

## **PRODUCCIÓN RÁPIDA DE CÉLULAS T**

### **SOLICITUDES RELACIONADAS**

**[0001]** La presente es una Solicitud de Patente de utilidad que invoca el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N° Acta: 63/292.843, presentada el 22 de diciembre de 2021, cuya divulgación completa se incorpora en la presente a modo de referencia.

### **REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO EN FORMATO ELECTRÓNICO**

**[0002]** Se incorpora por completo en la presente a modo de referencia el listado de secuencias presentado en formato electrónico con la presente solicitud como un archivo XML denominado 2459S\_005WO.xml, creado el 22 de diciembre de 2022 y cuyo tamaño es de 13000 bytes.

### **CAMPO TÉCNICO**

**[0003]** La divulgación se relaciona con un flujo de trabajo de la producción rápida de células T que permite obtener productos de células T modificadas genéticamente en menos de 1 día usando una transducción mediada por virus y también provee innovación en las pruebas de comercialización del producto para facilitar los obstáculos en la utilización clínica de este producto.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

**[0004]** La terapia con células T ha mostrado un gran potencial en el tratamiento de enfermedades, en particular cáncer, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes. Un método para mejorar la terapia con células T consiste en modificar células T usando transferencia de genes mediada por virus para aumentar su actividad y/o especificidad con respecto a las células diana deseadas. Por ejemplo, la expresión de receptores de antígenos quiméricos

(CAR) sobre las células T usando lentivirus y retrovirus ha demostrado un enorme potencial en las terapias contra cáncer. Las células T autólogas que expresan un receptor de antígeno quimérico (células CAR-T) dirigidas particularmente contra CD19 han exhibido una eficacia significativa en los pacientes con formas malignas de células B recidivantes o refractarias.

**[0005]** El potencial de las células T modificadas genéticamente queda evidenciado por el notable éxito clínico de las células CAR-T CD19 autólogas en la leucemia linfocítica aguda (ALL) y los linfomas no-Hodgkin recidivantes/refractarios. Una enfermedad agresiva, recidivante o refractaria se trata con una terapia de dosis alta seguido por rescate de células madre autólogas si la enfermedad aún es sensible a la quimioterapia (1, 2). Desafortunadamente, hasta un 50% de los pacientes sufren recaídas o se vuelven refractarios y los resultados de los pacientes recidivantes/refractarios son pobres con una quimioterapia tradicional (por ejemplo, 7% de tasa de respuesta completa (CR) y una mediana de 6,3 meses de supervivencia general (OS) (3)). Por el contrario, las terapias con CAR-T CD19 han mostrado resultados significativamente mejorados (por ejemplo, >50% de CR y >50% OS después de 1 año (4)) en estos pacientes.

**[0006]** A pesar de la aprobación por la FDA (por sus siglas en inglés, Administración de Drogas y Alimentos) de los productos comerciales de células CAR-T CD19 y BCMA en los EEUU, así como la aprobación reglamentaria en muchos otros países en todo el mundo, las terapias existentes aún son prohibitivas en cuanto al costo para su uso a nivel mundial y representan una carga económica significativa aún en los EEUU. El costo actual de la producción de productos de CAR-T autólogas para las compañías farmacéuticas se ha

estimado en ~100k USD por paciente (5). Además del costo, el proceso de producción es lento lo cual conduce a demoras indeseables para el tratamiento de los pacientes. La entrega al paciente de los productos actuales aprobados por la FDA demoran ~3-6 semanas o más, lo cual conduce al progreso de la enfermedad en un número significativo de pacientes debido a la demora del tratamiento. Otro desafío de las terapias actuales con CAR-T es que conducen a una eficacia pobre en la mayoría de las formas malignas que no son formas malignas de células B, tales como NHL, leucemia linfocítica aguda y mieloma múltiple. Además, aún en el caso de enfermedades tal como NHL donde hay resultados iniciales promisorios, muchos pacientes (~50%) no presentarán remisiones duraderas después de 1 año (6, 7). Si bien las causas de los resultados subóptimos de las terapias con CAR-T en los pacientes probablemente sea multifactorial, uno de los desafíos es la persistencia pobre de las células CAR-T infundidas en los pacientes. Se ha informado que la persistencia de las células CAR-T se correlaciona con el estado de diferenciación del producto CAR-T elaborado. En particular, se cree que hay más productos diferenciados que tienen una persistencia reducida in vivo en comparación con los productos con más células inmaduras/naïve [*sin tratamiento previo*] (revisado en (8)).

[0007] La producción tradicional de CAR-T es un proceso extenso, complejo y costoso que típicamente comprende el aislamiento de las células T, la activación de las células T, la transducción de las células T (a menudo combinado con estrategias para aumentar la eficacia de la transducción tales como inoculación centrífuga, retronectina, polibreno, etc). La estimulación de las células T para permitir una transducción eficiente típicamente comprende una

estimulación con los anticuerpos anti-CD3 o anti-CD3/CD28 y una estimulación con citoquinas (por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-21 y/o IL-15). Además de utilizar procesos de producción complejos y sofisticados que en muchos casos requieren equipos costosos, el proceso consume mucho tiempo y es laborioso. Por ejemplo, las células T típicamente se aíslan usando esferas magnéticas que involucra un proceso extenso y costoso. Las esferas típicamente también requieren su eliminación lo cual agrega otro paso que necesita tiempo, equipos especiales y experiencia para la producción. La producción compleja casi siempre necesita también el uso de una sala limpia especializada para asegurar la esterilidad del producto.

**[0008]** Para una transducción eficiente de las células T con el virus (por ejemplo, lentivirus o retrovirus), se ha informado y practicado casi universalmente con anterioridad en este campo que primero las células T deben ser activadas (por ejemplo, mediante una estimulación con CD3 o CD3/CD28) en la presencia de citoquinas (por ejemplo, IL-2, IL-7 y/o IL-15) por un período de 1-3 días antes de la transducción viral. Por ello, la producción tradicional involucra un paso de activación inicial con CD3 y/o CD3/CD28 seguido por 1-3 días antes que la transducción pueda tener lugar de manera eficaz. Es una práctica generalizada expandir las células T durante 1-2 semanas después de la activación. Después de la transducción viral, la producción tradicional utiliza una fase de expansión de células T, en parte para generar suficientes células T para su infusión al paciente.

