

P- 2021/38182

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2021/0017650**Solicitud de patente a nombre de **IMMATICS US, INC.**

CLARKE MODET & CO COLOMBIA SAS, por intermedio de JULIANA GONZÁLES GUZMÁN mayor de edad, identificada con cédula de ciudadanía número 39.808.557, abogada en ejercicio portadora de la tarjeta profesional número 174.941, actuando como apoderada de la sociedad IMMATICS US, INC., domiciliada en Houston, Texas, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **20216** notificado electrónicamente el 20 de noviembre de 2024, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, y para el cual oportunamente se solicitó prórroga el 13 de febrero de 2025, me permito presentar la siguiente información:

1. Título

El examinador afirma que el título de la invención "VECTORES VÍRICOS Y USO DE LOS MISMOS EN TERAPIAS CELULARES ADOPTIVAS" no se relaciona con el objeto de la solicitud contenida en las reivindicaciones.

Para superar la objeción, el título se modifica de acuerdo con la sugerencia del examinador: "VECTORES VÍRICOS QUE CODIFICAN CADENAS ALFA Y BETA DE TCR Y CADENAS ALFA Y BETA DE CD8".

2. Modificación al capítulo reivindicatorio:

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto a este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio que consta de treinta (30) reivindicaciones, el cual reemplaza completamente el documento presentado el 22 de diciembre de 2021. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

- 2.1 Se modificó la reivindicación 1 con el fin de:
 - 2.1.1 Reemplazar la referencia a las secuencias S1, S2, S3 y S4 por los polipéptidos CD8 α , CD8 β , TCR α y TCR β respectivamente. Esto de conformidad con el vector divulgado en los párrafos [000106] a [000109] y la Tabla 2 de la descripción.
 - 2.1.2 Restringir la disposición de las secuencias nucleotídicas en el vector en orientación 5' a 3' únicamente a CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α . Esto de conformidad con la estructura divulgada en el párrafo [000109] de la descripción.
- 2.2 Se eliminaron las reivindicaciones 2, 3, 5, 11 a 16, 19 a 24, 38 a 41, 45, 46 y 51. Además se ajustó la numeración del documento.
- 2.3 Se modificó la antigua reivindicación 4 (nueva reivindicación 2) con el fin de adaptar la redacción de manera que se pueda establecer que los polipéptidos CD8 α y CD8 β comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente.
- 2.4 Se modificó la antigua reivindicación 6 (nueva reivindicación 3) con el fin de adaptar la redacción de manera que se pueda establecer que los polipéptidos TCR α y TCR β comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente.
- 2.5 Se modificó la antigua reivindicación 7 (nueva reivindicación 4) con el fin de aclarar que la secuencia de nucleótidos que codifica dicho péptido 2A y péptido conector están ubicadas entre las secuencias de nucleótidos CD8 α y CD8 β , CD8 α y TCR β , y/o TCR α y TCR β en el vector. Dicha modificación se sustenta en el párrafo [00015] de la descripción.
- 2.6 Se modificó la antigua reivindicación 10 (nueva reivindicación 7) con el fin de aclarar que la secuencia de nucleótidos que codifica dicho péptido del sitio de escisión de furina está ubicada entre las secuencias de nucleótidos CD8 α y CD8 β , CD8 α y TCR β , y/o TCR α y TCR β . Dicha modificación se sustenta en el párrafo [00018] de la descripción.
- 2.7 Se modificó la antigua reivindicación 17 (nueva reivindicación 8) con el fin de reemplazar el conector "o" por "y".

- 2.8 Se modificó la antigua reivindicación 18 (nueva reivindicación 9) con el fin de aclarar que la secuencia promotora controla la transcripción de las secuencias de nucleótidos definidas en las reivindicaciones 1 a 8. Dicha modificación se sustenta en el párrafo [00020] de la descripción.
- 2.9 Se modificó la antigua reivindicación 25 (nueva reivindicación 10) con el fin de reemplazar la expresión "*que es un vector vírico*" por "*en donde dicho vector vírico*".
- 2.10 Se modificó la antigua reivindicación 26 (nueva reivindicación 11) con el fin de reorganizar el grupo del virus de donde se selecciona la proteína de la envoltura del vector. De ese modo el grupo se muestra de la siguiente manera, donde la porción subrayada corresponde a la modificación:
- "una proteína de la envoltura de un virus seleccionado entre el virus endógeno felino nativo (RD114), una versión quimérica de la RD114 (RD114TR), virus de la leucemia del gibón (GaLV), una versión quimérica de la GaLV (GaLV-TR), virus anfotrópico de la leucemia murina (MLV 4070A), baculovirus (GP64), virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), virus de la gripe aviar (FPV), virus del ébola (EboV), y virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) o glucoproteína de la envoltura del retrovirus del papión (BaEV)."*
- 2.11 Se modificó la antigua reivindicación 27 (nueva reivindicación 12) con el fin de:
- 2.11.1 Reclamar un método *in vitro* para preparar linfocitos T. Dicha modificación se sustenta en el párrafo [000125] de la descripción.
- 2.11.2 Reemplazar la expresión "*destinados a inmunoterapia el cual comprende*" por "*en donde dicho método comprende*".
- 2.11.3 Eliminar la expresión "*aislamiento linfocitos t de una muestra de sangre de un sujeto humano*".
- 2.11.4 Aclarar que el aminobifosfonato comprende ácido zoledrónico. Dicha modificación se sustenta en la antigua reivindicación 29.
- 2.11.5 Aclarar que la activación de células T aisladas también se da en presencia de un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28.

Dicha modificación se sustenta en el párrafo [00048], [0053], [00192] y [00207], así como en la Figura 4 de la solicitud.

- 2.12 Se modificó la antigua reivindicación 28 (nueva reivindicación 13) con el fin de reemplazar la expresión "*muestra humana obtenida por leucocitaféresis*" por "*muestra de leucocitaféresis humana*".
- 2.13 Se modificó la antigua reivindicación 29 (nueva reivindicación 14), con el fin de:
- 2.13.1 Reemplazar la expresión "*es seleccionado entre*" por "*además comprende*".
 - 2.13.2 Eliminar la opción de ácido zoledrónico.
 - 2.13.3 Reemplazar el término "ibandyrónico" por "ibandrónico". Esto de conformidad con el párrafo [00032] de la descripción.
- 2.14 Se modificó la antigua reivindicación 32 (nueva reivindicación 17) con el fin de aclarar que los linfocitos T también comprenden linfocitos T $\alpha\beta$ y/o linfocitos T citolíticos naturales (NK). Dicha modificación se sustenta en el párrafo [000119] de la descripción.
- 2.15 Se modificó la antigua reivindicación 33 (nueva reivindicación 18) con el fin de reemplazar la referencia a los dímeros Z1Z2 y Y1Y2 por el polipéptido CD8 α , el polipéptido CD8 β , el polipéptido TCR α y el polipéptido TCR β . Dicha modificación se sustenta en los párrafos [000138] y [000144] de la descripción.
- 2.16 Se modificó la antigua reivindicación 35 (nueva reivindicación 20) con el fin de:
- 2.16.1 Eliminar la expresión "*un método para tratar a un paciente que padece cáncer el cual comprende la administración al paciente*".
 - 2.16.2 reemplazar el término "*destruyen*" por "*son capaces de destruir*".
- 2.17 Se modificaron las antiguas reivindicaciones 36 y 37 (nuevas reivindicaciones 21 y 22) con el fin de reclamar una composición en lugar de un método. Dicha modificación se realiza de conformidad con la modificación realizada en la nueva reivindicación 20 de la cual dependen.

2.18 Se modificó la antigua reivindicación 42 (nueva reivindicación 23) con el fin de:

2.18.1 Aclarar que el método para preparar linfocitos T es un método *in vitro*. Dicha modificación se sustenta en el párrafo [000125] de la descripción.

2.18.2 Eliminar la característica de que la activación de los linfocitos T se realiza en presencia de una estatina. Dicha característica se trasladó en la nueva reivindicación dependiente 25.

Asimismo, el solicitante quisiera respetuosamente resaltar que las reivindicaciones presentadas junto al presente memorial son muy cercanas a las de la patente estadounidense correspondiente (US 11,975,025), que fue concedida por parte de la Oficina Estadounidense de Marcas y Patentes (USPTO) el 17 de abril de 2024.

Estas modificaciones no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, ya que se encuentran sustentadas tanto en la descripción como en el listado de secuencias, y se realizan con el fin de definir la materia reclamada de forma clara y superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

3. Pago de tasas

Considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones, se adjunta recibo por concepto de pago de tasa de modificación a la solicitud, según lo establecido en la **Resolución 59669 de 2020**.

Ahora, en relación con el número de reivindicaciones, atentamente me permito resaltar que junto a la presente respuesta no se realiza el pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, dado que el nuevo capítulo reivindicatorio cuenta con un menor número de cláusulas que el presentado y estudiado anteriormente por su despacho.

Por otra parte, es deseo del solicitante requerir que, si el examinador considera que aún existen motivos que impidan la concesión de la solicitud, proceda a emitir un nuevo examen de patentabilidad, para lo cual se anexa el respectivo pago de nuevo examen.

4. No es una invención

Objeción del examinador:

El examinador señala que, según el artículo 15(b) de la Decisión 486 de 2000, no se consideran invenciones los seres vivos en su estado natural ni el material biológico existente en la naturaleza, incluso si es aislado.

Con base en esto, el examinador determina que las reivindicaciones 34 y 50 no cumplen con los requisitos de patentabilidad, ya que describen una población de linfocitos T expandidos sin incluir modificaciones bioquímicas o genéticas esenciales que los diferencien de células de origen natural.

Asimismo, el examinador considera que las reivindicaciones 11 a 14, 17, 18, 21, 23, 25 y 26 tampoco son patentables, pues describen un vector con elementos virales comunes sin características estructurales que lo distingan de un vector natural. Para respaldar esta conclusión, el examinador cita una búsqueda en la base de datos del NCBI sobre la proteína SEQ ID NO: 3 donde muestra un alineamiento con 100% de identidad a la proteína de un Teschovirus con número GenBank UZH96100.1 tal como se encuentra en la naturaleza.

Argumentos del solicitante:

En relación con la objeción planteada, el solicitante desea resaltar que el método de producción descrito en la solicitud incluye el paso de transducción de células T con el vector reivindicado. Es evidente para una persona versada en la materia que, tras este proceso, las células T incorporan dicho vector y pueden integrar sus elementos genéticos de manera estable en su cromosoma, tal como se define en la reivindicación 1. En consecuencia, la población celular reivindicada en las nuevas reivindicaciones 20 y 31 (derivadas de las anteriores reivindicaciones 34 y 50, respectivamente) se distingue de los linfocitos T de origen natural, lo cual puede verificarse mediante la secuenciación del material genético presente en dichas células (vector y/o ADN genómico).

Asimismo, se enfatiza que el vector definido en la reivindicación 1, en su forma modificada, se compone de elementos genéticos específicos dispuestos en una orientación determinada (es decir, secuencias de nucleótidos que codifican genes definidos y organizados en una orientación 5' a 3': CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α). Este vector, con dicha disposición genética, no se encuentra en la naturaleza. Es importante

señalar que el examinador no ha objetado la reivindicación 1, lo que implica un reconocimiento implícito de que la estructura del vector no es de origen natural.

Por extensión, un vector que incorpora elementos adicionales, como los definidos en las nuevas reivindicaciones dependientes 9 a 12 (basadas en las antiguas reivindicaciones 17, 18, 25 y 26, respectivamente), tampoco se encuentra en la naturaleza y se distingue estructuralmente de los vectores naturales. Incluso si algunos de sus elementos individuales existieran de manera natural, la organización específica de estos dentro del casete génico, tal como se exige en la reivindicación 1, confiere al vector una estructura única y distinguible de cualquier otro vector natural.

En consecuencia, las nuevas reivindicaciones 9 a 12 deben considerarse una invención y patentables. Adicionalmente, se informa que las reivindicaciones 11 a 14, 21 y 23 han sido eliminadas. En ese sentido amablemente solicita al examinador reconsiderar su opinión y dar por superada la presente objeción.

5. Excepción de Patentabilidad

Objeción del examinador:

El examinador señala que, de acuerdo con el literal d) del artículo 20 de la Decisión 486 de 2000, no son patentables los métodos terapéuticos o quirúrgicos para el tratamiento humano o animal, así como los métodos de diagnóstico aplicados a seres humanos o animales.

En este sentido, el examinador establece que las reivindicaciones 35 a 37 no son patentables, ya que describen un método de tratamiento para pacientes con cáncer mediante la administración de una composición que contiene linfocitos T expandidos, lo que constituye un procedimiento terapéutico excluido de patentabilidad.

Asimismo, el examinador considera que las reivindicaciones 38 a 41 y 51 tampoco son patentables, dado que describen un método para inducir una respuesta inmunitaria en pacientes con cáncer mediante la administración de una composición con linfocitos T expandidos, lo que corresponde a un método profiláctico igualmente exceptuado de patentabilidad.

Finalmente, el examinador afirma que las reivindicaciones 42 a 49 no cumplen con los requisitos de patentabilidad, ya que describen un método de preparación de linfocitos T para inmunoterapia sin especificar que los procesos de activación y transducción

celular se realicen fuera del organismo. En consecuencia, estos métodos pueden contemplar procesos *in vivo* en humanos y, por lo tanto, se consideran excluidos de patentabilidad.

Argumentos del solicitante:

En relación con las objeciones planteadas, sin estar de acuerdo con ellas, pero con el fin de dar continuidad al proceso, el solicitante ha decidido modificar las reivindicaciones 35 a 37. En particular, la reivindicación 35 ha sido modificada para eliminar cualquier referencia a un método y enfocarse exclusivamente en una composición que comprende una población de linfocitos T expandidos, lo que la hace patentable. En consecuencia, las reivindicaciones dependientes 36 y 37 también deberían considerarse patentables por las mismas razones.

Por otro lado, las reivindicaciones 38 a 41 y 51 han sido eliminadas, por lo que se considera superada la objeción correspondiente.

Respecto a las reivindicaciones 42 a 49, el solicitante informa que las reivindicaciones 45 y 46 han sido eliminadas. Asimismo, la reivindicación 42 ha sido modificada para definir de manera explícita un método *in vitro* para la preparación de linfocitos T, excluyendo cualquier referencia a su aplicación en un sujeto o a su relación con materia no patentable o tratamientos específicos. Además, dicha posibilidad de llevar a cabo el método de manera *in vitro* se contempla en la evidencia suministrada en la descripción principalmente en el párrafo [000125]. En este sentido, las reivindicaciones dependientes 43, 44 y 47 a 49 también deberían considerarse patentables por las mismas razones.

