5%, n (%) | 10 (67)                            | 7 (30)                                 | 17 (45)                |
| Linfoma no Hodgkin                                       | n = 3                              | n = 5                                  | n = 8                  |
| Histología:                                              |                                    |                                        |                        |
| ● Linfoma difuso de<br>células B grandes                 | 1 (33.3)                           | 3 (60)                                 | 4 (50)                 |
| ● Linfoma de células<br>B mediastínico primario          | 2 (66.6)                           | 0                                      | 2 (25)                 |
| ● Linfoma folicular                                      | 0 (0)                              | 2 (40)                                 | 2 (25)                 |
| Edad (a), mediana<br>(intervalo)                         | 25 (19–51)                         | 50 (22–62)                             | 47.5<br>(19–62)        |
| Sexo femenino, n (%)                                     | 1 (33)                             | 2 (40)                                 | 3 (37.5)               |
| Estado de rendimiento de ECOG<br>≥ 1, n (%)              | 1 (33)                             | 3 (60)                                 | 4 (50)                 |
| Regímenes anteriores,<br>mediana (intervalo)             | 6 (5–7)                            | 6 (4–9)                                | 6 (4–9)                |
| Antes de HCT alogénico/<br>autólogo anterior, n (%)      | 3 (100)                            | 1 (20)                                 | 4 (50)                 |

HCT, trasplante de células hematopoyéticas; NA, no aplicable/disponible

La mediana de edad fue de 26 años (intervalo, 3-67), y 17 pacientes (36 %) eran mujeres. La fecha de corte de los datos fue el 5 de noviembre de 2019, cuando todos los pacientes sometidos a infusión tenían un seguimiento mínimo de 100 días o habían experimentado recidiva de la enfermedad o muerte. En este momento, la mediana del seguimiento de los supervivientes era de 5,48 meses (intervalo, 1,87-23,6) de la infusión de células con CAR de la invención.

De los de 54 pacientes que pasaron a aféresis, 47 (87 %) y 7 (13 %) requirieron uno y dos procedimientos, respectivamente. Todos los pacientes sometidos a infusión recibieron agotamiento linfocítico con fludarabina + ciclofosfamida y recibieron células con CAR de la invención una mediana de 54 días (intervalo, 34-215) después de la inclusión en el estudio. La dosis diana original osciló desde 0,5 hasta  $5 \times 10^6$  de células con CAR de la invención (células/kg), con la condición impuesta por la AEMPS de que el primer paciente tenía que recibir la dosis mínima ( $0,5 \times 10^6$  células con CAR de la invención; células/kg). En la cohorte 3, un paciente recibió  $0,4 \times 10^6$  células con CAR de la invención (células/kg) (es decir, se omitió la última fracción) debido a CRS.

### Ejemplo 3.2.2. Toxicidad

Todos los acontecimientos adversos (AA) que se produjeron desde la inclusión en el estudio, incluso antes de la infusión de células con CAR de la invención, se clasificaron y notificaron. Se documentaron AA de grado  $\geq 3$  en el 68,4 % de pacientes con LLA y el 75 % de pacientes con NHL en el día +100, mientras que se observaron AA graves (SAE) en el 44,7 % y el 50 % de pacientes con LLA y NHL, respectivamente (tabla 7). La mortalidad relacionada con el procedimiento (PRM) en el día +100 fue del 7,9 % (intervalo de confianza [IC] del 95 % 1,7-21,4 %) para pacientes con LLA y el 0 % para pacientes con NHL. Se observaron reacciones adversas graves sospechosas (SUSAR) en cuatro pacientes: dos pacientes que desarrollaron CRS mortal y un paciente que murió de colitis pseudomembranosa mientras se recuperaba de CRS de grado 4. Estos tres pacientes, que pertenecen a las cohortes 1-2, motivaron la segunda modificación principal del estudio tal como se describió previamente. La cuarta SUSAR se notificó en un paciente con linfoma folicular de la cohorte 3 que desarrolló necrólisis epidérmica tóxica de grado 4 mientras se recuperaba de CRS de grado 2.

En cuanto a AA de especial interés, se notificó CRS en el 55,3 % (el 13,2 % de grado  $\geq 3$ ) y el 87,5 % (el 25 % de grado  $\geq 3$ ) de pacientes con LLA y NHL, respectivamente. En pacientes con LLA, se observó una reducción notable en la tasa de CRS de grado  $\geq 3$  después de la segunda modificación, descendiendo desde el 26,7 % (cohorte 1-2) hasta el 4,3 % (cohorte 3) (tabla 7).