**[0009]** En un gran porcentaje de los casos de producción de células CAR-T para uso clínico, las células T se aíslan en las etapas iniciales de la producción (es decir, antes de la transducción viral). En particular, los pasos de aislamiento

de células T forman parte de todos los flujos de trabajo de la producción rápida de células T modificadas genéticamente informados con anterioridad (1 día o menos) que involucren una modificación genética basada en virus. En prácticamente todos los casos en los cuales se aíslan células T para la producción clínica, las células T se purifican usando esferas magnéticas (típicamente ya sea esferas magnéticas CD3/CD28 Dynabeads® (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) o CD4/CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania)). Estas esferas que deben ser eliminadas en gran parte antes de la infusión al paciente están fuertemente unidas a las células T y requieren varios días en desprenderse (típicamente después de la internalización del antígeno de superficie diana). Por ejemplo, el proveedor ThermoFisher Scientific informa que las esferas CD3/CD28 demoran varios días en desprenderse y la eliminación de las esferas dará como resultado la pérdida de una fracción significativa de células T (debido a las esferas unidas) si se intenta eliminar las esferas antes de ~ 3 días. ([assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/11131D\\_32D\\_61D.pdf](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/11131D_32D_61D.pdf)).

**[0010]** Miltenyi Biotec informa que sus esferas magnéticas no se liberan por 2-3 días de las células unidas. De hecho, se ha informado que las esferas de Miltenyi Biotec en lugar de realmente desprenderse se pueden internalizar después de varios días y por ello, pueden tener un impacto desconocido sobre el producto de células T ([thermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/cell-isolation-and-expansion/cell-isolation/see-how-miltenyi-microbeads-interact-with-your-t-cells.html](https://thermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/cell-isolation-and-expansion/cell-isolation/see-how-miltenyi-microbeads-interact-with-your-t-cells.html)).

**[0011]** Debido a los costos y la demora hasta la terapia inherente del flujo de trabajo de la producción compleja y los beneficios de reducir la duración del cultivo de las células T para mantener una población naïve (por ejemplo, para

una mayor persistencia in vivo), resulta deseable un flujo de trabajo de producción simple y rápido. En particular, un flujo de trabajo de 1 día o menos es particularmente ventajoso ya que las reducciones en la duración del cultivo podría aumentar significativamente la población de células T naïve así como eventualmente permitir un sistema de producción simple, cerrado, fuera de instalaciones de salas limpias. Además, sería ventajoso también un proceso que no requiera el aislamiento de células T por numerosas razones que incluyen aumentar la simplicidad del proceso que requiere menos costos y experiencia y disminuir la mano de obra en cuanto a los requerimientos que conducen a una mayor escalabilidad. Además, al evitar un paso de aislamiento de células T el producto podría contener tipos celulares adicionales, tales como células NK, que también tienen propiedades terapéuticas favorables conocidas, tal como la capacidad para lisar células tumorales o infectadas con patógenos. Sorprendentemente, los estudios de los inventores también han revelado beneficios adicionales de utilizar una población de células mononucleares mixtas (por ejemplo, PBMC o PBMC agotadas en monocitos) en oposición a células T aisladas para una producción rápida de CAR-T. Por ejemplo, las células T aisladas muestran una disminución de la población de células T naïve altamente deseables en el producto elaborado en comparación con el mismo proceso de producción realizado usando PBMC sin un paso de aislamiento de células T.

**[0012]** Se ha informado que los flujos de trabajo de la producción clínica rápida de CAR-T del arte anterior usan una administración de genes virales. Los métodos de producción utilizan pasos de aislamiento de células T que agregan costos y complejidad adicionales innecesarios, y además pueden deteriorar la capacidad para producir eficazmente células en el menor tiempo posible debido

a la incapacidad para eliminar las esferas magnéticas de las células sin una pérdida significativa de células.

**[0013]** En un flujo de trabajo del arte anterior, se describió un protocolo de producción de <2 días que involucra ~24 h de cultivo *ex vivo* ([ashpublications.org/blood/article/138/Supplement%201/2848/481328/Preservation-of-T-Cell-Stemness-with-a-Novel](https://ashpublications.org/blood/article/138/Supplement%201/2848/481328/Preservation-of-T-Cell-Stemness-with-a-Novel)). Se informa que este proceso involucra un paso de aislamiento de células T. Las diferencias clave comprenden el aislamiento de las células T, el método de activación de células T, el uso de citoquinas y el uso de automatización que además agrega costos significativos tanto relativo al instrumento (~400 k) como costos elevados de los insumos). Debido al uso de microesferas es probable que este producto también incluya microesferas internalizadas.

**[0014]** Otro flujo de trabajo del arte que según lo informado se podría llevar a cabo sobre un período de 1 día requiere el uso de CD3/CD28 Dynabeads y una dosis alta de IL-2 (300 ul/ml) sobre las células T aisladas. Dado el uso de Dynabeads, este proceso podría sufrir una pérdida significativa de células T si las células se cosechan a 1 día. Además, el uso de una dosis alta de IL-2 puede conducir a una diferenciación significativa de células T.

**[0015]** Debido a las limitaciones en los flujos de trabajo de producción complejos, extensos y costosos para las células T modificadas genéticamente y los desafíos que representa la diferenciación de células T con muchos de los enfoques actuales, persiste una importante necesidad de desarrollar plataformas de producción de CAR-T rápidas, efectivas en cuanto al costo y escalables que conduzcan a productos de CAR-T eficaces y accesibles. Los métodos y sistemas de la presente cumplen con esta necesidad persistente.

## SÍNTESIS DE LA INVENCION

**[0016]** De acuerdo con los propósitos y beneficios que se describen en la presente, en un aspecto de la divulgación se provee un método de producción rápida de una población de células T modificadas genéticamente, que comprende los pasos de obtener una población de células mononucleares mixtas y, de manera sustancialmente simultánea, activar una población de células T comprendida en la población de células mononucleares mixtas y exponer la población de células mononucleares mixtas a un vector viral adaptado para transducir por lo menos la población de células T comprendida en la población de células mononucleares mixtas con un nucleótido extraño. No se requiere ningún paso de aislamiento de células T. En formas de realización, el método incluye cosechar la población de células mononucleares mixtas que comprende por lo menos una población de células T modificadas genéticamente hasta 24 horas desde los pasos simultáneos de activación y exposición a por lo menos un vector viral.

**[0017]** En formas de realización, el paso de activación se lleva a cabo mediante exposición de las células mononucleares mixtas a un agente de activación seleccionado entre uno o más del grupo de citoquinas que consiste en IL-2, IL-7, IL-15 e IL21, y/o a un agente de activación seleccionado entre activadores de uno o más de CD3, CD28, OX40, CD2, CD27, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137). En formas de realización, la activación se realiza mediante exposición de las células mononucleares mixtas a un agente de activación seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en IL-7 e IL-15. En otras formas de realización, el método incluye un paso de depleción al menos parcial mediante adherencia de una población de monocitos

comprendida en la población de células mononucleares antes de los pasos de activación y exposición al vector viral.

**[0018]** En formas de realización del método, los pasos de activación y exposición al vector viral preferiblemente se efectúan en la ausencia de cualquier citoquina exógena. El paso de activación se puede efectuar mediante exposición de la población de células mononucleares mixtas a uno o más entre un activador CD3, un activador CD28, un anticuerpo anti-CD3 soluble o unido a una superficie, o un anticuerpo anti-CD28 soluble o unido a una superficie.