Por lo tanto, se solicita amablemente al examinador considerar superada la objeción planteada.

6. Reivindicaciones relativas a un uso

Objeción del examinador:

El examinador señala que, conforme al artículo 14 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, solo son patentables las invenciones de producto o de procedimiento.

En este sentido, indica que la reivindicación 11 no es patentable, ya que, aunque en su preámbulo se refiere a un vector, no define ninguna característica técnica esencial estructural basada en una secuencia biológica. En su lugar, menciona que el vector es un "*sistema de inserción génica destinado al uso en terapias celulares adoptivas*", lo que hace referencia a su uso y no a su estructura, por lo que no cumple con los requisitos de patentabilidad.

Respuesta del solicitante:

Sin estar de acuerdo, pero con el único fin de dar continuidad al proceso, el solicitante amablemente ha decidido eliminar la reivindicación 11 del nuevo capítulo reivindicatorio. En ese sentido es posible considerar superada la presente objeción.

7. Claridad y concisión de las reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones presentadas por el examinador en su concepto técnico, de modo tal que las nuevas reivindicaciones reclaman de manera clara y concisa la invención descrita. Con respecto a las objeciones específicas del examinador, me permito manifestar lo siguiente:

7.1 El examinador señala que el capítulo reivindicatorio presenta errores de numeración, ya que no incluye la reivindicación 4, por lo que solicita realizar las correcciones necesarias.

En este sentido, el solicitante modificó la numeración de la reivindicación a la que se refiere el examinador de manera que corresponde a la nueva reivindicación 2. En ese sentido es posible considerar superada la presente objeción.

7.2 Asimismo, el examinador indica que la reivindicación 1 no es clara ni está sustentada en la descripción, pues menciona un vector que comprende las secuencias nucleotídicas S1, S2, S3 y S4 sin definir características estructurales esenciales. Además, la disposición de estas secuencias contempla múltiples configuraciones que no han sido exploradas en la solicitud y podrían no ser funcionales. Se sugiere restringir la reivindicación a una generalización razonable de las estructuras exploradas, incluyendo las secuencias completas de nucleótidos y las orientaciones en tándem divulgadas en la descripción.

En este sentido, el solicitante desea resaltar que la descripción indica lo siguiente:

"En un aspecto, la divulgación proporciona una construcción 4 en 1 con una orientación en dirección de 5' a 3' de CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α (...) Para determinar qué orientación del transgén ofrece una mejor expresión y funcionalidad, se evaluaron tres vectores virales 4 en 1 con secuencias que codifican las cadenas TCR $\alpha\beta$ ubicadas aguas arriba de las secuencias que codifican las cadenas CD8 $\alpha\beta$, así como un vector viral 4 en 1 con la orientación inversa, es decir, con las secuencias de CD8 $\alpha\beta$ ubicadas aguas arriba de las secuencias de TCR $\alpha\beta$..." ([00109] y [00213]; énfasis añadido).

Por lo tanto, el solicitante afirma que una persona versada en la materia, con base en la enseñanza de la presente invención, comprendería que la orientación de las secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas TCR $\alpha\beta$ y CD8 $\alpha\beta$, y no las secuencias de nucleótidos específicas, en un vector, influye directamente en la expresión y funcionalidad del transgén. (Véase también la sección de novedad y nivel inventivo).

Asimismo, el solicitante desea resaltar que, si bien reconoce la autonomía del examinador colombiano, el efecto técnico asociado a la orientación está claramente sustentado y respaldado por las reivindicaciones de la patente estadounidense concedida (U.S. 11,975,025). Dichas reivindicaciones ilustran y refuerzan lo aquí expuesto sin afectar la normativa ni la independencia del presente examen en Colombia.

La reivindicación 1, en su forma modificada, define la orientación de los genes codificantes necesarios para lograr la expresión y funcionalidad mejoradas mencionadas anteriormente. Cualquier restricción adicional, como limitar la materia reivindicada a secuencias de nucleótidos específicas de la construcción ejemplificada, resultaría en una limitación indebida y privaría al solicitante de una recompensa justa por la divulgación de su invención. Por lo tanto, es posible afirmar que la reivindicación 1 es clara y se encuentra plenamente sustentado en la descripción.

Finalmente, el solicitante considera innecesario incluir explícitamente ejemplos de cada posible secuencia en la orientación específica reclamada en la reivindicación 1 para el vector, ya que el soporte proporcionado es suficiente. Esta interpretación se encuentra alineada con las normas establecidas en la Guía de Examen de Patentabilidad (2023), página 124:

"la presentación de ejemplos relativos a todas las especies particulares de la invención o a cada alternativa reivindicada no será condición necesaria para la suficiencia, siempre y cuando dichas especies se mencionen en la descripción."

En este sentido, amablemente se solicita considerar superada la presente objeción.

7.3 De igual manera, el examinador observa que las reivindicaciones 1, 2, 3, 7, 10, 16, 19, 20 y 33 contienen términos como "S1", "S2", "S3", "S4", "S6", "S7", "Z1", "Z2", "Y1" e "Y2", los cuales se consideran denominaciones arbitrarias. Recuerda que las reivindicaciones deben ser autosuficientes, por lo que solicita sustituir estos términos por los nombres y secuencias que los definan.

En este sentido, el solicitante desea resaltar que, con el fin de dar continuidad al proceso, se han reemplazado los términos señalados por el examinador. Como resultado, la reivindicación 1 ahora define un vector que comprende una secuencia de nucleótidos CD8 α que codifica un polipéptido CD8 α , una secuencia de nucleótidos CD8 β que codifica un polipéptido CD8 β , una secuencia de nucleótidos del receptor de células T (TCR) α que codifica un polipéptido TCR α y una secuencia de nucleótidos TCR β que codifica un polipéptido TCR β , donde las secuencias de nucleótidos están dispuestas en una orientación de 5' a 3' en el orden CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α .

Asimismo, la antigua reivindicación 7 (ahora reivindicación 4) se ha modificado para especificar que el vector comprende, además, una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido 2A y una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido enlazador. Estas secuencias de nucleótidos están posicionadas entre las secuencias CD8 α y CD8 β , CD8 α y TCR β , y/o TCR α y TCR β .

Por su parte, la antigua reivindicación 10 (ahora reivindicación 7) establece que el vector comprende, además, una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido sitio de corte de furina (SEQ ID NO: 2), donde dicha secuencia está posicionada entre las secuencias de nucleótidos CD8 α y CD8 β , CD8 α y TCR β , y/o TCR α y TCR β .

Finalmente, el solicitante ha modificado la antigua reivindicación 33 (ahora reivindicación 18) para especificar que los polipéptidos CD8 α , CD8 β , TCR α y TCR β se coexpresan en la superficie de las células T expandidas.

Por lo tanto, el solicitante argumenta que las reivindicaciones 1, 4, 7 y 18 son claras y están debidamente sustentadas, tal como se detalla en la sección 2 de modificaciones

del capítulo reivindicatorio de este memorial. Adicionalmente, el solicitante destaca que las antiguas reivindicaciones 2, 3, 15, 16, 19 y 20 han sido eliminadas. En consecuencia, se solicita amablemente dar por superada la objeción.

7.4 En cuanto a las reivindicaciones 2 y 3, señala que presentan los mismos problemas de falta de claridad y sustento que la reivindicación 1, por lo que recomienda restringirlas incluyendo las secuencias completas de nucleótidos o las de los vectores virales divulgados.

Sin estar de acuerdo, pero con el único fin de dar continuidad al proceso el solicitante amablemente ha decidido eliminar las reivindicaciones 2 y 3 del nuevo capítulo reivindicatorio. En ese sentido es posible considerar superada la presente objeción.

7.5 El examinador también considera que las reivindicaciones 4 a 6 no son claras ni están sustentadas, ya que hacen referencia a secuencias con al menos un 90% de identidad respecto a una secuencia de referencia, sin delimitar adecuadamente la estructura. Por ende, indica que la solicitud no ha explorado todas las secuencias posibles dentro de ese porcentaje, algunas de las cuales podrían ser no funcionales. De ahí que el examinador sugiere eliminar los términos no limitativos y los porcentajes de identidad, reemplazándolos por las secuencias de nucleótidos de las variantes exploradas.

Sin estar de acuerdo con la objeción planteada, pero con el fin de dar continuidad al proceso, el solicitante ha decidido eliminar los porcentajes de identidad de las antiguas reivindicaciones 4 y 6 (ahora reivindicaciones 2 y 3). Asimismo, se ha eliminado la antigua reivindicación 5, por lo que se considera superada dicha objeción.

Además, el solicitante desea resaltar que la redacción de las nuevas reivindicaciones es clara. En particular, la reivindicación 4 establece que el polipéptido CD8 α comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del polipéptido CD8 α tal como se incluye en el SEQ ID NO: 11, y el polipéptido CD8 β comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del polipéptido CD8 β tal como se incluye en el SEQ ID NO: 12.

Por su parte, la reivindicación 6 establece que el polipéptido TCR α y el polipéptido TCR β comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos del polipéptido TCR α y el polipéptido TCR β , respectivamente, tal como están comprendidos en SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, respectivamente. En virtud de lo anterior, se solicita amablemente dar por superada la presente objeción.

7.6 Respecto a las reivindicaciones 7, 10 y 16, el examinador señala que presentan problemas similares a la reivindicación 1, ya que incluyen secuencias nucleotídicas S5, S6 y/o S7 sin características estructurales definidas y contemplan múltiples rearrreglos no explorados. Se recomienda restringirlas a una generalización razonable incluyendo las secuencias completas de nucleótidos y las orientaciones en tándem divulgadas.

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la objeción. Sin embargo, con el fin de dar continuidad al proceso, se reitera que la antigua reivindicación 7 (ahora reivindicación 4) ha sido modificada para especificar que el vector comprende, además, una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido 2A y una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido enlazador. Estas secuencias de nucleótidos están posicionadas entre las secuencias CD8 α y CD8 β , CD8 α y TCR β , y/o TCR α y TCR β .

Asimismo, la antigua reivindicación 10 (ahora reivindicación 7) establece que el vector comprende, además, una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido sitio de escisión de furina (SEQ ID NO: 2), la cual está posicionada entre las secuencias de nucleótidos CD8 α y CD8 β , CD8 α y TCR β , y/o TCR α y TCR β .

Cabe resaltar que estas reivindicaciones hacen referencia a secuencias y estructuras conocidas en el estado de la técnica y que han sido debidamente descritas en la presente solicitud, tanto en la descripción como en el listado de secuencias.

Finalmente, con respecto a la antigua reivindicación 16, se informa que esta ha sido eliminada del nuevo capítulo reivindicatorio. En este sentido, se considera que la presente objeción ha sido debidamente superada.

7.7 En cuanto a las reivindicaciones 15, 16, 19 y 20, indica que no son claras porque definen un vector con secuencias nucleotídicas que codifican dos dímeros sin especificar su estructura. Señala que la solicitud no explora cualquier combinación posible y recomienda definir los vectores mediante sus secuencias completas de nucleótidos.

Sin estar de acuerdo, pero con el único fin de dar continuidad al proceso el solicitante amablemente ha decidido eliminar las antiguas reivindicaciones 15, 16, 19 y 20 del nuevo capítulo reivindicatorio. En ese sentido es posible considerar superada la presente objeción.

7.8 El examinador también objeta la reivindicación 27, ya que menciona un método para preparar linfocitos T “destinados a inmunoterapia”, lo cual es relativo al uso. Además, las etapas técnicas no detallan todas las condiciones y elementos necesarios. Se sugiere eliminar las referencias a materia no patentable y definir los métodos de manera adecuada según lo divulgado en la descripción.

En relación con la objeción planteada el solicitante desea resaltar que se ha eliminado la expresión “*destinado a inmunoterapia*” de la antigua reivindicación 27 (nueva reivindicación 12). Además, se ha modificado dicha reivindicación para hacer referencia a un método *in vitro* de conformidad con el párrafo [000125] en ese sentido se excluye cualquier referencia a materia no patentable.

Respecto a la falta de claridad y soporte de la nueva reivindicación 12, el solicitante desea resaltar que la presente solicitud describe de manera clara y detallada un método para la preparación de células T, incluyendo la activación de células T aisladas en presencia de un aminobisfosfonato, en particular ácido zoledrónico, o en presencia de un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28 ([0030], [0032] y [0048]). En este sentido, la redacción de la reivindicación 27 se encuentra respaldada en la descripción, ya que esta enseña expresamente que la activación de las células T puede llevarse a cabo utilizando estos compuestos. Adicionalmente, la modificación realizada en la reivindicación encuentra soporte en los párrafos [0048], [0053], [00192] y [00207], así como en la Figura 4 de la solicitud.

Asimismo, la solicitud enseña que los métodos para la preparación de células T $\alpha\beta$ modificadas genéticamente que expresan proteínas recombinantes son ampliamente conocidos en el estado de la técnica, como se menciona en el documento US 2019/0247433 (“la solicitud ‘433”) ([00227]). En particular, la solicitud ‘433 describe métodos de transducción de células T que incluyen la activación de células T en un cultivo de PBMC con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, seguida de la transducción de las células activadas con un vector viral ([0140]). Adicionalmente, el proceso de manufactura de células T ha sido descrito previamente en la literatura científica. Por ejemplo, Levine et al. (“Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy.” *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016 Dec 31;4:92-101) enseña procesos de activación, transducción y expansión de células T en la página 92, columna derecha; página 93, columna derecha; página 95, columna derecha; Figura 2 (encuentre dicho documento en el Anexo 1 de este memorial).

Por ende, una persona versada en la materia, teniendo en cuenta la enseñanza de la presente invención y el conocimiento general en el estado de la técnica, comprendería claramente cómo llevar a cabo los pasos de activación, transducción y expansión de células T tal como se recita en la reivindicación 12.

Por lo tanto, el solicitante argumenta que la reivindicación 12 es clara y está debidamente respaldada en la descripción. En este sentido, se solicita amablemente que la objeción sea reconsiderada y dada por superada.

7.9 En relación con la reivindicación 29, señala que menciona cinco opciones de ácidos o sus sales e hidratos en el paso de activación, pero la solicitud no presenta evidencia técnica de que el método sea funcional con todos ellos. Se recomienda restringir la reivindicación a los compuestos que cuenten con soporte en la descripción.

En este sentido, el solicitante desea resaltar que la antigua reivindicación 29 (ahora reivindicación 14) establece que el aminobisfosfonato comprende además ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, una sal de cualquiera de los anteriores y/o un hidrato de los mismos.