Tabla 7

|                                                      | Cohortes 1 y 2<br>(infusión única) | Cohorte 3<br>(infusión<br>fraccionada) | Todos los<br>pacientes |
|------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|
| <b>Leucemia linfocítica<br/>aguda</b>                | <b>n = 15</b>                      | <b>n = 23</b>                          | <b>n = 38</b>          |
| Acontecimientos adversos<br>de grado $\geq 3$ , n(%) | 11 (73.3)                          | 15 (65.2)                              | 26<br>(68.4)           |
| Acontecimientos adversos<br>graves, n (%)            | 8 (53.3)                           | 9 (39.1)                               | 17<br>(44.7)           |
| CRS de grado $\geq 3$ , n (%)                        | 4 (26.7)                           | 1 (4.3)                                | 5 (13.2)               |
| ICANS de grado $\geq 3$ ,<br>n (%)                   | 1 (6.7)                            | 0 (0.0)                                | 1 (2.6)                |
| Neoplasias malignas de<br>grado $\geq 3$ , n (%)     | 1 (6.7)                            | 0 (0.0)                                | 1 (2.6)                |
| <b>Linfoma no Hodgkin</b>                            | <b>n = 3</b>                       | <b>n = 5</b>                           | <b>n = 8</b>           |
| Acontecimientos adversos<br>de grado $\geq 3$ , n(%) | 3 (100)                            | 3 (60)                                 | 6 (75)                 |
| Acontecimientos adversos<br>graves, n (%)            | 3 (100)                            | 1 (20)                                 | 4 (50)                 |
| CRS de grado $\geq 3$ , n (%)                        | 1 (33.3)                           | 1 (20)                                 | 2 (25)                 |
| ICANS de grado $\geq 3$ ,<br>n (%)                   | 0 (0)                              | 0 (0)                                  | 0 (0)                  |
| Neoplasias malignas de<br>grado $\geq 3$ , n (%)     | 0 (0)                              | 0 (0)                                  | 0 (0)                  |

CRS, síndrome de liberación de citocinas, ICANS, síndrome de neurotoxicidad asociado a células efectoras inmunitario

- 5 Además, sólo se observó ICANS de grado  $\geq 3$  en 1 (2,6 %) paciente con LLA. La única neoplasia maligna de grado  $\geq 3$  observada en el estudio fue mielodisplasia en una niña de 7 años diagnosticada con LLA que había recibido ya 6 líneas de terapia, incluyendo IO y HCT alogénico. Esta paciente se ha sometido recientemente a un segundo HCT alogénico por este motivo.
- 10 Hablando en general, los AA más comunes en pacientes con LLA fueron neutropenia (97,4 %), anemia (84,2 %), hipogammaglobulinemia (78,9 %), trombocitopenia (76,3 %) y linfopenia (73,7 %). También fue frecuente la toxicidad hepática, incluyendo un aumento de AST (50 %), un aumento de ALT (47,4 %), un aumento de GGT (39,5 %) y un aumento de fosfatasa alcalina (36,8 %), principalmente en pacientes con HCT alogénico anterior. Se observaron números similares en pacientes con NHL. Dos pacientes con LLA (2/38, 5 %) con antecedentes anteriores de HCT alogénico y terapia con IO desarrollaron síndrome de obstrucción sinusoidal hepática grave (SOS) que se resolvió con cuidados paliativos convencionales.
- 15

### Ejemplo 3.2.3. Eficacia

- 20 En pacientes con LLA, la tasa de respuesta completa (CRR) negativa para la enfermedad residual medible (MRD) fue del 71,1 % (IC del 95 % 54 %-85 %) en el día +100. Todos los pacientes evaluables (es decir, excluyendo los que murieron de manera prematura) desarrollaron aplasia de células B absoluta que duró durante una mediana de 100 días (IC del 95 % 56-100 días). PFS fue del 47 % (27-67 %) en un año para la cohorte completa de LLA, mientras que OS fue del 68,6 % (49-88 %) en 1 año (el 78 % para niños, el 65 % para adultos) (figura 7). La mediana de DOR, considerando sólo pacientes que respondieron a la terapia en el día +100, fue de 14,8 meses. De los 15 pacientes con enfermedad progresiva después de la infusión de células con CAR de la invención, se expresaron células tumorales CD19 en 13 (87 %), mientras que 2 (13 %) fueron negativos para CD19. No hubo
- 25

asociación entre la persistencia de aplasia de células B y PFS ( $P=0,33$ , prueba de Mantel-Bayar). Se detectaron anticuerpos anti-murinos humanos (HAMA) en 9/36 (25 %) pacientes con LLA, tres de ellos antes de la infusión de células con CAR de la invención. No hubo asociación entre la aparición de HAMA y la pérdida de aplasia de células B o recidiva de la enfermedad.