**[0019]** La población de células mononucleares mixtas comprende la población de células T modificadas genéticamente. La población de células mononucleares mixtas se puede obtener mediante aféresis o una extracción de sangre periférica.

**[0020]** En formas de realización, el vector de transducción viral se selecciona del grupo que consiste en un lentivirus, un retrovirus y un adenovirus. En formas de realización, se provee un paso de centrifugación diferencial después de los pasos sustancialmente simultáneos de activación y exposición al vector de transducción viral para eliminar el ADN del plásmido del ADN genómico mediante selección por tamaño de ADN.

**[0021]** En otro aspecto, la presente divulgación provee una célula T modificada genéticamente, producida mediante el método precedente.

**[0022]** En aún otro aspecto, la presente divulgación provee un kit de sistema cerrado para aplicar el método de producción rápida de una población de células T modificadas genéticamente de acuerdo con el método precedente. El kit de sistema cerrado puede incluir un primer recipiente estéril adaptado para recibir una población de células mononucleares mixtas, un segundo recipiente

estéril adaptado para recibir una población de células mononucleares mixtas agotada en monocitos, un agente de activación de células T libre de esferas, un vector viral adaptado para transducir una población de células T con un nucleótido extraño, un medio de cultivo adecuado y una solución de lavado de células adecuada. En formas de realización, por lo menos el primer recipiente es de un material adecuado para la depleción de monocitos de la población de células mononucleares mixtas. El primer y segundo recipientes pueden estar adaptados para una introducción estéril del agente de activación de células T libre de esferas, del vector de transducción viral, del medio de cultivo y de la solución de lavado de células.

[0023] Los diversos elementos/reactivos del kit de sistema cerrado son, por lo demás, sustancialmente como se describió precedentemente. Uno o ambos primer y segundo recipientes se pueden seleccionar del grupo que consiste en una bolsa de cultivo celular y un frasco de cultivo celular.

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0024] Las características novedosas de la invención se describen en particular en las reivindicaciones adjuntas. Se podrá lograr una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención con referencia a la siguiente descripción detallada que describe las formas de realización ilustrativas, en donde se usan los principios de la invención y las figuras adjuntas donde:

[0025] La Figura 1A muestra una comparación de las eficiencias de transducción usando un proceso de transducción/activación simultánea de 20 h y un vector lentiviral-GFP usando diferentes reactivos de activación de células T con PBMC agotadas en monocitos. Después de 20 h, las células se lavaron para

eliminar el reactivo de activación/virus libre y el reactivo Cloudz® se eliminó con solución amortiguadora de disolución. La expresión de GFP se determinó mediante citometría de flujo 3 días después de la transducción/activación. El flujo de trabajo utilizado se describe en la sección con el título *Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida*. En el Panel A se muestra el uso de 3 reactivos comerciales todos los cuales involucran anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 conjugados con una matriz o esferas.

**[0026]** La Figura 1B muestra la producción de célula T realizada como en la Figura 1A excepto que se usó un anticuerpo anti-CD3 soluble (OKT3 100 ng/ml) o una combinación de anticuerpos anti-CD3 (100 ng/ml) y anti-CD28 (300 ng/ml) solubles como reactivo de activación. Además, la producción se realizó en la ausencia o presencia de IL-7 e IL-15.

**[0027]** La Figura 1C muestra la producción de células T realizada como se describió en la Figura 1B excepto que se usó Immunocult® a la concentración recomendada por los proveedores, que se incluyó como un reactivo de activación de células T y se usaron citoquinas con todas las muestras (IL-7 e IL-15).

**[0028]** La Figura 1D muestra la producción de células T realizada usando el flujo de trabajo que se describió en la Figura 1A excepto que la activación de las células T se efectuó usando CD3 soluble (OKT3 100 ng/ml), CD3 unido a una superficie (superficie recubierta con OKT3 5 µg/ml) o TransAct® (a la concentración recomendada por los proveedores). La expresión de CD69 se midió mediante citometría de flujo en el momento de la cosecha del producto (cultivo de 20 horas).

**[0029]** La Figura 2 ilustra la activación de células T simultánea versus sucesiva: La expresión de CD19 CAR se evaluó usando un anticuerpo anti-

FMC63 (AcroBiosystems, Newark, Delaware) mediante citometría de flujo. Las células fueron examinadas por la expresión de CAR 4 días después de la transducción. Las PBMC se plaquearon y activaron con el reactivo de activación de células T Cloudz® ya sea al mismo tiempo que la adición del vector lentiviral o 24 horas antes de la adición del virus.

[0030] La Figura 3 muestra una comparación de varias citoquinas sobre la modulación de la eficiencia de transducción usando el flujo de trabajo de producción rápida. Las PBMC agotadas en monocitos se transdujeron con el vector lentiviral CD19 CAR usando el proceso que se describe en la sección *Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida* usando las citoquinas indicadas y fueron evaluadas por la expresión de CD19 CAR después de 72 horas mediante citometría de flujo usando un anticuerpo anti-FMC63 específico (Acrobiosystems).

[0031] En la Figura 4 se muestra una evaluación de diferentes duraciones de cultivo usando el flujo de trabajo de producción rápida. Las PBMC agotadas en monocitos se activaron y transdujeron con el vector CD19 CAR como se describe en la sección *Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida*. Las células se lavaron para eliminar los virus libres y el reactivo de activación de células T CloudZ® se eliminó a las 6 o 17 horas después de iniciar el proceso. Las células se mantuvieron luego en cultivo por 72 horas con el fin de evaluar la expresión en superficie de CD19 CAR mediante citometría de flujo.

[0032] La Figura 5 muestra que las células UF-KURE19 demostraron un aumento de la eficacia *in vivo* en comparación con células CAR-T similares elaboradas durante 6 días. Se inyectaron células RAJI-luciferasa ( $0,5 \times 10^6$ ) por vía intravenosa a ratones NSG (n = 5-7 por grupo) y luego el día 7 se les inyectó

el número indicado de células CAR-T UF-Kure19 o células CAR-T que expresan el mismo CAR elaborado durante 6 días.

**[0033]** La Figura 6 muestra que las citoquinas exógenas no son necesarias para un flujo de trabajo de la producción rápida de células T eficaz. A ratones NSG se les inyectaron células Raji-luciferasa y los productos CD19 CAR-T indicados o vehículo se inyectaron después de 7 días seguido por obtención de imágenes de bioluminiscencia en las fechas indicadas.

**[0034]** La Figura 7A muestra pruebas de qPCR de liberación con eliminación de fragmentos pequeños. Los datos representan los resultados de pruebas de qPCR basada en TaqMan de VSVG (lentivirus de replicación competente) con muestras de ADN que se prepararon a partir de células transducidas con CD19 CAR-T usando el flujo de trabajo de producción rápida y se cosecharon después de 20 horas. La preparación del ADN se realizó usando el protocolo que se describió precedentemente (usando el reactivo PacBio) para una eliminación de fragmentos pequeños. La prueba de PCR se efectuó usando muestras con y sin una eliminación de fragmentos pequeños.