Con respecto al soporte en la descripción, el uso de estos aminobisfosfonatos en la preparación de células T es un conocimiento bien establecido en la técnica. Por ejemplo, el documento WO2016166544 enseña que "durante la etapa de cultivo, la adición de al menos uno o una combinación de componentes específicos, como el aminobisfosfonato, en particular el ácido pamidrónico, el ácido alendrónico, el ácido zoledrónico, el ácido risedrónico, el ácido ibandrónico, el ácido incadrónico, una sal de los mismos y/o un hidrato de los mismos, permite la expansión de células T en cultivo" (página 23, líneas 8-12) y que en la descripción se contempla en el método divulgado en los párrafos [00030] a [00032].

Por lo tanto, el solicitante argumenta que la reivindicación 14 cuenta con el debido respaldo en la descripción y en el estado de la técnica. En consecuencia, se solicita amablemente que la objeción sea reconsiderada y dada por superada.

7.10 Finalmente, el examinador observa que la reivindicación 33 no es clara, ya que menciona la expresión de dos dímeros sin definir sus secuencias de aminoácidos. Se sugiere caracterizar adecuadamente las moléculas mencionadas.

Sin estar de acuerdo, pero con el fin de dar continuidad al proceso, el solicitante ha decidido eliminar la expresión que hace referencia a los dímeros. No obstante, ha modificado la antigua reivindicación 33 (ahora reivindicación 18) para aclarar que los polipéptidos CD8 α , CD8 β , TCR α y TCR β se coexpresan en la superficie de las células T expandidas.

Esta característica se encuentra sustentada en los párrafos [00036] y [000200], donde se explica en mayor detalle que la referencia a los dímeros corresponde a las cuatro formas del polipéptido mencionadas. En este sentido, la característica expresada es comprensible para una persona versada en la materia a partir de los polipéptidos descritos. Por lo tanto, se solicita amablemente considerar superada la presente objeción.

En vista de lo anterior, las objeciones relacionadas con la claridad, la concisión y el soporte en la descripción del capítulo reivindicatorio, han quedado completamente superadas.

8. Descripción

El examinador indica que la descripción no divulga la materia reclamada de manera suficiente para que una persona normalmente versada en la materia pueda ejecutarla o reproducirla, por lo que no cumpliría con las disposiciones del Art. 28 de la Decisión Andina 486.

Objeción del examinador

El examinador señala que la solicitud abarca cualquier secuencia de nucleótidos de un vector viral que codifique un polipéptido CD8 α , un polipéptido CD8 β , un polipéptido de receptor de linfocito T (TCR) α y un polipéptido de TCR β , así como un método para preparar linfocitos T que incluye su aislamiento, activación con aminobisfosfonato, transducción con el vector y expansión.

Sin embargo, indica que solo se presenta evidencia técnica concreta para cuatro vectores 4-en-1—PTE WPRE (SEQ ID N.º 91), TPE WPRE (SEQ ID N.º 92), PTE fn WPRE

(SEQ ID N.º 93) y PTE CD8 TCR WPRE (SEQ ID N.º 94)—que permiten la coexpresión de TCRαβ (R11KEA) y CD8αβ, y dos vectores 2-en-1—R11KE WPRE (SEQ ID N.º 95), que posibilita la expresión de TCRαβ (R11KEA) y CD8, y WPRE (SEQ ID N.º 96), que posibilita la expresión de CD8αβ.

Por lo anterior, se recomienda restringir la solicitud a las secuencias respaldadas por evidencia en la descripción.

Argumentos del solicitante

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador, ya que una persona versada en la materia, con base en la enseñanza de la presente invención, comprendería que la orientación de las secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas TCRαβ y CD8αβ en un vector, y no las secuencias específicas de nucleótidos, es el factor determinante para lograr una mejor expresión y funcionalidad del transgén. Esta afirmación se sustenta en las reivindicaciones concedidas en la patente estadounidense US 11.975.025.

Asimismo, el efecto técnico inventivo de la presente invención se basa en la orientación específica de las secuencias en el vector, por lo que no es necesario demostrar experimentalmente cada una de las posibles secuencias que podrían disponerse bajo dicha orientación. Exigir evidencia para múltiples variantes de secuencias en una misma orientación es una carga desproporcionada y no se ajusta a los principios de suficiencia de la descripción. Como lo establece el *Manual Andino de Patentes* (2022, p. 22), basta con incluir ejemplos o pruebas puntuales que demuestren el efecto técnico, sin que sea necesario proporcionar datos para todas las alternativas posibles dentro de la materia reivindicada:

"La invención puede considerarse suficientemente descrita si se aporta uno o más ejemplos, modos de realización alternativos o variaciones que habilitan a la persona versada en la materia técnica para que, aplicando sus conocimientos técnicos generales, pueda poner en práctica la invención en toda el área reivindicada y no solo algunas modalidades particulares reivindicadas, sin que para ello requiera desplegar un esfuerzo inventivo. Sin embargo, la presentación de ejemplos relativos a todas las especies particulares de la invención o a cada alternativa reivindicada no será necesaria para encontrar una suficiencia de la descripción, siempre y cuando dichas especies se mencionen en esta."

Además, con las modificaciones realizadas, no solo se ha restringido la materia reclamada, sino que se ha brindado mayor claridad en la forma en que se reivindica la invención, siguiendo las sugerencias del examinador. Por lo tanto, se ha definido la materia de manera precisa y comprensible dentro de el alcance dado por la evidencia que suministra descripción, lo que debería considerarse como una generalización razonable.

De esta manera, la materia divulgada en la descripción ahora se relaciona de una manera más cercana con la materia definida en el capítulo reivindicatorio. Por lo tanto, la descripción proporciona toda la información necesaria para llevar a cabo la invención y cumple con los requisitos legales establecidos en la Decisión Andina 486.

9. Unidad de Invención

Objeción del examinador:

El examinador manifiesta que la solicitud no cumpliría con el requisito de unidad de invención, pues el elemento común a las distintas invenciones reclamadas, un vector que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de CD8 α , una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de CD8 β , una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de receptor de linfocito T (TCR) α , y una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de TCR β , habría sido anticipado por el documento WO2018058002. De este modo, el examinador indica que la presente invención se refiere a 4 grupos inventivos distintos, los cuales corresponden las cuatro estructuras del vector reconocidas por el examinador como compatibles con la descripción.

Argumentos del solicitante:

El solicitante desea resaltar que las reivindicaciones modificadas están relacionadas con el grupo inventivo 4 (*PTE CD8 TCR WPRE*), ya que describen un vector que comprende secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos CD8 α , CD8 β , TCR α y TCR β , dispuestas en una orientación específica de 5' a 3' en el orden CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α . Dado que las modificaciones realizadas se han restringido al grupo inventivo 4, se procederá con el pago del examen correspondiente.

De este modo, los vectores reivindicados comparten un concepto común inventivo que no había sido revelado previamente en los documentos del arte previo, por lo que la

solicitud cumple con los requerimientos establecidos en el Artículo 25 de la Decisión 486. Por lo tanto, respetuosamente solicito que se retire la objeción a este respecto.

10. Novedad

El examinador afirma en su concepto técnico que las antiguas reivindicaciones 1, 4 y 5 no serían nuevas a la luz de las enseñanzas del documento D1 (WO2018058002).

En este sentido, quisiera destacar que el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que la invención se considera nueva cuando no está incluida en el estado de la técnica. Es decir, según el espíritu de la norma legal indicada, la invención no se considera nueva si está "*comprendida*" en el estado de la técnica, dicha norma se refiere, por supuesto, a la invención en su totalidad y no a sus componentes de forma aislada.

A este respecto, considero pertinente subrayar que, para considerar que el objeto de la solicitud no es nuevo, deben tenerse en cuenta al menos los siguientes aspectos:

- El objeto de la invención objeto de estudio debe estar contenido TOTAL y ABSOLUTAMENTE en el documento mencionado anteriormente; y
- La comparación del objeto de la invención en cuestión y el estado de la técnica no debe centrarse ni limitarse a los elementos de esta que se conocen previamente, sino de lo inédito y novedoso que la caracteriza. Esto significa que debe analizarse el valor añadido que aporta la invención con sus nuevas características al campo técnico al que pertenece la solicitud en estudio.

Esto significa que, para que un documento del estado de la técnica afecte a la novedad de una solicitud, debe revelar todas y cada una de las características técnicas que lo definen.

También es de señalar lo que se establece en el Manual Andino para el Examen de Patentes sobre el análisis de novedad.

"Para determinar la novedad de la invención, se debe comprobar si existen anticipaciones del estado de la técnica que contengan explícitamente todas las características técnicas esenciales de la invención. El examen de novedad se efectúa comparando elemento por elemento de la invención tal como está

definido por las reivindicaciones con los del estado de la técnica.” (El énfasis es nuestro)

“Si todas las características técnicas de la reivindicación independiente se encuentran descritas en un mismo antecedente y además se encuentran íntimamente relacionadas, el objeto de dicha reivindicación carece de novedad. Si una característica, aunque sea banal, no se encuentra contenida en el antecedente, la reivindicación es nueva” (El énfasis es nuestro)

“Modificaciones obvias o equivalentes del objeto descrito en el estado de la técnica no pueden ser citadas en contra de la novedad del objeto reivindicado sino cuando están descritas ellas mismas en el antecedente.” (El énfasis es nuestro)

De lo anterior, puede interpretarse sin lugar a dudas que, **si existe al menos una característica diferenciadora** entre el objeto reivindicado y lo **divulgado explícitamente en los antecedentes** tomados en cuenta por sí solos, en este caso D1, **incluso si dicha diferencia no es una característica esencial sino banal**, debe reconocerse la novedad de la invención.

Objeción del examinador:

El examinador concluye que la invención carece de novedad, ya que el documento D1 divulga un vector que contiene una construcción transgénica con polinucleótidos que codifican las cadenas α y β de los co-receptores CD8, así como las cadenas α y β del receptor de linfocitos T (TCR).

Asimismo, el examinador presenta alineamientos que muestran una identidad del 100% entre el SEQ ID NO: 11 de la presente invención y el SEQ ID NO: 70 de D1, correspondiente al polipéptido CD8 α , así como entre el SEQ ID NO: 12 y el SEQ ID NO: 75 de D1, correspondiente al polipéptido CD8 β . Además, las alineaciones 4 y 5 evidencian un 90% de identidad entre las secuencias que caracterizan a los polipéptidos TCR α y β en la solicitud y en el documento D1.

Con base en lo anterior, el examinador sostiene que la invención no cumple con el requisito de novedad.

Argumentos del solicitante:

El solicitante desea resaltar que la descripción de la solicitud enseña la expresión de un vector viral 4-en-1, como un vector lentiviral, que contiene secuencias codificantes para las cadenas CD8 α , CD8 β , TCR α y TCR β , cuya expresión puede ser impulsada por un promotor constitutivo o inducible. En particular, la Figura 5A de la presente invención (mostrada a continuación) ilustra un vector viral 4-en-1 que contiene *PTE CD8 TCR WPRE* (SEQ ID NO: 94), en el cual las secuencias optimizadas por codón de CD8 α y CD8 β están ubicadas aguas arriba de las secuencias codificantes para un receptor de células T (TCR), por ejemplo, las cadenas R11 KE TCR α y R11 KE TCR β . Además, se especifica que la orientación de la construcción 4-en-1 en dirección 5' a 3' es CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α .

PTE.CD8.TCR.WPRE

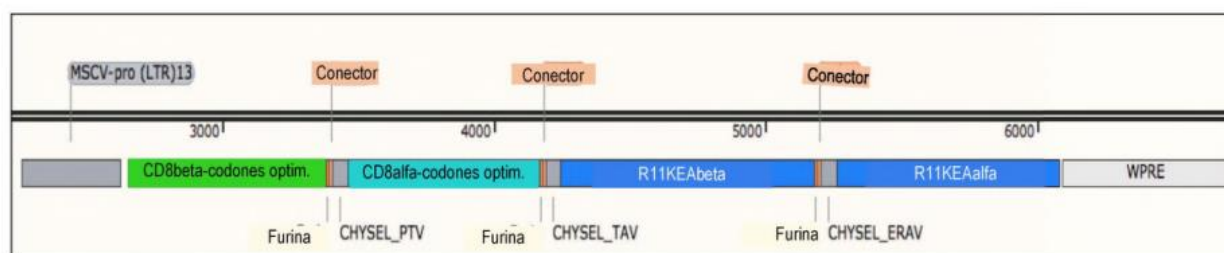


FIG. 5A

Figura 1 Figura 5A de la presente invención.

La reivindicación 1, tal como ha sido modificada, reclama un vector que comprende secuencias de nucleótidos CD8 α , CD8 β , TCR α y TCR β , dispuestas en una orientación específica de 5' a 3' en el orden CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α .

Por su parte, el documento D1 describe una construcción que contiene secuencias de nucleótidos que codifican TCR α , TCR β , CD8 α y CD8 β , organizadas en una orientación 5' a 3' de TCR β -TCR α -CD8 β -CD8 α . Es decir, en D1, las secuencias de CD8 α y CD8 β se encuentran aguas abajo de las secuencias de TCR α y TCR β , mientras que, en la presente invención, las secuencias de CD8 α y CD8 β están ubicadas aguas arriba de TCR α y TCR β . Esto puede evidenciarse en el vector tal como se encuentra en la Figura 30 (figura 2 de este memorial) del documento D1.

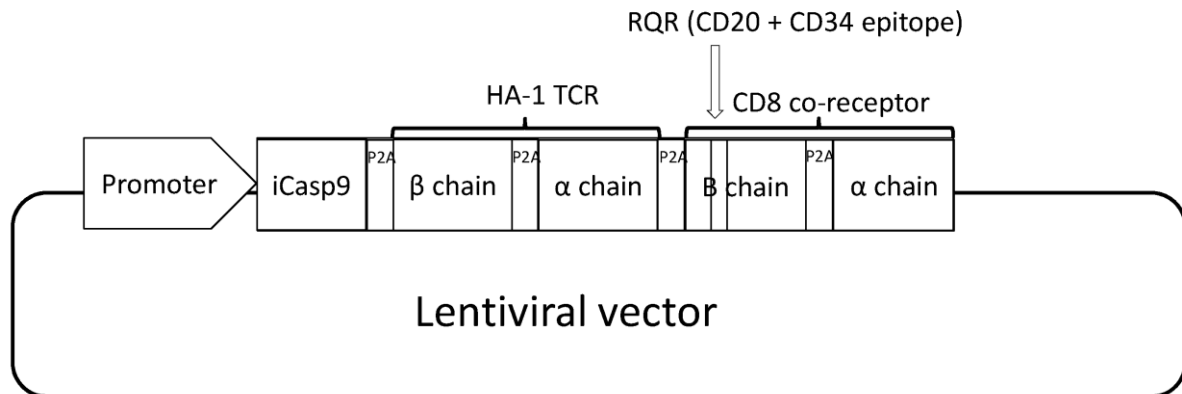


FIG. 30

Figura 2 Figura 30 del documento D1

Dado que la disposición de las secuencias en D1 es diferente de la definida en la reivindicación 1, dicho documento no enseña ni sugiere la característica clave de la invención, es decir, no divulga que las secuencias de nucleótidos están dispuestas en una orientación de 5' a 3' en el orden CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α .