- 5 Los análisis de los subgrupos según el tipo de administración (cohorte 1-2 frente a cohorte 3) y la edad se representan en la tabla 8.

Tabla 8

| Población                    | n  | MRD-CRR en el día +28, tasa (IC del 95%) | MRD-CRR en el día +100, tasa (IC del 95%) | Mediana de PFS (IC del 95%) en 1 año, tasa (IC del 95%) | Mediana de DOR (IC del 95%) en 1 año, tasa (IC del 95%) | Mediana de OS (IC del 95%) en 1 año, tasa (IC del 95%) |
|------------------------------|----|------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Total                        | 38 | 84.2 (69-94)                             | 71.1 (54-85)                              | 12.0 mo (4.2-20.2) 47% (27-67%)                         | 14.8 mo (6.0-NA) 59% (34%-83%)                          | 20.2 mo (10.4-NA) 69% (49%-88%)                        |
| Cohortes 1 y 2 (dosis única) | 15 | 73.3 (45-92)                             | 66.7 (38-88)                              | 17.6 mo (0.3-NA) 51% (25%-77%)                          | 15.7 (3.6-NA) 70% (42%-98%)                             | 20.2 mo (0.3-NA) 65.5% (41%-90%)                       |
| Cohorte 3 (fraccionada)      | 23 | 91.3 (72-99)                             | 73.9 (52-90)                              | 12.0 mo (4.2-14.5) 39.5% (4%-75%)                       | 8.7 mo (2.0-NA) NA (NA-NA)                              | 14.5 mo (6.8-14.5) 62% (24%-100%)                      |
| Grupos de edad               |    |                                          |                                           |                                                         |                                                         |                                                        |
| ≤18 años                     | 11 | 81.8 (48-98)                             | 54.5 (23-83)                              | 18.1 mo (14.5-NA) 82% (59%-100%)                        | NA mo (14.8-NA) 100% (100%-100%)                        | NR (7.1-NA) 78% (50%-100%)                             |
| >18 años                     | 27 | 85.2 (66-96)                             | 77.8 (58-91)                              | 9.4 mo (3.3-20.2) 34% (12%-57%)                         | 8.7 mo (3.9-16.6) 46% (18%-75%)                         | 20.2 mo (12.8-NA) 64.5% (40%-89%)                      |
| ≤25 años                     | 19 | 78.9 (54-94)                             | 63.2 (38-84)                              | 17.6 mo (4.2-20.2) 64% (40%-89%)                        | 14.8 mo (6.0-NR) 79% (51%-100%)                         | 20.2 mo (14.5-NA) 82% (63%-100%)                       |
| >25 años                     | 19 | 89.4 (67-99)                             | 78.9 (54-94)                              | 7.2 mo (3.2-NA) 25% (0%-52%)                            | 8.7 mo (2.0-NR) 34% (0%-70%)                            | NR (6.9-NA) 50.5% (18%-84%)                            |

MRD-CRR, tasa de respuesta completa con enfermedad residual medible; PFS, supervivencia sin progresión; DOR, duración de la respuesta; OS, respuesta global: mo, meses; NA, no aplicable

Es importante destacar que la menor tasa de respuesta evidente observada en la población pediátrica se debe a una administración temprana de una segunda dosis de células con CAR de la invención antes del día +100 en dos pacientes. Ambos pacientes estaban en CR negativa para MRD para entonces, pero recibieron la segunda infusión poco antes de este punto de tiempo. Si se cuentan como pacientes que responden al tratamiento, la CRR para pacientes pediátricos sería del 72 % en vez del 55 %, y la CRR de la población completa sería del 76 % en vez del 71 %.

En pacientes con NHL, la tasa de respuesta global en el día +100 fue del 75 % (35-97 %), mientras que la CRR fue del 50 % (16-84 %).