**[0035]** La Figura 7B muestra datos que representan los resultados del número de copias del vector por célula transducida para células T transducidas con el vector lentiviral CD19 CAR y cultivadas durante 8 días a varios valores de MOI. La expresión de CD19 CAR se determinó mediante citometría de flujo usando un anticuerpo específico para CD19 CAR (AcroBiosystems) y el número de copias se determinó mediante qPCR para GAG y PTPB2. .

**[0036]** La Figura 7C muestra datos que representan el número de copias del vector por célula transducida y la expresión en superficie de CD19 CAR para células T producidas usando el flujo de trabajo de producción rápida usando un

MOI de 10:1 para el vector que se describe en la Figura 7B. El número de copias del vector por células transducidas se determinó mediante qPCR y citometría de flujo como se describió en la Figura 7B. El ADN de tamaño de fragmento pequeño se eliminó antes de la PCR usando el kit SRE (PacBio).

[0037] La Figura 7D muestra los resultados de una electroforesis en gel de ADN que demuestran que la eliminación de fragmentos pequeños no afecta significativamente la cantidad o la distribución de tamaños del ADN genómico. Se preparó ADN genómico de dos muestras diferentes de células T que fueron transducidas mediante lentivirus con el vector CD19 CAR y cosechadas después de 20 horas usando el kit DNeasy Blood and Tissue. La electroforesis en gel de agarosa se realizó ya sea directamente con las muestras de ADN genómico o se realizó después de efectuar una depleción de entrada baja usando el kit PacBio 10kb SRE. Calle 1: marcador de ADN; Calle 2: Muestra 1 de ADN genómico total; Calle 3: ADN genómico total después del procesamiento con el kit SRE Processing; Calle 4: Muestra 2 de ADN genómico total; Calle 5: Muestra 2 de ADN genómico total después del procesamiento con el kit SRE.

[0038] Aunque la divulgación sea susceptible de varias modificaciones y formas alternativas, las formas de realización específicas de las mismas se han mostrado a modo de ejemplo en las figuras y se describirán con detalle más adelante en la presente. Sin embargo, se comprenderá que la descripción de formas de realización específicas no pretende limitar la divulgación para abarcar todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que se encuentran dentro del espíritu y alcance de la divulgación definidos por las reivindicaciones adjuntas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0039]** En este documento se describen los detalles de una o más formas de realización del objeto divulgado en la presente. Las modificaciones de las formas de realización que se describen en este documento, y otras formas de realización, serán evidentes para los especialistas en la materia después de estudiar la información provista en este documento. La información provista en este documento, y en particular los detalles específicos de los ejemplos de las formas de realización descritas, se provee primariamente a fin de ofrecer una mayor claridad de comprensión y no se deben interpretar como limitaciones innecesarias de la misma. En caso de conflicto, prevalecerá la descripción de este documento, incluidas las definiciones.

**[0040]** Para abordar las deficiencias resumidas precedentemente y otras deficiencias en la metodología del estado de la técnica y con el fin de desarrollar un método de producción de células T ultrarrápido robusto, efectivo en cuanto al costo, simple y escalable (es decir, de 1 día o menos), los inventores desarrollaron métodos para producir células CAR-T sin el uso de esferas magnéticas o, en algunos casos, aún sin la necesidad de aislar las células T o de usar citoquinas. En este caso los inventores identificaron sorprendentemente un método que permite una eficacia de transducción elevada de células T (comenzando ya sea con PBMC mixtas, PBMC agotadas en monocitos o células T aisladas) usando una activación concurrente de células T y transducción viral sin necesidad de potenciadores (por ejemplo, polibreno, inoculación centrífuga, retronectina). Sorprendentemente, este proceso también se puede conducir en la ausencia de cualquier citoquina (por ejemplo, IL-2, IL-7 y/o IL-15) o en la presencia de citoquinas. Contrariamente a las sugerencias previas, se encontró que la eficiencia de la transducción de células T usando este método era tan alta

como la eficiencia de transducción utilizando la activación de células T más tradicional seguida por transducción viral 1-3 días después de la activación. Otra ventaja destacable del uso de PBMC como una fuente de partida en oposición a células T aisladas es la capacidad para utilizar una activación con CD3 sola sin el requerimiento de una coestimulación con CD28 debido a la presencia de otras células mononucleares que proporcionan señales estimulantes. Se sabe que cuando se realiza la activación de células T, la estimulación con CD3 sola sin necesidad de usar los reactivos de activación CD3/CD28, hay más conservación de las células T de memoria central deseables (9). Por ello, el flujo de trabajo de producción de células T desarrollado involucra un proceso altamente simplificado que puede reducir significativamente los costos y mejorar la eficiencia en comparación con los métodos informados con anterioridad.

*Desarrollo de un proceso de producción ultrarrápido que puede utilizar PBMC, PBMC agotadas en monocitos o células T aisladas como un producto de partida*

[0041] De acuerdo con los métodos divulgados en la presente, la producción puede tener lugar con o sin el requerimiento de un paso de preaislamiento de células T. Al no emplear un paso de preaislamiento de células T, el flujo de trabajo de producción se puede realizar más rápidamente y con un costo reducido y sorprendentemente también se obtiene un producto con un porcentaje más alto de células T naïve deseables. Si se usa una muestra de aféresis sanguínea o de sangre periférica sin un aislamiento directo de células T, las células T se pueden enriquecer por medio de depleción de monocitos por adherencia simple a una superficie sólida (por ejemplo, un frasco/placa o bolsa de cultivo tisular). La depleción de monocitos también se puede efectuar sobre una superficie adherente tal como sobre una placa o bolsa y también se puede

efectuar en un sistema cerrado. La depleción de monocitos es una manera simple, económica y rápida para purificar el producto parcialmente.

**[0042]** En otro aspecto, al evitar realizar un paso de aislamiento de células T, el producto final no solo puede incluir células T modificadas genéticamente sino también otros tipos celulares, tales como células NK, que pueden presentar propiedades terapéuticas beneficiosas.

**[0043]** De acuerdo con la presente divulgación, de manera simultánea las células T se activan usando en un aspecto un reactivo de activación libre de esferas y se transducen en la presencia de concentraciones bajas de IL-7 e IL-15 (por ejemplo, 5-10 ng/ml o menos), pero cabe destacar, en la ausencia de IL-2. La IL-2 es una citoquina conocida por dirigir la diferenciación de células T y se sabe que las células cultivadas en la presencia de IL-2 presentan una conservación reducida de su fenotipo naïve/no diferenciado. Esto es particularmente así cuando se utilizan dosis altas (por ejemplo, 300 UI/ml) (11–12).