Por lo tanto, la reivindicación 1, tal como ha sido modificada, es novedosa frente a D1. De igual manera, las reivindicaciones dependientes también deben considerarse novedosas por, al menos, las mismas razones expuestas.

Así pues, dado que el documento D1 no divulga de manera TOTAL Y ABSOLUTA las características técnicas esenciales de la materia definida en la reivindicación independiente de la presente solicitud, es posible concluir que la presente solicitud cumple el requisito de novedad estipulado en el artículo 16 de la Decisión 486.

11. Nivel inventivo

El examinador ha indicado que las reivindicaciones 6 a 10, 15, 16, 19, 20, 22 y 27 a 33 carecerían de nivel inventivo en vista de las enseñanzas del documento D1 (WO2018058002) y D2 (WO2019070541).

Con respecto a lo anterior, me permito resaltar las disposiciones del artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, que establecen que “se considerará que la invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio

normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”.

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. Por el contrario, el análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

El análisis del examinador

El examinador considera que el documento D1 representa el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 6, ya que divulga un vector que contiene un constructo transgénico con una secuencia de control operativamente unida a un marco abierto de lectura que codifica las cadenas α y β de los co-receptores CD8 y las cadenas α y β del receptor de linfocitos T (TCR). Además, especifica la disposición 5' a 3' de estos elementos dentro del vector.

En ese sentido, el examinador reconocer que la diferencia entre la invención y el vector divulgado en D1 radica en que la solicitud contempla polipéptidos de TCR $\alpha\beta$ con una identidad de al menos 90% con las SEQ ID NO: 13 y 14. Sin embargo, el examinador señala que no se demuestra un efecto técnico asociado a cualquier vector que codifique polipéptidos con esta identidad, ya que no se suministran las secuencias completas de nucleótidos del vector ni sus regiones estructurales codificantes. Esto impide reproducir la invención y relacionar las pruebas técnicas con todas las posibles alternativas estructurales incluidas en la reivindicación.

De ahí que el problema técnico objetivo que formula el examinador es: ¿Cómo modificar el vector conocido en D1 para obtener un vector alternativo? Sin embargo, el examinador considera que el documento D2 ya enseña secuencias de TCR con identidad del 95.6% con la SEQ ID NO: 13 y del 97.4% con la SEQ ID NO: 14 de la solicitud, lo que sugiere que una persona versada en la materia estaría motivada a incluir estas secuencias en el vector de D1, lo que hace que la reivindicación 6 carezca de actividad inventiva.

Adicionalmente, el examinador resalta que D2 menciona promotores y elementos de diseño para la expresión de TCR que facilitan su inclusión en vectores, lo que refuerza

la conclusión de obviedad. En consecuencia, el examinador considera que las reivindicaciones dependientes 7 a 10, 15, 16, 19, 20, 22 y 27 a 33 tampoco aportan nivel inventivo y, por lo tanto, carecen de actividad inventiva.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el examinador concluye que las características técnicas de la materia definida en el capítulo reivindicatorio presentado junto al presente memorial no se derivan de manera obvia o evidente de las enseñanzas de D1 y D2. Por lo tanto, el objeto reclamado cumple con el requisito de Nivel inventivo establecido en el Art. 18 de la Decisión 486.

Argumentos del solicitante

El solicitante desea enfatizar que, como se mencionó previamente, el documento D1 no enseña ni sugiere la característica clave de la reivindicación 1, a saber, "donde las secuencias de nucleótidos están dispuestas en una orientación de 5' a 3' en el orden CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α ".

Por su parte, el documento D2 describe células CD4+ que expresan CD8 exógeno junto con diversos receptores de células T (TCR). Sin embargo, D2 tampoco enseña ni sugiere la característica faltante en D1, es decir, la orientación específica de las secuencias de nucleótidos establecida en la reivindicación 1.

En este sentido, D1 y D2, ya sea analizados individualmente o en combinación, no enseñan ni sugieren la totalidad de las características de la reivindicación 1. Por lo tanto, dicha reivindicación es patentable sobre D1 en vista de D2. De igual manera, las reivindicaciones dependientes también deben considerarse patentables por, al menos, las mismas razones.

Efecto técnico ventajoso de la presente invención

Ninguna de las referencias previas enseña ni sugiere la orientación específica de las secuencias de nucleótidos establecida en la reivindicación 1. Además, una persona versada en la materia no tendría una motivación evidente para utilizar un vector que contenga TCR $\alpha\beta$ y CD8 $\alpha\beta$ en la orientación específica CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α para lograr características funcionales superiores sin la enseñanza de la presente invención. En otras palabras, no cualquier vector que contenga TCR $\alpha\beta$ y CD8 $\alpha\beta$ produciría los mismos resultados funcionales.

Aun si se argumentara una supuesta obviedad *prima facie*, lo cual no aplica en este caso, la evidencia de resultados inesperados presentada en la descripción supera dicha objeción.

En particular, se ha demostrado que los vectores en los que las secuencias codificantes para CD8αβ están ubicadas corriente arriba de las secuencias codificantes para TCRαβ, como *PTE.CD8.TCR.WPRE*, presenta características funcionales significativamente superiores en comparación con los vectores en los que CD8αβ está ubicado aguas abajo de TCRαβ, como *PTE.WPRE*, *TPE.WPRE* y *PTE.fn.WPRE*. La disposición de estos elementos se puede observar en la Figura 3 de la invención, reproducida a continuación:

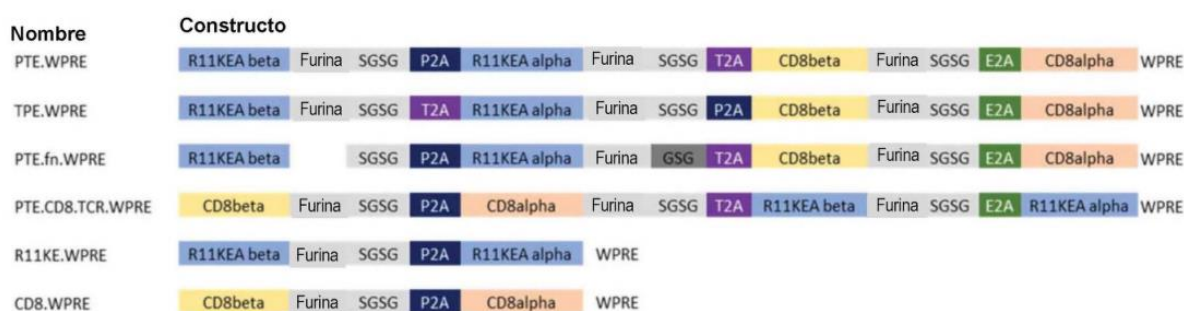


FIG. 3

Figura 3 de la presente invención

Esta superioridad funcional se evidencia mediante:

1. Mayor coexpresión de CD8αβ y TCRαβ, según se muestra en las Figuras 4, 10 y 11.
2. Mayor liberación de IFNγ específica para el péptido, evidenciado en las Figuras 13A-13C y 15A-15C.
3. Mejor actividad de eliminación de células tumorales, como se observa en las Figuras 12 y 14 (mostradas a continuación):

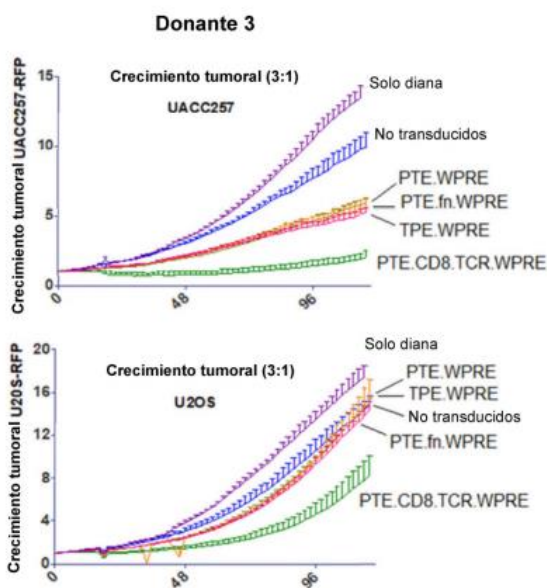


FIG. 12

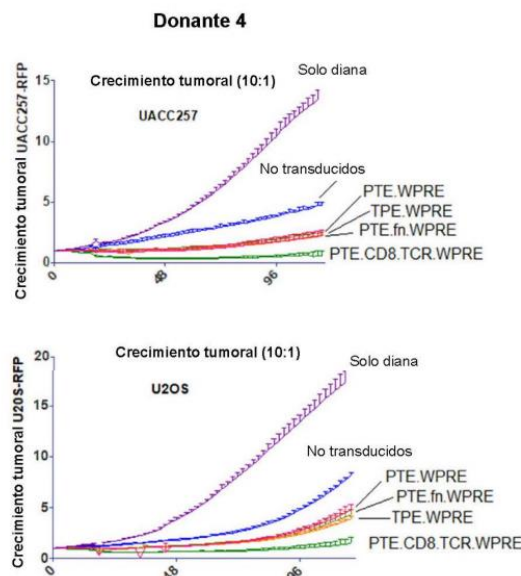


FIG. 14

Figura 4 Resultados de las pruebas de las Figuras 12 y 14 de la presente invención

Estos resultados son inesperados, ya que ni D1 ni D2 enseñan ni sugieren la orientación específica de las secuencias de nucleótidos establecida en la reivindicación 1, y mucho menos las ventajas funcionales que presentan las células T transducidas con los vectores reivindicados.

Por lo tanto, las reivindicaciones son patentables sobre D1 y D2. Adicionalmente, teniendo en cuenta la selección del nuevo grupo inventivo, procederemos con el pago del examen correspondiente.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, queda claro que las características técnicas de la materia definida en el capítulo reivindicatorio presentado junto al presente memorial no se derivan de manera obvia o evidente de las enseñanzas de D1 y D2. Por lo tanto, el objeto reclamado cumple con el requisito de Nivel inventivo establecido en el Art. 18 de la Decisión 486.

12. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) El nuevo título de la solicitud es claro y se relaciona con el objeto reclamado, cumpliendo así con el literal d) del artículo 27 de la Decisión 486 de 2000;
- ii) El nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00;
- iii) La invención de la presente solicitud es clara y cuenta con el debido sustento en el capítulo descriptivo, a la vez que se encuentra divulgada de manera suficientemente completa, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 30 y 28 de la Decisión 486;
- iv) La presente invención se relaciona con materia susceptible de patentabilidad, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 14 de la Decisión 486;
- v) La presente invención se relaciona con un único concepto inventivo, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 25 de la Decisión 486;
- vi) La invención de la presente solicitud no había sido divulgada previamente en el estado de la técnica cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 16 de la Decisión 486.
- vii) La invención de la presente solicitud no resulta obvia ni se derivada de manera evidente del estado de la técnica, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 18 de la Decisión 486.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486 de 2000.

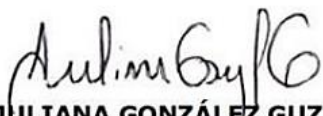
Asimismo, respetuosamente solicito a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

13. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por treinta (30) reivindicaciones.

- Anexo 1: Levine, B. L., Miskin, J., Wonnacott, K., & Keir, C. (2016). Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 4, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.006>
- Recibo de pago por concepto de modificaciones a las reivindicaciones y nuevo examen de patentabilidad.

Señora Directora,



JULIANA GONZÁLEZ GUZMÁN

C.C. 39.808.557 de Tabio, Cund.

T.P.A. 174.941

notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES

1. Un vector que comprende una secuencia nucleotídica CD8 α que codifica un polipéptido de CD8 α , una secuencia nucleotídica CD8 β que codifica un polipéptido de CD8 β , una secuencia nucleotídica de receptor de linfocito T (TCR) α que codifica un polipéptido de TCR α , y una secuencia nucleotídica TCR β que codifica un polipéptido de TCR β , en el cual las secuencias nucleotídicas están dispuestas en una orientación 5' a 3' de CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α .
2. El vector de la reivindicación 1, en el cual el polipéptido de CD8 α comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del polipéptido CD8 α como se comprende en la SEQ ID NO 11 y el polipéptido de CD8 β comprende o consiste la secuencia de aminoácidos del polipéptido CD8 β como se comprende en la SEQ ID NO 12.
3. El vector las reivindicaciones 1 o 2, en el cual el polipéptido de TCR α y el polipéptido de TCR β comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos del polipéptido TCR α y del polipéptido TCR β , respectivamente, tal como se comprenden en la SEQ ID NO 13 y la SEQ ID NO 14, respectivamente.
4. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que además comprende una secuencia nucleotídica, que codifica un péptido 2A, y una secuencia nucleotídica, que codifica un péptido conector, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica dicho péptido 2A y péptido conector están ubicadas entre las secuencias de nucleótidos CD8 α y CD8 β , CD8 α y TCR β , y/o TCR α y TCR β .
5. El vector de la reivindicación 4, en el cual el péptido 2A se selecciona entre P2A (SEQ ID NO 3), T2A (SEQ ID NO 4), E2A (SEQ ID NO 5) y F2A (SEQ ID NO 6).
6. El vector de la reivindicación 5, en el cual el péptido conector es GSG o SGSG (SEQ ID NO 8).
7. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que además comprende una secuencia nucleotídica, que codifica un péptido del sitio de escisión para la furina (SEQ ID NO 2), en el cual la secuencia de nucleótidos que codifica dicho péptido del sitio de escisión de furina está ubicada entre las secuencias de nucleótidos CD8 α y CD8 β , CD8 α y TCR β , y/o TCR α y TCR β .

8. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que además comprende una secuencia de un elemento regulador postranscripcional (PRE) seleccionado entre un PRE del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) y un PRE del virus de la hepatitis B/VHB (HPRE).
9. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que además comprende una secuencia promotora que controla la transcripción de las secuencias de nucleótidos definidas en las reivindicaciones 1 a 8, en que la secuencia promotora es seleccionada entre un promotor de citomegalovirus (CMV), promotor de la fosfoglicerato-cinasa (PGK), promotor de la proteína básica de la mielina (MBP), promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo portador de LTR MoMuLV modificado (MNDU3), promotor de la ubiquitina C, promotor de EF-1 α y promotor del virus de las células madre murinas (MSCV).
10. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho vector es un vector vírico seleccionado entre adenovirus, poxvirus, alfavirus, arenavirus, flavivirus, rhabdovirus, retrovirus, lentivirus, herpesvirus, paramixovirus y picornavirus.
11. El vector de la reivindicación 10, el cual es un vector pseudotipado con una proteína de la envoltura de un virus seleccionado entre el virus endógeno felino nativo (RD114), una versión quimérica de la RD114 (RD114TR), virus de la leucemia del gibón (GaLV), una versión quimérica de la GaLV (GaLV-TR), virus anfotrópico de la leucemia murina (MLV 4070A), baculovirus (GP64), virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), virus de la gripe aviar (FPV), virus del ébola (EboV), y virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) o glucoproteína de la envoltura del retrovirus del papión (BaEV).
12. Un método *in vitro* para preparar linfocitos T, en donde dicho método comprende:
activar linfocitos T aislados en presencia de un aminobisfosfonato, en donde
dicho aminobisfosfonato comprende ácido zoledrónico o en presencia de
un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28,
transducir de los linfocitos T activados con el vector de cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 11, y
expandir de los linfocitos T transducidos.

13. El método de la reivindicación 12, en el que los linfocitos T se aíslan de una muestra de leucocitaféresis humana.

14. El método de la reivindicación 12 o 13, en el que el aminobisfosfonato además comprende ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, una sal de cualquiera de los anteriores y/o un hidrato de los mismos.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el cual la activación se lleva a cabo, además, en presencia de interleucina 2 (IL-2) recombinante humana y/o de interleucina 15 (IL-15) recombinante humana.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que la expansión se produce en presencia de IL-2 y/o IL-15.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que los linfocitos T comprenden linfocitos T $\alpha\beta$, linfocitos T $\gamma\delta$, y/o linfocitos T citolíticos naturales (NK).

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en el que el polipéptido CD8 α , el polipéptido CD8 β , el polipéptido TCR α y el polipéptido TCR β se coexpresan en la superficie de las células T expandidas.

19. Una población de linfocitos T expandidos preparada con el método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18.

20. Una composición que comprende la población de linfocitos T expandidos de la reivindicación 19,

en la cual los linfocitos T son capaces de destruir las células cancerosas en cuya superficie se presenta un péptido formando un complejo con una molécula del MHC, péptido que es seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NOs: 98 a 255,

en donde el cáncer es seleccionado entre el grupo consistente en cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de células de Merkel, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, cáncer colorrectal, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer de riñón,

leucemia, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer gástrico y cáncer de próstata.

21. La composición de la reivindicación 20, en la cual la composición comprende además un adyuvante.

22. La composición de la reivindicación 21, en la cual el adyuvante es seleccionado entre un anticuerpo anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, atezolizumab, interferón- α , interferón- β , oligonucleótidos CpG y derivados, poli(I:C) y derivados, ARN, sildenafil, formulaciones particuladas con poli(láctido co-glicólido) (PLG), virosomas, interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21 o IL-23.

23. Un método *in vitro* para preparar linfocitos T, el cual comprende:
activar los linfocitos T,
transducir los linfocitos T activados con el vector de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11,
en el cual el vector es pseudotipado con una proteína de la envoltura del VSV-G, y
expandir los linfocitos T transducidos.

24. El método de la reivindicación 23, en el que los linfocitos T comprenden linfocitos T $\alpha\beta$, linfocitos T $\gamma\delta$ y/o linfocitos T citolíticos naturales (NKT).

25. El método de la reivindicación 23 o 24, en el que la activación se realiza en presencia de una estatina.

26. El método de la reivindicación 25, en el cual la estatina es seleccionada entre atorvastatina, cerivastatina, dalvastatina, fluindostatina, fluvastatina, mevastatina, pravastatina, simvastatina, velostatina o rosuvastatina.

27. El método de la reivindicación 23 o 24, en el que los linfocitos T comprenden linfocitos T $\alpha\beta$.

28. El método de la reivindicación 27, en el que la activación se produce en presencia de un anticuerpo anti-CD3 y de un anticuerpo anti-CD28.

2021/38182

Reivindicaciones modificadas en respuesta oficio 20216

Marzo 31, 2025

29. El método de las reivindicaciones 27 o 28, en el que la expansión se produce en presencia de IL-7 e IL-15.

30. Una población de linfocitos T expandidos preparada con el método de cualquiera de las reivindicaciones 23 a 29.

Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy

Bruce L. Levine,¹ James Miskin,² Keith Wonnacott,³ and Christopher Keir³

¹Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA; ²Oxford BioMedica, Ltd., Oxford OX4 6LT, UK; ³Cell and Gene Therapies Unit, Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ 07936, USA

Immunotherapy using chimeric antigen receptor-modified T cells has demonstrated high response rates in patients with B cell malignancies, and chimeric antigen receptor T cell therapy is now being investigated in several hematologic and solid tumor types. Chimeric antigen receptor T cells are generated by removing T cells from a patient's blood and engineering the cells to express the chimeric antigen receptor, which reprograms the T cells to target tumor cells. As chimeric antigen receptor T cell therapy moves into later-phase clinical trials and becomes an option for more patients, compliance of the chimeric antigen receptor T cell manufacturing process with global regulatory requirements becomes a topic for extensive discussion. Additionally, the challenges of taking a chimeric antigen receptor T cell manufacturing process from a single institution to a large-scale multi-site manufacturing center must be addressed. We have anticipated such concerns in our experience with the CD19 chimeric antigen receptor T cell therapy CTL019. In this review, we discuss steps involved in the cell processing of the technology, including the use of an optimal vector for consistent cell processing, along with addressing the challenges of expanding chimeric antigen receptor T cell therapy to a global patient population.

Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy is a cellular therapy that redirects a patient's T cells to specifically target and destroy tumor cells. CARs are genetically engineered fusion proteins composed of (1) an antigen recognition domain derived from a monoclonal antibody and (2) intracellular T cell signaling and costimulatory domains.^{1–5} Use of CAR T cells as a treatment for cancer has been most extensively investigated in patients with B cell malignancies, and early results have been encouraging. For example, CAR T cell therapy has demonstrated complete response rates of 69%–90% in pediatric patients with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL) in phase 1 trials.^{6–10} The development of CAR T cell therapy has now expanded beyond phase 1 trials and moved into phase 2 multi-site trials (NCT02435849 and NCT02228096), and a major consideration for academic institutions and industry is how to scale out the production of CAR T cells in an efficient, effective manner. Here we describe the process of manufacturing CAR T cells, and we discuss regulatory concerns that must be addressed to successfully produce CAR T cells for larger numbers of patients.

Production of CAR T Cells

The production of CAR T cells requires several carefully performed steps, and quality control testing is performed throughout the entire

protocol.¹¹ First, the process involves using leukapheresis to remove blood from the patient's body, separate the leukocytes, and return the remainder of the blood to the circulation.¹² After a sufficient number of leukocytes have been harvested, the leukapheresis product is enriched for T cells (Figure 1). This process involves washing the cells out of the leukapheresis buffer, which contains anticoagulants.¹³ Enrichment of lymphocytes can be accomplished subsequently through counterflow centrifugal elutriation, which separates cells by size and density and maintains cell viability.¹⁴ Separation of T cell subsets at the level of CD4/CD8 composition using specific antibody bead conjugates or markers is an additional step that may be performed.¹⁵

Purifying autologous antigen-presenting cells (APCs) from the patient to use for T cell activation would require several additional steps, making it labor intensive and difficult to obtain a potent CAR T cell product.¹¹ For this reason, an approach was developed to activate T cells in a more standardized, efficient manner using, for example, beads coated with anti-CD3/anti-CD28 monoclonal antibodies (Life Technologies). While the use of anti-CD3 antibodies alone or in combination with feeder cells and growth factors, such as IL-2, has been the practice for many years, in comparison to beads coated with anti-CD3/anti-CD28 monoclonal antibodies or cell-based artificial APCs (aAPCs), the activation and ex vivo expansion are suboptimal.^{16,17} The beads, or aAPCs, can be easily removed from the culture through magnetic separation.¹⁸ In the presence of interleukin-2 and aAPCs, T cells can grow logarithmically in a perfusion bioreactor for several weeks.^{11,16,18–20} The use of aAPCs derived from the chronic myelogenous leukemia cell line K562, which can be engineered to express the required costimulatory ligands, also has been investigated as a method of expanding T cells ex vivo.^{17,21} Culture conditions may be further refined to polarize T cells to a specific phenotype (i.e., Th2 or Th17) during expansion. Indeed, CAR T cells that were polarized to a Th17 phenotype demonstrated efficacy in a preclinical model, suggesting that T cell polarization is a strategy that may enter the clinic in the future.²²

During the activation process, the T cells are incubated with the viral vector encoding the CAR, and, after several days, the vector

Received 28 September 2016; accepted 21 December 2016;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.006>

Correspondence: Bruce L. Levine, Center for Advanced Cell Therapies, South Tower, Building 421, 9th Floor, 3400 Civic Center Boulevard, Philadelphia, PA 19104, USA.

E-mail: levinebl@mail.med.upenn.edu

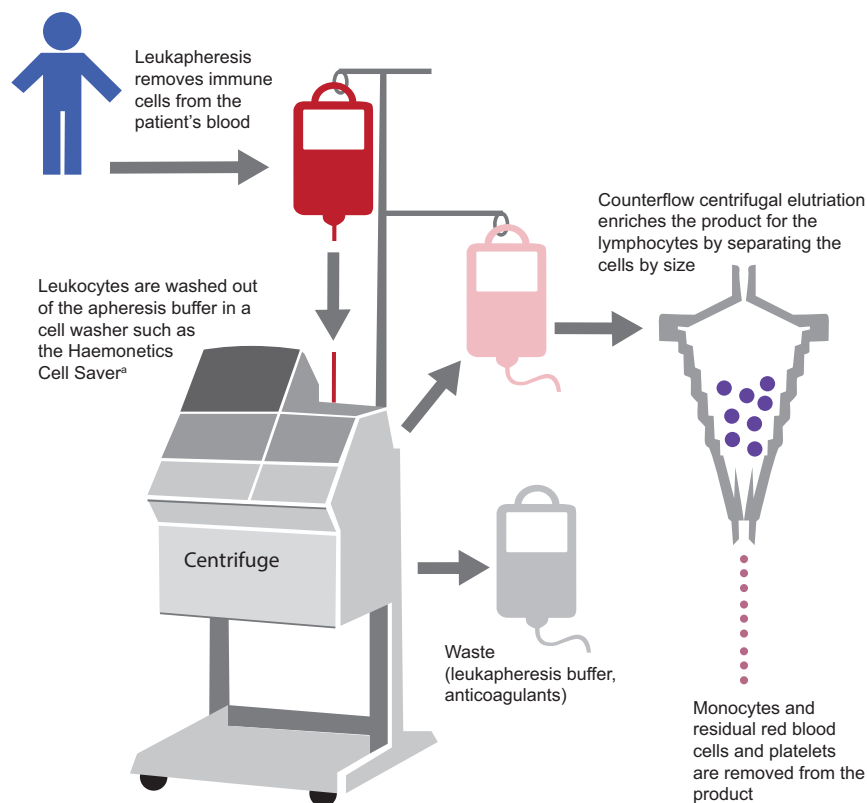


Figure 1. Leukapheresis and T Cell Isolation

After a sufficient number of leukocytes have been harvested from the patient's blood via leukapheresis, the anticoagulants in the leukapheresis buffer are washed out of the product and the cells are concentrated by counterflow centrifugal elutriation, which separates cells by size and density. ^aHaemonetics Corporation.

is washed out of the culture by dilution and/or medium exchange. The viral vector uses viral machinery to attach to the patient cells, and, upon entry into the cells, the vector introduces genetic material in the form of RNA.²³ In the case of CAR T cell therapy, this genetic material encodes the CAR. The RNA is reverse-transcribed into DNA and permanently integrates into the genome of the patient cells; therefore, CAR expression is maintained as the cells divide and are grown to large numbers in the bioreactor. The CAR is then transcribed and translated by the patient cells, and the CAR is expressed on the cell surface. Lentiviral vectors, which have a safer integration site profile than gammaretroviral vectors,^{24,25} are commonly used in clinical trials of CAR T cell therapies, including CTL019. Other methods of gene transfer, including the Sleeping Beauty transposon system or mRNA transfection, have been investigated as alternative approaches to express a CAR in T cells.^{26,27} CAR T cells generated using transient mRNA transfection have been used in the clinic; however, this approach requires several rounds of CAR T cell infusion.²⁸ Furthermore, while the Sleeping Beauty transposon system is considered to be inexpensive and has been tested in early-phase clinical trials, there are still several concerns, including efficiency relative to lentiviral vectors, the unknown potential of insertional mutagenesis, and remobilization of transposons.²⁹

Bioreactor culture systems are designed to provide the optimal gas exchange requirements and culture mixing necessary to grow large

numbers of cells for clinical use (Figure 2). The WAVE Bioreactor (now known as the Xuri; GE Healthcare Life Sciences), which utilizes a rocking platform, has been used to expand the CD19-targeted CAR T cell therapy CTL019.^{11,20,30} Another culture system that can be used is the G-Rex (Wilson Wolf), which has the ability to expand cells from low seeding densities.^{31,32} The G-Rex uses gas-permeable membranes, allowing the flask to be placed directly in a cell culture incubator. One drawback of this system, however, is that the flask must be opened during cell inoculation. The CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec) is a single device that accomplishes cell preparation, enrichment, activation, transduction, expansion, final formulation, and sampling.³³ This contrasts with other methods, which use separate machines for the cell culture, cell washing, and other steps in the preparation. It was shown recently that the CliniMACS Prodigy is feasible for generating CAR T cells, and this device is expected to be used soon to prepare CAR T cells for clinical trials.³⁴

When the cell expansion process is finished, the cell culture, which may reach a volume of up to ≈ 5 L, must be concentrated to a volume that can be infused into the patient.^{11,18} The washed and concentrated cells are cryopreserved in infusible medium, and, following product release, the frozen cells are transported to and thawed at the center where the patient will be treated. While aspects of cell washing, isolation, and culture are semi-automated, improving the throughput of currently manual parts of processing will be critical for developing CAR T cell therapies that can be used for a wider range of indications and larger populations.