#### Ejemplo 3.2.4. Administración fraccionada

Se administró a los pacientes la composición celular de la invención. Los primeros 15 pacientes recibieron una única infusión intravenosa de  $0,5-1 \times 10^6$  células/kg (adultos) o  $5 \times 10^6$  células/kg (niños) en el día 0. Los siguientes 38 pacientes recibieron  $1 \times 10^6$  células/kg independientemente de la edad: la primera fracción (alrededor del 10 %) en el día 0, seguido por la segunda fracción (alrededor del 30 %) y la tercera fracción (alrededor del 60 %). La segunda fracción se administró 24-48 horas después de la primera, y la tercera fracción se administró 24-48 horas después de la segunda, sólo si el paciente no presentaba signos o síntomas de CRS. El motivo de esta propuesta fueron tres casos de toxicidad mortal (dos pacientes de 11 y 19 años que murieron de CRS resistente al tratamiento y un paciente de 35 años que murió de colitis pseudomembranosa como complicación de un CRS de grado 4).

Los acontecimientos adversos y las tasas de respuesta se presentan con IC del 95 % exactos de Clopper-Pearson. Se evaluó la posible asociación entre el CRS (todos los grados y grado  $\geq 3$ ), la carga tumoral durante la selección ( $< 5$  % frente a  $\geq 5$  % de blastocitos en la médula ósea [MO]) y el tipo de administración (dosis única frente a fraccionada) mediante la prueba exacta de Fisher. También se analizó el impacto sobre la supervivencia libre de progresión (PFS) y la supervivencia global (OS) de las siguientes variables: edad ( $< 25$  frente a  $\geq 25$  años), tipo de administración, carga tumoral y pérdida de aplasia de células B (BCA), esta última como covariable dependiente del tiempo. Se presentaron gráficamente las curvas PFS/OS usando el método de Kaplan-Meier para las covariables fijadas en el tiempo y el método de Simon-Makuch para la pérdida de BCA. Se realizaron análisis de referencia para identificar el punto de tiempo más apropiado para la pérdida de BCA. Se usó la regresión de Cox univariante para evaluar el impacto de estas covariables en la PFS/OS, y aquellas con valores de p ajustados de Benjamini-Hochberg inferiores a 0,1 se introdujeron en una regresión de Cox multivariante. Se usaron los residuos de Schönfeld para comprobar el supuesto de riesgos proporcionales. Cincuenta y tres pacientes con LLA R/R recibieron terapia con la composición celular de la invención. La mediana de edad era de 30 años (intervalo de 3-68), mientras que 24 (45 %) de los pacientes eran mujeres.

Los pacientes recibieron la composición celular de la invención en una mediana de 55,5 días (intervalo de 27-216) después de la inclusión, y la mediana del tiempo de vena a vena (desde la aféresis hasta la infusión) fue de 43 días (intervalo de 21-190). Se infundió la dosis objetivo original a todos los pacientes excepto a 3 (5,7 %) que recibieron  $0,1-0,4 \times 10^6$  células/kg debido a un CRS. Se notificó CRS en el 56,6 % (IC del 95 % de 42,3 %-70,2 %) de los pacientes, siendo de grado  $\geq 3$  en el 11,3 % (IC del 95 % de 4,3 % a 23%) y requiriendo tratamiento con tocilizumab y esteroides en el 20,7 % y el 11,3 % de los pacientes, respectivamente. Los pacientes con  $\geq 5$  % de linfoblastos en la MO presentaron una mayor incidencia de CRS (cualquier grado: 82 % frente a 39 %,  $p=0,0022$ ; grado  $\geq 3$ : 27 % frente a 0 %,  $p=0,0036$ ) en comparación con aquellos con  $< 5$  % de linfoblastos. Además, la incidencia y la gravedad del CRS también se asociaron con la administración de dosis única frente a la administración fraccionada de las células (cualquier grado: 87 % frente a 45 %,  $p=0,0064$ ; grado  $\geq 3$ : 27 % frente a 5 %,  $p=0,047$ ). Se observó neurotoxicidad en el 13,2 % (IC del 95 % de 5,5 % a 25,3 %) de los pacientes, con una ocurrencia autolimitada de grado  $\geq 3$  (1,9 %). No se notificaron nuevas segundas neoplasias malignas aparte de un caso de mielodisplasia notificado previamente (1/53; 1,9 %).