**[0044]** En otro aspecto, sorprendentemente se ha encontrado que el flujo de trabajo que comprende de manera simultánea la activación y la transducción de células T es altamente eficiente en la presencia ya sea de IL-7 o IL-15 y no requiere ambas citoquinas. Por ello, el flujo de trabajo de producción se puede llevar a cabo con IL-7 sola o IL-15 sola.

**[0045]** En otro aspecto, sorprendentemente, el flujo de trabajo que comprende de manera simultánea la activación y transducción de células T es altamente eficiente en la ausencia completa de adición de citoquinas exógenas incluyendo IL-2, IL-7 o IL-15. Por ello, el flujo de trabajo de producción se puede llevar a cabo con la adición de cualquier citoquina exógena.

**[0046]** En otro aspecto, el producto de células T modificadas genéticamente se puede producir en menos de 24 horas, que preferiblemente incluye un tiempo de cultivo de 17-20 horas aproximadamente.

**[0047]** En este flujo de trabajo, no hay requerimiento alguno de un paso de preactivación antes de la transducción viral o el aislamiento de células T, y ambos ahorran tiempo y costos de producción críticos. No hay informes previos que la producción rápida de CAR-T se pueda realizar de manera eficiente usando una transducción y activación simultáneas de células mononucleares no purificadas (por ejemplo, PBMC) o PBMC agotadas en monocitos (en contraposición a las células T purificadas).

**[0048]** La activación de las células puede tener lugar usando varios reactivos que activan las células T a través de CD3 o CD3 y CD28 y que incluyen Transact (MiltenyiBiotec), el activador de células T Cloudz (Biotechne), un anticuerpo anti-CD3 soluble o unido a una superficie y/o anticuerpos anti-CD28 o microburbujas personalizadas conjugadas a anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD3/CD28. En particular, se ha encontrado que el activador de células T Cloudz permite una capacidad elevada e inesperada de simultáneamente activar y transducir mediante virus las células T en comparación con Transact. Además, el anticuerpo anti-CD3 soluble o unido a una superficie con o sin CD28 también funciona bien en el flujo de trabajo de menos de 1 día que se describe aquí.

**[0049]** La activación celular también puede tener lugar usando reactivos que activan las células T a través de CD3 y otras moléculas coestimulantes además de CD28 (o en adición de CD28) tales como OX40, CD2, CD27, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137).

**[0050]** Después de la activación y transducción de las células, las células

se pueden cosechar en menos de un día después de la transducción (por ejemplo, ~17-20 h) y se pueden usar directamente con fines terapéuticos o se pueden criopreservar para su uso posterior. Este método de producción conduce a células T que presentan una elevada eficacia terapéutica a pesar del hecho que la expresión del gen transducido en las células T no se expresa acabadamente cuando las células se cosechan así como infunden en el receptor.

**[0051]** Por ello, este método permite un protocolo de producción rápida para productos de terapias celulares que se puede realizar en menos de 1 día.

**[0052]** En otro componente de este enfoque, el proceso de producción de células T se puede realizar en un sistema completamente cerrado usando un proceso manual o automatizado. En otro componente, la producción puede tener lugar en un sistema completamente cerrado fuera de una sala limpia lo cual permite una producción en muchos centros sin una infraestructura especializada de salas limpias.

**[0053]** Otro componente de este enfoque es un método para eliminar falsos positivos de reactividad para las pruebas de liberación requeridas de productos para terapias celulares transducidas viralmente que tiene lugar con una producción rápida. El ADN del plásmido residual de la transfección de las células (por ejemplo, células 293 o 293T) para producir lentivirus o retrovirus está presente en los productos de terapia celular durante los primeros varios días de la producción. Este ADN del plásmido provee resultados falsos positivos para el número de copias del vector y en los ensayos de qPCR para las pruebas de virus de replicación competente. En este flujo de trabajo, la evaluación de la liberación está integrada en el flujo de trabajo y comprende un paso de separación por tamaño basado en una centrifugación diferencial para eliminar este ADN del

plásmido y permitir el uso clínico del producto de células T producido rápidamente que a menudo se requiere para la liberación del producto.

[0054] El objeto divulgado en la presente se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos específicos pero no taxativos. Los siguientes ejemplos pueden incluir compilaciones de datos que son representativos de los datos recolectados en varios tiempos durante el transcurso del desarrollo y la experimentación relacionados con la presente invención.

## **EJEMPLOS**

### **Desarrollo de un proceso de producción rápida de células T modificadas genéticamente**

[0055] Hasta la fecha los procesos de producción rápida de células T modificadas genéticamente basados en virus descritos previamente (por ejemplo, 1 día o menos) involucran un paso inicial de aislamiento de células T. Aquí hemos desarrollado un proceso de producción rápida que puede utilizar PBMC o PBMC agotadas en monocitos además de células T aisladas. Un paso inicial opcional, si se utilizarán PBMC como la fuente de partida, consiste en efectuar una depleción de monocitos ya que en algunos casos resulta deseable agotar parcialmente los monocitos del producto. Esta depleción permitirá, por ejemplo, infectar de manera preferencial los tipos celulares específicos que son más deseables para el producto final, inclusive células T y en algunos casos células NK. Sin embargo, la depleción no es completa, lo cual permitirá que los monocitos proporcionen señales estimulantes (por ejemplo, CD80/CD86) a las células T (por ejemplo, permitirá la activación de las células T usando una estimulación exógena con CD3 sola sin la necesidad de una coestimulación con CD28 exógena u otros estímulos). En general, el método de depleción que se

describirá a continuación conduce a una reducción de aproximadamente un 50% de los monocitos con respecto al producto sanguíneo de partida que comienza a las 2 horas después del plaqueado como se puede observar en la Figura 1. Una duración adicional de la incubación después de 2 horas no afectó significativamente la depleción usando este enfoque. Además, la densidad celular a la cual las células fueron plaqueadas ( $5 \times 10^6$  células/ml y  $2 \times 10^6$  células/ml) demuestra resultados equivalentes. La depleción muestra resultados similares utilizando placas o frascos de cultivo tisular o un sistema cerrado usando bolsas tales como las bolsas VueLife® de la Serie "AC" producidas por Saint Gobain (París, Francia).

**[0056] Tabla 1. Depleción de monocitos de las PBMC.**

|                                     | <b>1 h</b> | <b>2 h</b> | <b>3 h</b> | <b>4 h</b> |
|-------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Concentración de células plaqueadas | % de MO    | % de MO    | % de MO    | % de MO    |
| 2 x 10 <sup>6</sup> /ml             | 21,46      | 13,77      | 14,86      | 14,95      |
| 5 x 10 <sup>6</sup> /ml             | 20,87      | 11,25      | 10,97      | 11,09      |

**[0057]** Las células mononucleares de una muestra de aféresis de sangre periférica se incubaron en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos en una incubadora de cultivo tisular a 37 grados Celsius por los puntos de tiempo indicados. El porcentaje de monocitos se determinó en las células no adheridas en los siguientes puntos de tiempo usando un analizador de hematología (Hemavet®, Drew Scientific, Miami Lakes, Florida). La población de partida consistió en un porcentaje de monocitos de partida del 25,02%. % de MO = porcentaje de monocitos.