Challenges of Bringing CAR T Cell Therapy to a Global Patient Population

Although protocols for manufacturing clinical-grade CAR T cells have now been established, CAR T cell therapies have been used to treat only a few hundred patients to date. When scaling out this complex manufacturing process to treat more patients in larger trials at an increased number of clinical centers, the process should be carefully evaluated to ensure production efficiency without compromising the integrity and potency of the final product. Because CAR T cells can be used to target several types of cancer, the scale of production

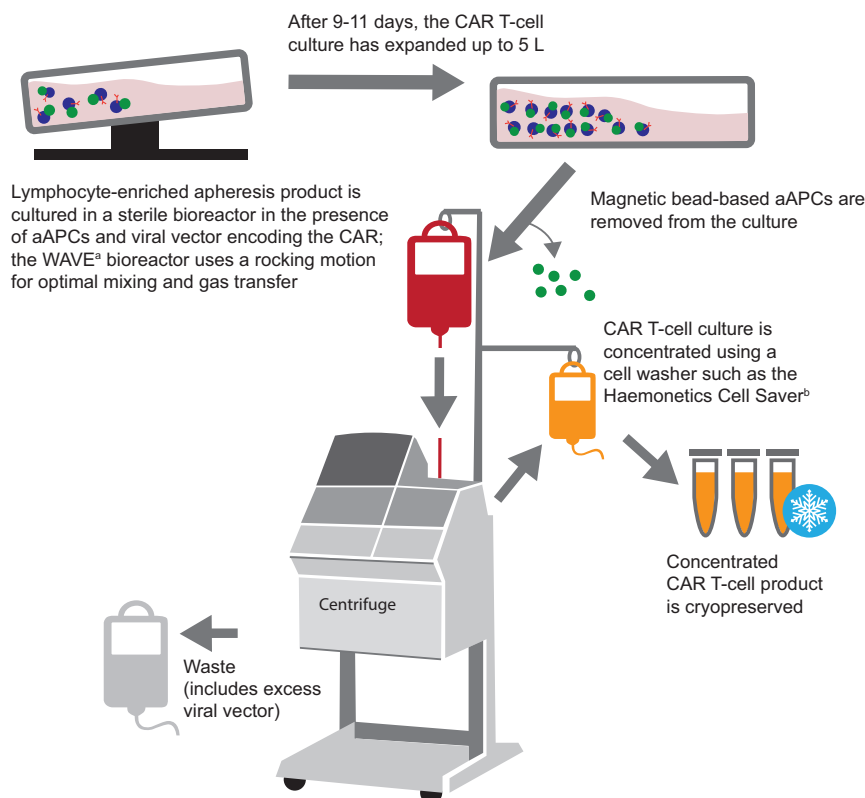


Figure 2. T Cell Culture and Transduction

The T cells are activated using aAPCs, transduced with the CAR-encoding viral vector, and expanded to large numbers in a bioreactor. After expansion, the cells are washed, concentrated, and cryopreserved. aAPC, artificial antigen-presenting cell; CAR, chimeric antigen receptor. ^aGE Healthcare Life Sciences. ^bHaemonetics Corporation.

In our experience, the batch manufacture of viral vector for cellular therapies takes a minimum of 2 weeks. Most of this time is spent growing adequate numbers of cells, such as HEK293T cells, to produce large quantities of replication-defective viral vector.³⁹ Starting from a cryopreserved aliquot of an appropriate working cell bank, the cells are expanded in culture for several days to the appropriate number for production, allowing considerable expansion from the original number of cells seeded. The cells are then transfected with plasmids that collectively result in the production of the minimal lentiviral vector. These plasmids are typically (1) a Gag/Pol packaging construct that encodes the viral structural proteins (Gag) and enzymes (Pol); (2) a construct encoding a suitable envelope glycoprotein from a heterologous source, resulting in vector particle pseudotyping (e.g., VSV-G); (3) a construct for the expression of viral accessory protein Rev; along with (4) a vector plasmid encoding the CAR construct as well as other sequences required for efficient reverse transcription, RNA packaging, and integration.⁴⁰

The vector systems should employ a number of key safety features that collectively prevent the reacquisition of replication competence (e.g., codon-optimized Gag/Pol that minimizes homology between vector components to prevent recombination, self-inactivating long terminal repeat sequences, and removal of all unnecessary sequences and accessory genes).^{41–43} Within 48 hr of transfection, the production cells begin to release CAR-expressing lentiviral vector, which can be collected from the culture medium.³⁹ Over the course of several days, medium exchange allows for the harvest of multiple batches of vector-containing medium, typically two harvests. After filtration to remove production cells and debris, the viral vector is purified through downstream processing to enrich for the viral vector while removing impurities and to formulate the vector into an appropriate storage buffer. In our experience, the vector may be frozen at this point to allow for the production of multiple sub-batches to make larger quantities of the final vector product for increased economic efficiency. Once the target quantity of vector is available, a further GMP process, involving sterilizing filtration and vialing under aseptic conditions, is performed. Once production is complete, the vector is cryopreserved until later use.

for the vector and the CAR T cells also will depend on the incidence of each indication. Additional considerations include generating consistently high-quality vector for predictable genetic modification of cells, understanding the long-term safety of gene therapy, and anticipating global regulatory concerns.

Toward Consistent Cell Processing: Use of the Optimal Vector

In the United States, the viral vector used to transduce the CAR into T cells is considered a key raw material of the CAR T cell manufacturing process, and the modified T cell is considered the investigational final product, also known as the medicinal product in the European Union. In contrast to the final CAR T cell product, which must be individually generated for each patient, the viral vector encoding the CAR can be made in large quantities and stored at -80°C for 4 years in our experience. Other reports suggest that frozen viral vector stocks are stable for up to 9 years at this temperature.^{35,36} As with the CAR T cell manufacturing process, generation of the vector stocks must take place in Good Manufacturing Practice (GMP) facilities. The sterility of the vector is crucial because the final CAR T cell product cannot be sterilized by filtration; manufacture of the vector under controlled, clean room conditions with minimal open processing and sterile filtration during the final aseptic stages of production, all supported and verified by an array of safety testing, ensures sterility and the absence of packaging cells from the final vector product. In addition, use of a third-generation minimal lentiviral vector, incorporating key safety features, enhances safety.^{37,38}



It is important to establish quality control testing for safety, sterility, purity, potency, identity, and titer so that manufacturing centers can be assured that each batch of vector meets defined standards before it is used to transduce T cells.⁴⁴ These quality control tests are described in guidance documents written by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and are briefly summarized here. Safety testing, which can involve preclinical experimentation or toxicity studies in animals, aims to determine that the product is safe for humans when administered appropriately. The sterility of the product is tested to ensure that it is free of contaminating microorganisms; in the case of gammaretroviral vectors and lentiviral vectors, assays for replication-competent retroviruses/lentiviruses (RCRs/RCLs) and mycoplasma testing of the cells and media used in the process help determine that the final CAR T cell product is free from adventitious agents and safe for infusion into patients. Impurities in the vector product are broadly tested to (1) verify consistent purification afforded by the vector manufacturing process, and (2) consequently ensure that the quality of the vector is consistent prior to its use in the T cell manufacturing process. Impurity testing includes testing for process-related impurities, such as Benzoylase (Merck KGaA; used to degrade and facilitate the removal of DNA) and bovine serum albumin (originating from fetal bovine serum), and it also includes characterization of both residual host cell DNA and residual plasmid DNA. In addition, the T cells are tested for bacterial and fungal contamination from the cell culture process. The potency of the vector product is tested to assess whether it functions as anticipated, and its identity is proven through relevant physical, chemical, or biological tests. For example, the titer of viral vector can be measured by analyzing the percentage of healthy donor cells transduced by predefined MOIs, and this can verify whether a particular batch of vector is expected to optimally transduce patient cells.³⁹

In early clinical trials performed at the University of Pennsylvania, multiple vector suppliers were used during the generation of the CD19-targeting therapy CTL019. Using vectors from different suppliers as starting material raises additional questions about the comparability of vector purity, stability, and function. Therefore, it is desirable that a single vector source is used for the generation of CTL019 cells in current and future clinical trials. Additionally, the vector supplier should be able to meet requirements, such as GMP compliance, as well as meet the large production demand. Therefore, our approach was to adopt a lentiviral vector manufacturing process that can meet global health authority requirements and that has the appropriate supporting process validation (Figure 3). In our experience with lentiviral vector manufactured by Oxford BioMedica (OXB), we found that consistent vector quality minimized site-to-site variation in the subsequent CAR T cell manufacturing process. To provide batches of sufficient size to support clinical and commercial requirements, the process has been designed and optimized to manufacture vector in a series of multiple sub-batches within a given manufacturing campaign spanning several weeks. This approach relies on a purification and formulation step prior to cryopreservation and a subsequent hold period. Once sub-batches have been demonstrated to meet a key subset of specifications for that manufacturing

stage, specific sub-batches are selected for filling, and final processing is completed in a single day. The intermediate container closure system (and associated fill volume), GMP processing parameters (freeze/thaw conditions, further aseptic processing conditions, final container, etc.), and the formulation buffer have all been selected to ensure that any loss in titer is minimal and so that the resultant filled product meets target specifications and performs consistently and robustly in the T cell manufacturing process. In addition, the hold stage is supported by a stability testing program, which shows that vector titer is stable in storage for an extended period.

The transduction efficiency of the OXB CTL019 vector was examined in a two-site study, and consistent, dose-dependent transduction efficiency was observed at both sites (unpublished data). This study also provided an understanding of the variability in transduction efficiency among healthy donors, which provides a meaningful baseline to which we can compare patient data. The data demonstrated that the OXB vector can be used with equivalent performance across donors and manufacturing sites. These qualities are both desirable and necessary when choosing a vector that can be produced and used at large scale, and they reduce the risk in process validation.

Optimizing the vector for CAR T cell transduction before beginning large-scale manufacturing reduces variability and maximizes efficiency. The scale of vector production ultimately needs to take into account the potential size of the patient population on an indication-by-indication basis. On this basis, our strategy is to focus current clinical supply, as well as initial commercial supply, on current and well-established production platforms, while investing in the development of next-generation production processes that will provide an equivalent quality of functional vector on a significantly larger scale. The most common vectors used in CAR T cell manufacturing are replication-defective vector systems based on two types of retroviruses: gammaretroviruses and lentiviruses. Both gammaretroviruses and lentiviruses deliver RNA that is reverse-transcribed into DNA in the target cell; this DNA, which encodes the CAR construct, then integrates into the host genome via a process catalyzed by the vector integrase enzyme and several key sequences within the vector construct.²³ An additional advantage of lentiviral-derived vectors is that they retain the ability of lentiviruses to infect non-dividing cells, thus increasing their ability to transduce a wide variety of cells, including quiescent and difficult-to-transduce cells.⁴⁵ However, as described previously, T cell activation is required for increased transduction efficiency, and the lentiviral vector is introduced during cell activation.¹¹

Insertional mutagenesis caused by the integration of vector DNA into host cells near an oncogene is a potential concern with all integrating vectors.^{46,47} However, lentiviral integration patterns favor sites away from cellular promoters, while gammaretroviral integration more frequently occurs near transcriptional start sites, suggesting that lentiviral vectors may carry a lower risk of mutagenesis.⁴⁵ Risk for insertional mutagenesis also appears to be dependent on factors other than the vector system, such as the transgene that is encoded, the

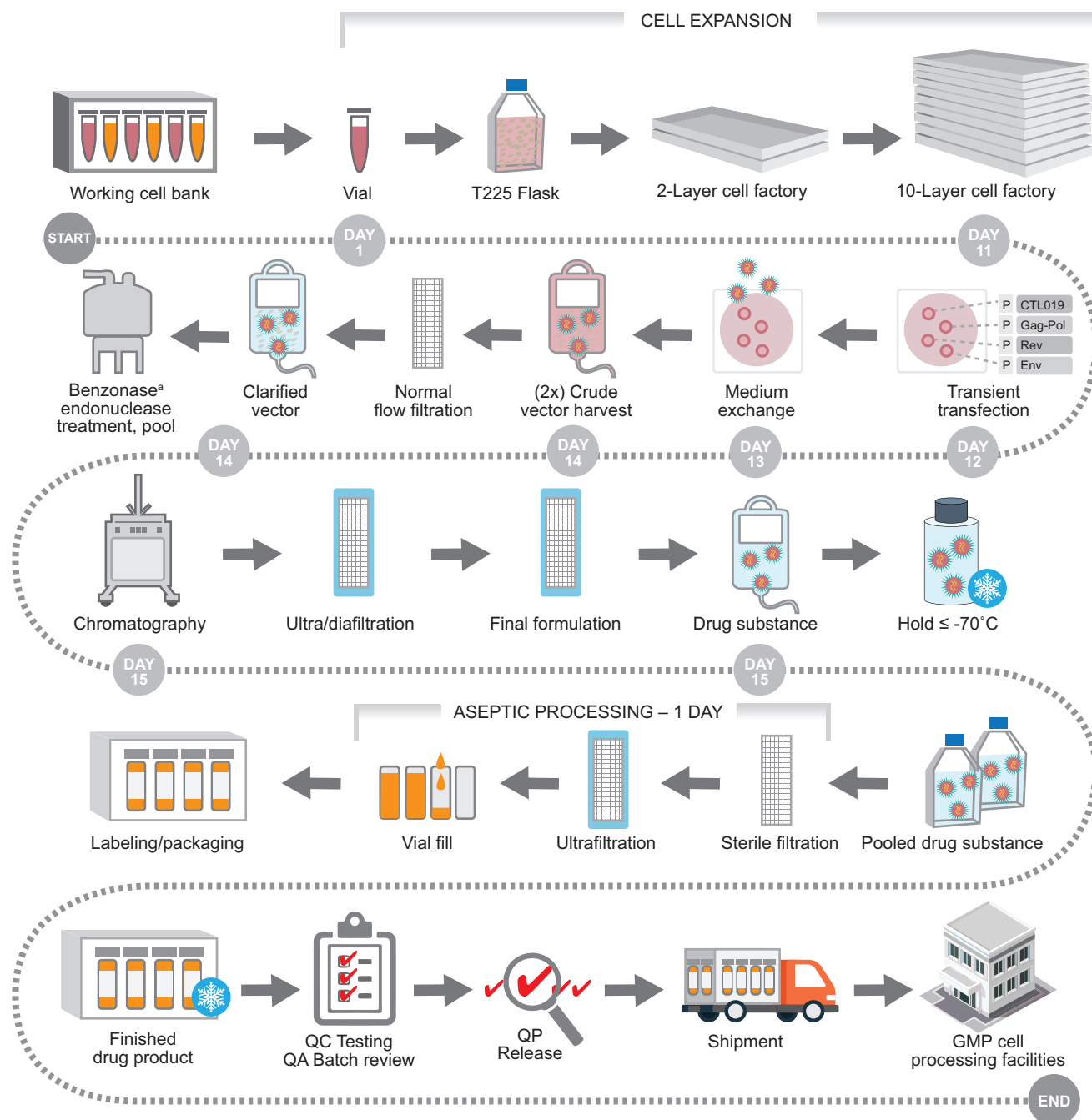


Figure 3. The Lentiviral Vector Manufactured by Oxford BioMedica Ltd. Undergoes Several Rounds of Filtration and Testing to Ensure that a High-Quality Product with Minimal Variability Is Produced