El perfil de seguridad fue comparable con el de productos similares, con tasas de CRS de grado  $\geq 3$ /neurotoxicidad inferiores al 5%. Además, tanto la administración fraccionada como la carga tumoral se asociaron significativamente con la incidencia de CRS, en consonancia con estudios similares. Cabe destacar que dos pacientes inscritos en el CUP experimentaron CRS de grado  $\geq 3$  con la primera fracción ( $0,1 \times 10^6$  células/kg), pero se recuperaron satisfactoriamente después del tratamiento con tocilizumab. Ambos pacientes tenían una carga tumoral elevada ( $> 90$  % de blastocitos en la MO) en el momento de la inclusión en el estudio, y aun así pudieron recibir la terapia al mismo tiempo que evitar una toxicidad irreversible.

La tasa de CR negativa para la enfermedad residual medible (MRD) fue del 88,6 % (IC del 95 % de 77,0 % a 95,7 %) en el día +28 y del 79,2 % (IC del 95 % de 65,9 % a 89,2 %) en el día +100. Los tres pacientes que recibieron menos de  $1 \times 10^6$  células/kg debido a la toxicidad lograron CR negativa para MRD. Todos los pacientes evaluables ( $n=50$ ) desarrollaron una BCA absoluta que duró una mediana de 4,2 meses (IC del 95 % de 3,32 a 7,53 meses). La PFS fue del 50,9 % (IC del 95 % de 38,4 % a 67,4 %) y del 32,9 % (IC del 95 % de 20,6 % a 52,6 %) a 1 y 2 años, respectivamente, mientras que la OS a 1 año y 2 años fue del 70,2 % (IC del 95 % de 58,1 % a 84,8 %) y del 53,9 % (IC del 95 % de 40,5 % a 71,8 %). La enfermedad progresiva se ha producido en 27 (50,9 %; IC del 95 % de 36,8 a 64,9 %) pacientes en una mediana de 5,3 (intervalo de 0,2-23,1) meses. Las células tumorales expresaron

CD19 en 24 (89 %) de estas recidivas, mientras que tres (11 %) fueron negativas para CD19. Las células sirvieron de puente para un HCT alogénico en tres (6 %) pacientes. Se documentaron segundas infusiones en nueve pacientes (tres más de los notificados anteriormente: cuatro debido a recidiva CD19+ y cinco en pacientes con pérdida temprana de BCA). Éstas dieron como resultado respuestas transitorias y breves periodos de BCA, pero una de estas respuestas permitió al paciente recibir un segundo HCT alogénico.

Mediante un análisis univariante, sólo dos variables tuvieron un impacto potencial sobre la PFS: la carga tumoral (<5 % frente a ≥5 % de linfoblastos en la MO durante la selección), con una PFS a 2 años del 52,5 % (IC del 95 % de 36,4 % a 75,7 %) frente al 10,7 % (IC del 95 % de 2,1 % a 54,4 %) y un HR de 2,14 (IC del 95 % de 1,04 a 4,42) para los pacientes con un 5 % o más de blastocitos (valor de p ajustado=0,077). Por otro lado, la pérdida de BCA tuvo un HR de 4,41 (IC del 95 % de 1,59 a 12,2), valor de p ajustado=0,0172. Ambas variables (carga tumoral y pérdida de BCA) también se confirmaron en el modelo multivariante, con un HR de 2,05 (IC del 95 % de 1,004 a 4,17) para pacientes con un 5 % o más de blastocitos durante la selección (p=0,0484) y un HR de 4,32 (IC del 95 % de 1,57 a 11,86) para pacientes con pérdida de BCA (p=0,0045). En cuanto a la OS, ninguna de las covariables evaluadas tuvo un impacto suficiente para justificar un análisis multivariante. Ya que la pérdida de BCA tenía tal impacto en la PFS, se realizó una serie de análisis de referencia para identificar el punto de corte más apropiado para la práctica clínica. Se eligieron 3 y 6 meses como posibles tiempos de referencia porque la mediana del tiempo transcurrido hasta la pérdida de BCA fue de 4,2 meses en la presente serie. Según estos análisis, el punto de tiempo de 3 meses fue el más cercano a la significación estadística (HR de 1,83; IC del 95 % de 0,82 a 4,11; p=0,15).

En conclusión, tanto la carga tumoral como la pérdida de BCA parecían tener un impacto significativo sobre la PFS y podrían orientar a los médicos en el manejo de los pacientes tras la infusión celular. También se confirmó la validez de la administración fraccionada de células.