**[0058]** Si se usarán células T aisladas entonces se pueden aislar directamente de sangre completa, una muestra de aféresis u otra fuente de células T. Las células T se pueden aislar usando cualquier método disponible.

Por ejemplo se puede utilizar un enfoque de esferas magnéticas tales como esferas magnéticas CD3, CD4 o CD8 (por ejemplo, las microesferas de Miltenyi Biotec o Dynabeads® de ThermoFisher Scientific). Las células T también se pueden aislar de manera eficiente y rápida usando microburbujas CD3, CD3/CD28 o microburbujas conjugadas con CD3 y cualquier otro ligando coestimulante de células T. En particular, las microburbujas, en particular las microburbujas de lípidos proporcionan un método de aislamiento rápido y eficiente y de manera simultánea también proveen una señal de activación.

**[0059]** La activación de las células T se puede lograr utilizando múltiples enfoques. Si se utilizan PBMC o monocitos PBMC, se prefiere un reactivo de activación soluble o unido a una superficie (por ejemplo, una placa/bolsa) para el flujo de trabajo de producción rápida antes que los enfoques basados en esferas magnéticas. Un enfoque de activación eficaz consiste en usar microesferas disolubles CD3/CD28 (reactivo de activación de células T humanas Cloudz® de Biotechne/R&D Systems (Minneapolis, Minnesota)). Este reactivo consiste en un copolímero de alginato que se disuelve en unos pocos minutos y por ello no requiere esferas magnéticas y no conduce a una contaminación del producto. También se pueden utilizar reactivos de activación alternativos tal como el activador CD3/CD28 Immunocult® (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Otros agentes de activación alternativos que se pueden utilizar incluyen esferas magnéticas CD3 o CD3/CD28 (por ejemplo, Dynabeads® de ThermoFisher Scientific) o TransAct® (Miltenyi Biotec). Los agentes basados en esferas magnéticas y el agente TransAct® no se consideran óptimos ya que el uso de las esferas magnéticas requieren más mano de obra y un paso de eliminación que es difícil debido a las esferas fuertemente unidas en los puntos

de tiempo tempranos. Esto puede conducir a una pérdida excesiva de células. También se ha informado que el reactivo de activación TransAct® es un reactivo de activación “más suave y más lento” en comparación con los otros productos lo cual conduce a una ventana óptima de transducción viral en puntos de tiempo posteriores. Además se ha informado que TransAct® requiere 1-2 días para activar las células T antes de la transducción viral con el fin de permitir una transducción viral óptima. Además, se informa que si TransAct® se lava antes del transcurso de 2-3 días después de su adición puede obstaculizar la proliferación de células T ([miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0017348.PDF](https://miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0017348.PDF)). Por ello, TransAct® no es el reactivo de activación preferido para un protocolo de producción que comprende de manera simultánea la activación/transducción y cosecha del producto en menos de un día.

**[0060]** Además de los reactivos de activación asociados a una matriz, un anticuerpo anti-CD3 soluble o recubierto sobre una superficie (por ejemplo, un anticuerpo OKT3 u otros anticuerpos anti-CD3) ya sea solo o en combinación con un anticuerpo anti-CD28 soluble u otros estímulos coestimulantes de células T constituyen otra estrategia de activación eficaz que es completamente compatible con el flujo de trabajo de producción rápida descrito. En particular, este enfoque se beneficia del enfoque basado en PBMC que permite una activación de las células T sin necesidad de una CD28 exógena u otros agentes para una coestimulación. Además, este método de usar un anticuerpo anti-CD3 tal como OKT3 conduce a costos significativamente reducidos en comparación con otros estímulos de activación y minimiza los riesgos presentes con los andamiajes (por ejemplo, alginato, esferas magnéticas, etc) presentes en el producto elaborado que pueden tener efectos secundarios desconocidos en los

pacientes.

**[0061]** Se ha encontrado que los reactivos de activación específicos de células T funcionan de manera más eficiente usando el flujo de trabajo de producción rápida de menos de 1 día que se describe aquí. Con el fin de comparar los reactivos de activación específicos de células T, se plaquearon PBMC agotadas en monocitos (200.000 células en 100 µl) en una placa de 96 pocillos en 3% de reemplazo de suero de células inmunológicas CTS® (ThermoFisher Scientific) en medio TexMACs® (Miltenyi Biotec) que contiene IL-7 (10 ng/ml) e IL-15 (5 ng/ml). Se agregaron un vector lentiviral-GFP y el reactivo de activación indicado (usando las concentraciones sugeridas por el proveedor) y las células se cultivaron durante 4 días. Las células se lavaron y se cambió el medio después de 20 h para eliminar los virus libres y el reactivo de activación libre. En el caso de las células que contienen el reactivo Cloudz®, se utilizó la solución amortiguadora de disolución para eliminar adicionalmente el reactivo de activación. La expresión de GFP se midió mediante citometría de flujo. Como se observa en la Figura 2A, el reactivo de activación de células T humanas Cloudz® fue más efectivo en comparación con TransAct® y CTS CD3/CD28 Dynabeads® en la maximización de la eficiencia de transducción usando el flujo de trabajo de producción rápida. Cabe destacar que en la mayoría de las figuras, la cantidad de vector viral empleada se mantuvo baja para facilitar las diferencias entre las condiciones en lugar de usar un exceso de virus para maximizar la eficiencia de la transducción. En la Figura 2, se puede observar la capacidad del flujo de trabajo de producción rápida para obtener eficiencias de transducción altas usando niveles altos del vector lentiviral (si bien manteniendo un número de copias del vector por célula transducida menor que 5). Como también se muestra

en la Figura 2B, el flujo de trabajo de producción rápida también funciona con anticuerpos anti-CD3 soluble y/o anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 solubles (Figura 2C). Por ejemplo, es posible el uso del anticuerpo anti-CD3 ampliamente utilizado, OKT3, con este flujo de trabajo (Figura 2C). Al usar el proceso de producción con PBMC agotadas en monocitos, el uso de CD3 sola en comparación con suplementos de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 funciona de manera similar en términos de la eficiencia de transducción. Cabe destacar que la estimulación con el anticuerpo anti-CD3, OKT3, funcionó de manera más eficiente que Immunocult® en términos de la eficiencia de transducción en este flujo de trabajo de producción (Figura 2C). Al usar el flujo de trabajo de producción rápida, tanto el anticuerpo anti-CD3 unido a una superficie (por ejemplo, una placa o frasco) como el anticuerpo anti-CD3 soluble conducen a una activación similar de células T CD4 y CD8 medida mediante la expresión de CD69 al cosechar el producto (20 horas después de iniciar el cultivo). Cabe destacar que se observó que Transact® condujo a un nivel reducido de aumento de la expresión de CD69 en células T CD4 en comparación con los grupos tratados con CD3 soluble/unida a una superficie. Este hallazgo muestra que se puede usar tanto la CD3 soluble o la CD3 unida al recipiente de cultivo de manera eficiente para la activación de células T usando el flujo de trabajo rápido. Además, estos reactivos de activación parecen ser superiores a otros agentes, tal como TransAct®.