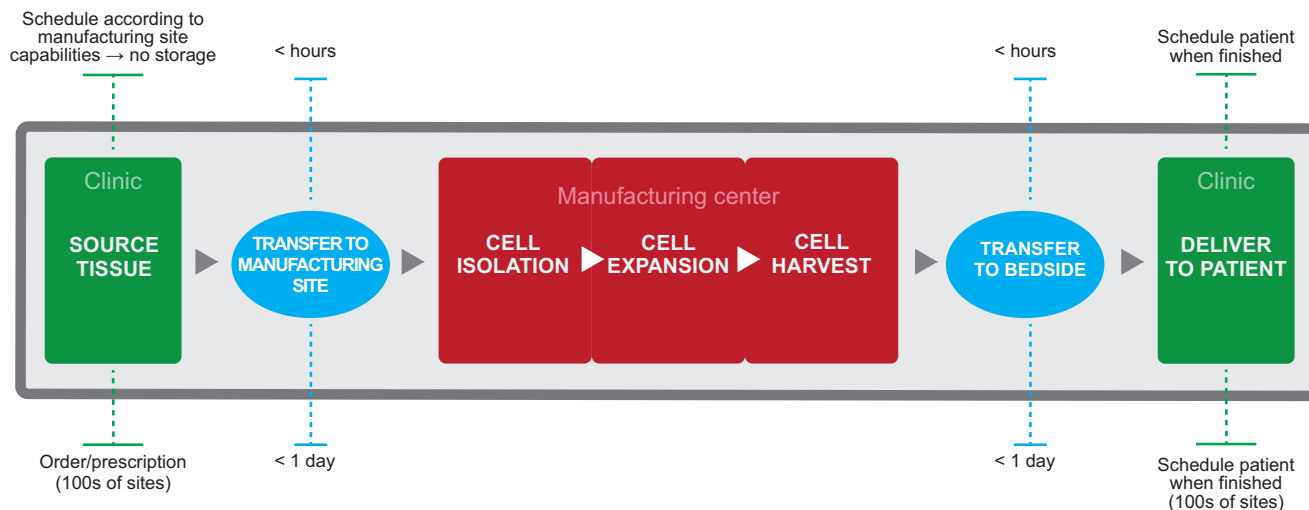
The process has been designed and optimized to manufacture vector in a series of multiple sub-batches. This approach relies on a purification and formulation step prior to cryopreservation and a subsequent hold at $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Specific sub-batches are then selected for final aseptic processing, which is completed in a single day. QA, quality assurance; QC, quality control; QP, qualified person. ^aMerck KGaA.

promoter, and the cell type or disease that is targeted. CAR T cell viral vector-mediated oncogenicity has not been observed in patients treated with CAR T cells in our experience nor in a decade-long

study.⁴⁸ Oncogenic potential may be increased if RCRs/RCLs are present in the vector products; however, current vector designs make the generation of RCRs/RCLs highly unlikely.⁴⁹ The FDA 2006 guidance



Same academic center – close interaction possible



Commercial manufacturing - clinic and manufacturing center are physically disconnected

Figure 4. Transition to Commercial Manufacturing

As CAR T cell therapies transition from flexible processes at single academic institutions to highly controlled processes that can be implemented across many collection, manufacturing, and treatment sites, the coordination among these sites will be crucial to ensure that the material is handled correctly and patients are scheduled appropriately.

considers lentiviral and retroviral vectors to be potentially oncogenic; therefore, vectors used in the clinic for CAR T cell therapy are carefully tested for RCRs/RCLs. In addition to testing for RCRs at multiple stages throughout the vector manufacturing process and the vector-modified cell product, the FDA also recommends that patients be followed for RCRs/RCLs for up to 15 years to monitor any potential delayed adverse event related to these vectors.⁵⁰

Investigating the Long-Term Safety of Viral Vectors Requires Patient Follow-up

Evaluating the long-term safety of using viral vectors for cell and gene therapies will require extensive follow-up. As mentioned above, health authority guidelines also require long-term follow-up of studies using viral vectors; however, requirements may differ depending on the individual countries involved. For example, a United States (USA) trial has been developed to monitor patients who received the CD19 CAR T cell therapy CTL019 for 15 years after treatment (NCT02445222). This study will include patients of any age who have been treated with CTL019 for any B cell malignancy. The primary objective of this follow-up study is to describe delayed adverse events suspected to be related to CD19 CAR T cell therapy, such as the development of new malignancies, incidence or exacerbation of a pre-existing neurologic or autoimmune disorder, or new incidence of a hematologic disorder. The secondary objectives of this study are monitoring the persistence of the CTL019 cells in peripheral blood and the long-term efficacy of the therapy. The persistence of CTL019 cells will be examined by using qPCR to detect the CD19 CAR transgene at specified time points. Additionally, the proportion

of patients who relapse or experience disease progression will be monitored, as well as the incidence of patient death from any cause. Because the effects of persistent CAR T cells on pregnancy are unknown, reproductive health and pregnancy outcomes also will be followed in female patients who were treated with CAR T cells. Thus, the careful design and manufacture of viral vectors for CAR T cell therapy to maximize safety, along with quality and safety testing and long-term patient follow-up, ensure that patient safety is the top priority.

Ensuring Quality of Product in Moving from a Single Institution to a Multi-site, Large-Scale Manufacturing Process

A major challenge with scaling out the production of CAR T cell therapies is the transition from a flexible process at a single academic institution to a highly controlled process that can be implemented across many collection, manufacturing, and treatment sites (Figure 4). Therefore, effective coordination among the collection, manufacturing, and treatment sites involved is crucial to ensure that the material is handled correctly and patients are appropriately scheduled throughout the therapeutic process. Success in developing a global manufacturing process of CAR T cells will be driven by a robust understanding of both the product and the process in order to establish the target product profile and critical quality attributes. For CTL019, the target product profile includes those qualities already discussed: target-specific, highly potent T cells that are capable of robust expansion and long-term persistence in vivo. Using this product profile, critical quality attributes were explored. Cell number, transduction efficiency, growth rate, cellular phenotype, and functional analysis are all critical quality attributes of CTL019 that are well



understood and controlled. Cellular phenotype includes measures such as T cell subset distribution (helper or cytotoxic, effector or memory, etc.) and functionality (cell killing, cytokine release, proliferative capacity, exhaustion, apoptosis, etc.). These critical quality attributes will be coordinated with process understanding to develop a consistent manufacturing process and control strategy that will ensure a uniform product. Examples include the percentage of CD3⁺ T cells in the product and measurement of potency. However, it is to be noted that values for CAR positivity, viability, phenotype, and potency will vary from product to product. As more experience is gained and these data begin to be made public, fair comparisons on the utility and appropriate ranges may be assessed.^{51,52}

Vendor agreements, such as our agreement with OXB described previously, are critical for maintaining a controlled manufacturing process. In the case of CAR T cell therapy, product comparability has the additional challenge that variability between patient apheresis starting materials is likely to contribute much greater differences than factors related to the manufacturing site. Therefore, we have controlled our processes for CTL019 manufacturing and vector production so that we minimize variability related to the manufacturing process.

Meeting Global Regulatory Expectations for Successful Implementation of CAR T Cell Therapies

Early results of CAR T cell therapy suggest significant patient benefit, and, thus, this therapy has the potential for clinical success, which could lead to greater global regulatory collaboration and harmonization. The patient benefit offered by CAR T cell therapies provides a promising opportunity to create a common ground between different regulatory authorities and improve international cooperation. Ensuring regulatory compliance is a critical factor for the successful development of this novel therapeutic approach, and this will be an interesting challenge in a global environment. The FDA has been regulating cell and gene therapies for many years and has developed a number of guidance documents regarding these products. However, these guidance documents are not harmonized with other countries or regions. In addition, each major country has a slightly different focus as they review clinical trial applications. For example, European Union (EU) countries require cGMP compliance as determined by a qualified person, while the United States assesses cGMP compliance through a paper review. Therefore, the more countries that are involved in clinical trials, the more robust the manufacturing process will need to be to meet all of the questions and regulatory requirements. To bring harmonization in the emerging area of cell and gene therapies, on October 11, 2012, nine members of the global regulatory community, including Brazil ANVISA; European Medicines Agency (EMA); Health Canada; India National Institute of Biologicals (NIB); Japan Ministry of Health, Welfare and Labour/Pharmaceutical and Medical Devices Agency; South Korea Ministry of Food and Drug Safety (previously known as Food and Drug Administration [KFDA]); Singapore Health Sciences Authority (HSA); Swissmedic; and the U.S. Food and Drug Administration, convened to form an integrated group with a goal to discuss best practices in the regulation of cell/gene-based therapies and support harmoniza-

tion (<https://www.i-p-r-f.org/en/working-groups/gene-therapy-working-group/>).

CAR T cell developers should have a thorough understanding of this diverse regulatory landscape. Until harmonized regulations are established and there is common experience among regions, we can expect a significant level of uncertainty in product development and a greater reliance on subjective judgment by the regulators. Exemplifying this challenge are the different requirements associated with manufacturing that exist among regions. For example, donor screening and testing, traceability and labeling, patient confidentiality, and apheresis requirements can vary widely among countries. This is particularly challenging if the donor starting material and final product are shipped across international borders. Another example is that the definitions of the materials used (i.e., the starting or raw material) and the requirements for quality control of these materials vary across regions. Balancing different country requirements with starting material quality requirements can be challenging, but it is crucial for multi-national trials. Therefore, the origin, traceability, composition, and certification of each reagent must be readily accessible. Lastly, as each region has unique documents and recommendations related to materials used in cell and gene therapy manufacturing, the requirements for the human or animal serum used for cell culture differ among global regions. Thus, to address some of these regulatory concerns, we are establishing protocols for CAR T cell manufacturing using reagents that comply with the quality requirements for major global regions (e.g., using the same international supplier across global regions).

Additional Areas of Active Investigation in the Development and Manufacturing of CAR T Cell Therapy

There are several preclinical areas of investigation designed to improve CAR T cell therapies and provide benefit to a larger patient population. One aspect under investigation is the subtype of T cells used for CAR T cell therapy. The starting cell population used for many CAR T cell therapies consists of CD4⁺ and CD8⁺ T cells at the ratio present in the peripheral blood of the patient. However, the use of a fixed 1:1 ratio of CD4⁺:CD8⁺ CAR T cells in patients with ALL and non-Hodgkin lymphoma has been investigated.⁵³ If the ratio of T cell subsets becomes an important factor in CAR T cell therapy, manufacturing protocols may need to be altered to include the extra purification steps necessary to administer CAR T cells in a fixed subset ratio.

Other areas of consideration for the future of manufacturing a CAR T cell therapy include mitigating possible adverse events, both short and long term. For example, one adverse effect related to CAR T cell therapy is severe cytokine release syndrome (CRS), which occurs in a minority of patients. CRS is caused by the release of proinflammatory cytokines directly from the CAR T cells and dying tumor cells. Although most cases of CRS are manageable with established treatment algorithms,⁵⁴ it has been speculated that mechanisms to inactivate CAR T cells in patients experiencing adverse effects could be useful to improve the safety of CAR T cell therapy. Using a suicide



switch incorporated into the CAR construct is a strategy that is currently being investigated as a potential way to specifically deplete CAR T cells in a controlled manner, and it may become important as CAR T cell therapy is investigated in an ever-growing clinical population.^{55,56} For example, the iCasp9 safety switch has been effectively used to reduce graft-versus-host disease (GVHD) in patients receiving allogeneic stem cell transplant.⁵⁷ However, depletion of CAR T cells also may abrogate the potential benefit of long-term CAR T cell-mediated tumor surveillance.

Another method of potentially increasing the safety of CAR T cell therapy involves improving the specificity of the modified T cells. This approach may be especially important for CAR T cells targeting solid tumors, which often do not have antigens uniquely expressed on the tumor. A preclinical study showed that CAR T cells could be used to target tumors expressing two antigens, PSCA and PSMA; the CAR T cells did not kill tumor cells expressing only one of these antigens.⁵⁸ Combinatorial antigen recognition strategies may, therefore, be important to consider when designing CARs for the treatment of solid tumors. In our experience, CRS has not yet been observed in clinical trials using CAR T cells to target solid tumors, perhaps because fewer tumor cells are rapidly killed at once due to the solid tumor mass.

An additional strategy under investigation is the use of allogeneic off-the-shelf CAR T cells. This platform uses genome editing to inactivate the endogenous *TCR α* gene, which limits the ability of the allogeneic cells to cause GVHD.^{59,60} Off-the-shelf CAR T cells have shown efficacy in lymphoma xenograft models; but, although there is a report of compassionate use in one patient, the results of controlled clinical trial use have not yet been reported.^{59,61}

How the quality of the patient cells used for CAR transduction affects the efficacy of the final CAR T cell product also should be more thoroughly investigated. It has been shown recently that the reduction of an exhausted T cell phenotype is associated with improved CAR T cell efficacy.⁶² Therefore, the choice of CAR-signaling domains, selection of cell subsets, and adjustment of cell culture conditions to decrease the percentage of cells that become exhausted during the transduction and expansion processes may be critical to generate the highest-quality CAR T cell product.

Conclusions

Given the success of CAR T cells in treating patients in the United States with B cell malignancies, scaling out CAR T cell manufacturing capacity will allow examination of the safety and efficacy of CAR T cell therapies in larger cohorts of patients around the globe. However, a number of manufacturing and regulatory challenges need to be considered when attempting to bring a cellular therapy with a complex manufacturing process to a larger, international patient population. We are currently manufacturing the CD19 CAR T cell therapy CTL019 in a way that will streamline the process of using the therapy globally. To accomplish this, we have established robust collaborations with academic institutions and vendors to thoroughly investigate both the product and process to ensure that our materials are

controlled to maintain high quality. Anticipating regulatory and manufacturing issues before they arise and proactively addressing these concerns help expedite the process of bringing this promising therapeutic approach to more patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

B.L.L. wrote, edited, reviewed, coordinated, and submitted the paper and J.M., K.W., and C.K. wrote, edited, and reviewed the paper.

CONFLICTS OF INTEREST

B.L.L. has commercial research grants from Novartis Pharmaceuticals and holds intellectual property assigned to the University of Pennsylvania and licensed to Novartis Pharmaceuticals. J.M. is an employee of Oxford BioMedica Ltd. K.W. and C.K. are employees of Novartis Pharmaceuticals.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for medical editorial assistance was provided by Novartis Pharmaceuticals. We thank Dr. Judith Murphy (ArticulateScience) for assistance with this manuscript.