[0062] En general se ha asumido en este campo que se necesita una activación secuencial seguida por transducción viral de células T para maximizar la eficiencia de la transducción viral. Sin embargo, aquí los resultados demuestran que por lo menos con el uso del flujo de trabajo de producción

específico de la presente, la activación y transducción viral simultáneas de células T conduce esencialmente a eficiencias de transducción equivalentes al método secuencial. Por ejemplo, se activaron PBMC agotadas en monocitos usando el reactivo de activación de células T Cloudz® y se transdujeron con el vector lentiviral CD19-receptor de antígeno quimérico (CAR) al mismo tiempo que la adición de Cloudz® o bien, 24 h después usando el proceso de producción que se describe en la sección *Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida*. Como se puede observar en la Figura 2, no hay una diferencia significativa entre la expresión de CAR con una transducción viral simultánea o secuencial usando el flujo de trabajo de producción descrito.

**[0063]** Ambos enfoques tradicional y de producción rápida de células T informados previamente emplean condiciones de cultivo que de manera casi universal emplean citoquinas, tales como IL-2, IL-15 y/o IL-7. Para evaluar la citoquina óptima a utilizar en el flujo de trabajo de producción rápida, se empleó el proceso de producción que se describe en la sección *Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida* usando IL-2 (300 u/ml), IL-15 (5 ng/ml), IL-7 (10 ng/ml), una combinación de IL-15 e IL-7 o una ausencia completa de una citoquina exógena (Figura 4). No se encontró ninguna diferencia en la eficiencia de transducción observada cuando se compara la expresión de CD19 CAR en células T a las 72 horas después de la transducción entre los diferentes grupos de citoquinas. Sorprendentemente, tampoco se observó ninguna diferencia en la eficiencia de transducción en la ausencia completa de citoquinas. Por consiguiente, es posible simplificar aún más el proceso de producción para aplicarlo en la ausencia de cualquier citoquina exógena y así reducir aún más los costos y prevenir los efectos estimulantes sobre las células T que pueden

conducir a una diferenciación/activación indeseables. Como se observa en la Figura 1B, la producción rápida de células T también fue casi tan eficiente para conducir a la transducción con GFP de células T cuando se comparó la producción realizada con y sin citoquinas.

[0064] Otro atributo clave del proceso de producción es la duración del cultivo. Dado que un objetivo del flujo de trabajo de producción consiste en limitar su duración para preservar la fracción de células T naïve, se comparó el proceso de producción utilizando una duración de cultivo de 6 horas y 17 horas. Al final de estos puntos de tiempo, se eliminó el reactivo Cloudz® usando la solución amortiguadora de disolución, las células se lavaron para eliminar el virus y se suspendieron en medio fresco sin virus o reactivo de activación por un total de 72 horas de cultivo con el fin de medir la expresión de CAR. Como se observa en la Figura 4, una duración de cultivo de 6 horas del vector lentiviral y el reactivo de activación de células T fueron insuficientes para conducir a una expresión significativa de CD19 CAR medida a los 3 días mediante citometría de flujo. Las duraciones intermedias mayores que horas y menores de aproximadamente 15 horas no se consideran preferidas debido a limitaciones de poder realizar la producción durante las horas típicas de un día laboral.

[0065] Dado que la plataforma de producción puede utilizar PBMC o PBMC agotadas en monocitos como fuente de partida y el producto se cultiva por menos de un día, el producto final consistirá en células mononucleares adicionales además de las células T. Para evaluar la composición del producto, se condujeron 3 corridas de producción usando el método que se describe en la sección *Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida*. Como se observa en la Tabla 2, las células T constituyen la fracción más grande del

producto, pero el producto también contiene cantidades menores de células B, células NK y monocitos. Ya que un método preferido del flujo de trabajo involucra la producción de un producto criopreservado, esta prueba se realizó después de descongelar el producto. Como los granulocitos representan un componente pequeño del producto de aféresis de partida y también son muy susceptibles al congelamiento/descongelamiento, prácticamente no se detectaron granulocitos en el producto.

**[0066] Tabla 2. Composición del producto de 3 corridas de producción con el producto UF-KURE19 descongelado (17 h de producción).**

|                        | <b>Producto 1</b> | <b>Producto 2</b> | <b>Producto 3</b> |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| % de viabilidad        | 88                | 94                | 90                |
| % de células T (CD3)   | 78                | 82                | 78                |
| % de células T CD4     | 53                | 45                | 56                |
| % de células T CD8     | 47                | 55                | 44                |
| % de células B (CD19)  | 7                 | 5                 | 5                 |
| % de células NK (CD56) | 11                | 6                 | 8                 |
| % de monocitos (CD14)  | 6                 | 3                 | 7                 |

**[0067]** La composición del producto se determinó usando citometría de flujo con los anticuerpos anti CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 y CD14, así como 7-AAD para evaluar la viabilidad.

**[0068]** Dado que la expresión significativa de proteínas, tales como CAR, después de una transducción lentiviral no tiene lugar dentro de las 17-20 horas posteriores en las células T, con el fin de evaluar la actividad de un producto CD19 CAR-T transducido *in vitro*, los inventores produjeron células CD19 CAR-

T a partir de PBMC agotadas en monocitos usando el flujo de trabajo de producción que se describe en la sección *Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida*. Después de 20 h de activación/transducción, las células se lavaron para eliminar el virus y se eliminó asimismo el reactivo de activación de células T Cloudz®. Luego las células se cultivaron por un período de cultivo total de 3 días y luego fueron evaluadas por su actividad citotóxica contra las células de linfoma humano RAJI diana y se midió la expresión de CAR en la superficie. Como se observa en la Tabla 3, las células CAR-T de la producción rápida pudieron lisar eficazmente las células tumorales RAJI.