REFERENCES

1. Kuwana, Y., Asakura, Y., Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Itoh, S., Nagase, F., and Kurosawa, Y. (1987). Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 960–968.
2. Gross, G., Waks, T., and Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10024–10028.
3. Finney, H.M., Lawson, A.D., Bebbington, C.R., and Weir, A.N. (1998). Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J. Immunol.* 161, 2791–2797.
4. Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Rivière, I., and Sadelain, M. (2002). Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.* 20, 70–75.
5. Sadelain, M., Brentjens, R., and Rivière, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.* 3, 388–398.
6. Maude, S.L., Frey, N., Shaw, P.A., Aplenc, R., Barrett, D.M., Bunin, N.J., Chew, A., Gonzalez, V.E., Zheng, Z., Lacey, S.F., et al. (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.* 371, 1507–1517.
7. Davila, M.L., Riviere, I., Wang, X., Bartido, S., Park, J., Curran, K., Chung, S.S., Stefanski, J., Borquez-Ojeda, O., Olszewska, M., et al. (2014). Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 6, 224ra25.
8. Lee, D.W., Kochenderfer, J.N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y.K., Delbrook, C., Feldman, S.A., Fry, T.J., Orentas, R., Sabatino, M., Shah, N.N., et al. (2015). T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 385, 517–528.
9. Maude, S.L., Pulsipher, M.A., Boyer, M.W., Grupp, S.A., Davies, S.M., Phillips, C.L., Verneris, M.R., August, K.J., Schlis, K., Driscoll, T.A., et al. (2016). Efficacy and safety of CTL019 in the first US phase II multicenter trial in pediatric relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia: results of an interim analysis. *Blood* 128, 2801.
10. Grupp, S.A., Laetsch, T.W., Buechner, J., Bittencourt, H., Maude, S.L., Verneris, M.R., Myers, G.D., Boyer, M.W., Rives, S., De Moerloose, B., et al. (2016). Analysis of a global registration trial of the efficacy and safety of CTL019 in pediatric and young adults with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 128, 221.
11. Levine, B.L. (2015). Performance-enhancing drugs: design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Cancer Gene Ther.* 22, 79–84.



12. Smith, J.W. (1997). Apheresis techniques and cellular immunomodulation. *Ther. Apher. 1*, 203–206.
13. Lee, G., and Arepally, G.M. (2012). Anticoagulation techniques in apheresis: from heparin to citrate and beyond. *J. Clin. Apher. 27*, 117–125.
14. Powell, D.J., Jr., Brennan, A.L., Zheng, Z., Huynh, H., Cotte, J., and Levine, B.L. (2009). Efficient clinical-scale enrichment of lymphocytes for use in adoptive immunotherapy using a modified counterflow centrifugal elutriation program. *Cytotherapy 11*, 923–935.
15. Riddell, S.R., Sommermeyer, D., Berger, C., Liu, L.S., Balakrishnan, A., Salter, A., Hudecek, M., Maloney, D.G., and Turtle, C.J. (2014). Adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition. *Cancer J. 20*, 141–144.
16. Levine, B.L., Bernstein, W.B., Connors, M., Craighead, N., Lindsten, T., Thompson, C.B., and June, C.H. (1997). Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4⁺ T cells in the absence of exogenous feeder cells. *J. Immunol. 159*, 5921–5930.
17. Suhoski, M.M., Golovina, T.N., Aqui, N.A., Tai, V.C., Varela-Rohena, A., Milone, M.C., Carroll, R.G., Riley, J.L., and June, C.H. (2007). Engineering artificial antigen-presenting cells to express a diverse array of co-stimulatory molecules. *Mol. Ther. 15*, 981–988.
18. Levine, B.L. (2007). Personalized cell-based medicine: activated and expanded T cells for adoptive immunotherapy. *BioProcessing J. 6*, 14–19.
19. Hami, L.S., Green, C., Leshinsky, N., Markham, E., Miller, K., and Craig, S. (2004). GMP production and testing of Xcellerated T Cells for the treatment of patients with CLL. *Cytotherapy 6*, 554–562.
20. Somerville, R.P., and Dudley, M.E. (2012). Bioreactors get personal. *OncImmunology 1*, 1435–1437.
21. Maus, M.V., Thomas, A.K., Leonard, D.G., Allman, D., Addya, K., Schlienger, K., Riley, J.L., and June, C.H. (2002). Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat. Biotechnol. 20*, 143–148.
22. Guedan, S., Chen, X., Madar, A., Carpenito, C., McGettigan, S.E., Frigault, M.J., Lee, J., Posey, A.D., Jr., Scholler, J., Scholler, N., et al. (2014). ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. *Blood 124*, 1070–1080.
23. Coffin, J., Hughes, S., and Varmus, H. (1997). *Retroviruses* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
24. McGarrity, G.J., Hoyah, G., Winemiller, A., Andre, K., Stein, D., Blick, G., Greenberg, R.N., Kinder, C., Zolopa, A., Binder-Scholl, G., et al. (2013). Patient monitoring and follow-up in lentiviral clinical trials. *J. Gene Med. 15*, 78–82.
25. Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Bartholomae, C.C., Ranzani, M., Benedicenti, F., Sergi, L.S., Ambrosi, A., Ponzoni, M., et al. (2009). The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J. Clin. Invest. 119*, 964–975.
26. Huls, M.H., Figliola, M.J., Dawson, M.J., Olivares, S., Kebriaei, P., Shpall, E.J., Champlin, R.E., Singh, H., and Cooper, L.J. (2013). Clinical application of Sleeping Beauty and artificial antigen presenting cells to genetically modify T cells from peripheral and umbilical cord blood. *J. Vis. Exp. (72)*, e50070.
27. Singh, H., Figliola, M.J., Dawson, M.J., Olivares, S., Zhang, L., Yang, G., Maiti, S., Manuri, P., Senyukov, V., Jena, B., et al. (2013). Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. *PLoS ONE 8*, e64138.
28. Beatty, G.L., Haas, A.R., Maus, M.V., Torigian, D.A., Soulen, M.C., Plesa, G., Chew, A., Zhao, Y., Levine, B.L., Albelda, S.M., et al. (2014). Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res. 2*, 112–120.
29. Aronovich, E.L., McIvor, R.S., and Hackett, P.B. (2011). The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy. *Hum. Mol. Genet. 20* (R1), R14–R20.
30. Somerville, R.P.T., Devillier, L., Parkhurst, M.R., Rosenberg, S.A., and Dudley, M.E. (2012). Clinical scale rapid expansion of lymphocytes for adoptive cell transfer therapy in the WAVE® bioreactor. *J. Transl. Med. 10*, 69.
31. Jin, J., Sabatino, M., Somerville, R., Wilson, J.R., Dudley, M.E., Stronck, D.F., and Rosenberg, S.A. (2012). Simplified method of the growth of human tumor infiltrating lymphocytes in gas-permeable flasks to numbers needed for patient treatment. *J. Immunother. 35*, 283–292.
32. Bajgain, P., Mucharla, R., Wilson, J., Welch, D., Anurathapan, U., Liang, B., Lu, X., Ripple, K., Centanni, J.M., Hall, C., et al. (2014). Optimizing the production of suspension cells using the G-Rex “M” series. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 1*, 14015.
33. Kaiser, A.D., Assenmacher, M., Schröder, B., Meyer, M., Orentas, R., Bethke, U., and Dropulic, B. (2015). Towards a commercial process for the manufacture of genetically modified T cells for therapy. *Cancer Gene Ther. 22*, 72–78.
34. Mock, U., Nickolay, L., Cheung, G., Zhan, H., Peggs, K., Johnston, I., Kaiser, A., Pule, M., Thrasher, A., and Qasim, W. (2015). Automated lentiviral transduction of T cells with CARs using the CliniMACS Prodigy. *Blood 126*, 2043.
35. Lamers, C.H., van Elzakker, P., Luiders, B.A., van Steenberg, S.C., Sleijfer, S., Debets, R., and Gratama, J.W. (2008). Retroviral vectors for clinical immunogene therapy are stable for up to 9 years. *Cancer Gene Ther. 15*, 268–274.
36. Przybylowski, M., Hakakha, A., Stefanski, J., Hodges, J., Sadelain, M., and Rivière, I. (2006). Production scale-up and validation of packaging cell clearance of clinical-grade retroviral vector stocks produced in cell factories. *Gene Ther. 13*, 95–100.
37. Kim, V.N., Mitrophanous, K., Kingsman, S.M., and Kingsman, A.J. (1998). Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol. 72*, 811–816.
38. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol. 72*, 8463–8471.
39. Wang, X., Olszewska, M., Qu, J., Wasielewska, T., Bartido, S., Hermetet, G., Sadelain, M., and Rivière, I. (2015). Large-scale clinical-grade retroviral vector production in a fixed-bed bioreactor. *J. Immunother. 38*, 127–135.
40. Schambach, A., Zychlinski, D., Ehrnstroem, B., and Baum, C. (2013). Biosafety features of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther. 24*, 132–142.
41. Yu, S.F., von Rüden, T., Kantoff, P.W., Garber, C., Seiberg, M., Rüther, U., Anderson, W.F., Wagner, E.F., and Gilboa, E. (1986). Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83*, 3194–3198.
42. Kotsopoulou, E., Kim, V.N., Kingsman, A.J., Kingsman, S.M., and Mitrophanous, K.A. (2000). A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *J. Virol. 74*, 4839–4852.
43. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol. 72*, 9873–9880.
44. Cross, P.J., and Levine, B.L. (2006). Assays for the release of cellular gene therapy products. In *Concepts in Genetic Medicine*, B. Dropulic and B.J. Carter, eds. (John Wiley & Sons), pp. 307–318.
45. Vannucci, L., Lai, M., Chiappesi, F., Ceccherini-Nelli, L., and Pistello, M. (2013). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol. 36*, 1–22.
46. Varmus, H.E., Quintrell, N., and Ortiz, S. (1981). Retroviruses as mutagens: insertion and excision of a nontransforming provirus alter expression of a resident transforming provirus. *Cell 25*, 23–36.
47. Shen-Ong, G.L., Potter, M., Mushinski, J.F., Lavu, S., and Reddy, E.P. (1984). Activation of the c-myc locus by viral insertional mutagenesis in plasmacytoid lymphosarcomas. *Science 226*, 1077–1080.
48. Scholler, J., Brady, T.L., Binder-Scholl, G., Hwang, W.T., Plesa, G., Hege, K.M., Vogel, A.N., Kalos, M., Riley, J.L., Deeks, S.G., et al. (2012). Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci. Transl. Med. 4*, 132ra53.
49. Bear, A.S., Morgan, R.A., Cornetta, K., June, C.H., Binder-Scholl, G., Dudley, M.E., Feldman, S.A., Rosenberg, S.A., Shurtliff, S.A., Rooney, C.M., et al. (2012). Replication-competent retroviruses in gene-modified T cells used in clinical trials: is it time to revise the testing requirements? *Mol. Ther. 20*, 246–249.
50. Briefing document—testing for replication competent retrovirus (RCR)/lentivirus (RCL) in retroviral and lentiviral vector based gene therapy products—revisiting



- current FDA recommendations. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/CellularTissueandGeneTherapiesAdvisoryCommittee/UCM232592.pdf>. Accessed 12 April 2016.
51. Kalos, M., Levine, B.L., Porter, D.L., Katz, S., Grupp, S.A., Bagg, A., and June, C.H. (2011). T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Transl. Med.* 3, 95ra73.
 52. Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A., and June, C.H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 365, 725–733.
 53. Turtle, C.J., Berger, C., Sommermeyer, D., Budiarto, T., Hanafi, L., Melville, K., Pender, B., Steevens, N., Chaney, C., Heimfeld, S., et al. (2015). Immunotherapy with CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells of defined subset composition. *J. Clin. Oncol.* 33.
 54. Lee, D.W., Gardner, R., Porter, D.L., Louis, C.U., Ahmed, N., Jensen, M., Grupp, S.A., and Mackall, C.L. (2014). Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 124, 188–195.
 55. Hoyos, V., Savoldo, B., Quintarelli, C., Mahendravada, A., Zhang, M., Vera, J., Heslop, H.E., Rooney, C.M., Brenner, M.K., and Dotti, G. (2010). Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia* 24, 1160–1170.
 56. Budde, L.E., Berger, C., Lin, Y., Wang, J., Lin, X., Frayo, S.E., Brouns, S.A., Spencer, D.M., Till, B.G., Jensen, M.C., et al. (2013). Combining a CD20 chimeric antigen receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T cell adoptive immunotherapy for lymphoma. *PLoS ONE* 8, e82742.
 57. Di Stasi, A., Tey, S.K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A.G., Grilley, B., et al. (2011). Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med.* 365, 1673–1683.
 58. Kloss, C.C., Condomines, M., Cartellieri, M., Bachmann, M., and Sadelain, M. (2013). Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat. Biotechnol.* 31, 71–75.
 59. Gouble, A., Philip, B., Poirot, L., Schiffer-Mannioui, C., Galetto, R., Derniame, S., Cheung, G., Arnould, S., Desseaux, C., Pule, M., and Smith, J. (2014). In vivo proof of concept of activity and safety of UCART19, an allogeneic “off-the-shelf” adoptive T-cell immunotherapy against CD19+ B-cell leukemias. *Blood* 124, 4689.
 60. Poirot, L., Philip, B., Schiffer-Mannioui, C., Le Clerre, D., Chion-Sotinel, L., Derniame, S., Potrel, P., Bas, C., Lemaire, L., Galetto, R., et al. (2015). Multiplex genome-edited T-cell manufacturing platform for “off-the-shelf” adoptive T-cell immunotherapies. *Cancer Res.* 75, 3853–3864.
 61. Qasim, W., Jal Amrolia, P., Samarasinghe, S., Ghorashian, S., Zhan, H., Stafford, S., Butler, K., Ahsan, G., Gilmour, K., Adams, S., et al. (2015). First clinical application of TALEN engineered universal CAR19 T cells in B-ALL. *Blood* 126, 2046.
 62. Long, A.H., Haso, W.M., Shern, J.F., Wanhainen, K.M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J.P., Walker, A.J., Kohler, M.E., Venkateshwara, V.R., et al. (2015). 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat. Med.* 21, 581–590.



**Superintendencia de
Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2021/0017650
Recibo: 25-131263
Fecha: 31/03/2025

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 1091310
CUS: 1374183842

Patente PCT

VECTORES VÍRICOS Y USO DE LOS MISMOS EN TERAPIAS CELULARES ADOPTIVAS

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 225,000	\$ 225,000
2	50005-01-01	Solicitud examen de patentabilidad Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 1,522,000	\$ 1,522,000
TOTAL					\$ 1,747,000