**[0069] Tabla 3. Resultados de la evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de las células CD19 CAR-T de la producción rápida después de 3 días de cultivo.**

|                                                         | Producto 1 | Producto 2 | Producto 3 |
|---------------------------------------------------------|------------|------------|------------|
| % de expresión de CAR sobre células T                   | 50         | 44         | 53         |
| % de lisis de células RAJI (relación 5:1 de CAR-T/RAJI) | 51         | 56         | 56         |

**[0070]** Las PBMC agotadas en monocitos se transdujeron con el vector lentiviral CD19 CAR y las células T se activaron con el reactivo de activación de células T Cloudz® como se describe en la sección *Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida*. Se eliminaron los virus libres y el reactivo de activación de células T se disolvió después de 20 h y el cultivo de las células continuó durante 3 días. Se evaluó la actividad citotóxica de las células CD19 CAR-T contra células tumorales RAJI mediante medición de la pérdida del colorante calceína-AM de las células tumorales después de un cocultivo de 4 horas con células CAR-T mediante citometría de flujo. La expresión de CD19 CAR se midió mediante citometría de flujo usando un anticuerpo anti-FMC63

específico (AcroBiosystems).

[0071] Debido a que la proteína CD19 CAR no se expresa significativamente sobre la superficie de las células T usando métodos de citometría de flujo estándar cuando el producto se cosecha a las 17-20 horas de cultivo, también se evaluó la actividad de las células T en modelos de ratón para demostrar la eficacia del producto. De esta manera, la expresión completa del CAR tiene lugar *in vivo* y subsiguientemente permite que las células T logren su actividad citotóxica contra células que expresan el CD19 humano. Para demostrar la eficacia mejorada del producto de CAR-T de la producción rápida, este estudio *in vivo* empleó células criopreservadas que se produjeron por 17 horas comenzando con PBMC agotadas en monocitos y transducidas con el vector lentiviral CD19 CAR de acuerdo con el flujo de trabajo que se describe en la sección *Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida*. Este producto que expresa CD19 CAR se denominó células UF-KURE19. Las células que se produjeron usando el mismo flujo de trabajo pero que se mantuvieron en cultivo durante 6 días en lugar de 17 horas se denominaron Kure19. Las células fueron evaluadas en un modelo de circulación de ratón del linfoma humano que comprende la inyección por vía intravenosa de las células tumorales RAJI humanas en ratones inmunodeficientes (NSG) seguido por una inyección intravenosa de una sola dosis del producto CAR-T 7 días después de la inyección de las células tumorales. Aunque tradicionalmente se utilizan ~ 5 millones de células CAR T en este modelo para demostrar una eficacia significativa, se utilizaron dosis más bajas debido al aumento esperado de la potencia del producto de la producción rápida. En este caso, para el producto UF-Kure19, se utilizaron dosis de 2 y 4 millones de células CAR T positivas para las cohortes

de UF-KURE19 y 2 millones de células CAR T positivas para el producto elaborado en 6 días. Como se puede observar en la Figura 5, las células UF-KURE19 muestran una eficacia marcada tanto al nivel de dosis baja como alta. Por el contrario, en tanto el producto cultivado por 6 días demuestra un progreso reducido del tumor en comparación con los ratones tratados con vehículo, la eficacia se reduce marcadamente cuando se compara con el producto UF-KURE19. De manera similar a los estudios en ratón que emplean Kure19, los grupos que fueron inyectados con UF-KURE19 toleraron bien la terapia (monitoreado por el cambio de peso, alimentación, aspecto y conducta) sin signos evidentes de toxicidad.

**[0072]** Se ha encontrado que las células CD19 CAR-T persisten (medido mediante detección del transgen) durante meses y aún hasta años. Por ejemplo, se ha encontrado que el producto Tisa-cel persiste durante por lo menos 2 años en algunos pacientes que habían presentado resultados clínicos favorables (10). La proliferación de células T humanas en la sangre de ratones NSG portadores del tumor de linfoma RAJI se midió mediante citometría de flujo. En la Tabla 4, se muestra el número promedio de células T humanas detectado por microlitro de sangre periférica de ratón en los puntos de tiempo indicados después de la inyección de células tumorales RAJI (0,5 millones, i.v.) en ratones NSG hembras (mediciones efectuadas con n = 3-5 ratones por punto de tiempo). Cabe notar que las muestras de sangre para estas mediciones derivaron del estudio de eficacia en ratón que se mostró precedentemente. Como se muestra en la Tabla 4, la eficacia de las células UF-KURE19 es significativamente mayor que la de las células CAR-T KURE19 producidas en 6 días, lo cual se correlaciona con la expansión de las células T humanas.

**[0073] Tabla 4. Células T detectadas mediante citometría de flujo por microlitro de sangre de ratón**

|               | <b>4 x 10<sup>6</sup> células UF-Kure19</b> | <b>2 x 10<sup>6</sup> células UF-Kure19</b> | <b>2 x 10<sup>6</sup> células CAR-T de 6 días</b> |
|---------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Día 32</b> | 126,7                                       | 60,1                                        | 2,7                                               |
| <b>Día 39</b> | 410,1                                       | ND                                          | 7,3                                               |
| <b>Día 46</b> | 969,1                                       | 995,6                                       | 14,9                                              |

ND = No determinado

**[0074]** Como se describió precedentemente, el uso de citoquinas durante el flujo de trabajo de producción rápida no fue necesario para lograr una eficiencia de transducción significativa. Por ello, se evaluó el impacto del uso de citoquinas sobre el estado de memoria/diferenciación de las células T en el momento de la cosecha (20 horas) mediante citometría de flujo. Además, este estudio empleó el uso de diferentes citoquinas en el proceso de producción como se indica en la Tabla 5 o la ausencia de citoquinas para evaluar mejor el impacto de las citoquinas sobre el producto. Finalmente, en este estudio también se compararon PBMC agotadas en monocitos y el uso de células T aisladas como la fuente de partida. Se utilizó el flujo de trabajo de la producción que se describe en la sección *Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida* excepto que se usaron células T purificadas como la fuente de partida para un subconjunto de las muestras. Las células T se purificaron a partir de sangre periférica usando el kit de enriquecimiento de células T humanas RosetteSep® (StemCell Technologies). Como se observa en la Tabla 5, en el caso de células T CD8+ cuando se compara un producto que se produjo comenzando con células T aisladas con un producto elaborado con PBMC agotadas en monocitos, se observa que el componente de células T CD8+ del producto no es idéntico. En particular, cuando se comienza con PBMC hay un nivel ligeramente más bajo

de células T efectoras de memoria y un porcentaje ligeramente mayor de células TEMRA. El rol de las células TEMRA CD8+ no está completamente dilucidado, pero se cree que confieren una mayor actividad citotóxica que puede ser beneficiosa. El nivel de las células T naïve altamente beneficiosas que se sabe que se correlaciona con la eficacia de CAR-T es similar al comienzo con PBMC o células T aisladas en el compartimento de células T CD8+; sin embargo, hay un porcentaje más alto de las células T de memoria central beneficiosas en las PBMC en comparación con las células T aisladas y un nivel más bajo de las células efectoras de memoria más diferenciadas y menos deseables. En el compartimento de células T CD4+, hay un aumento en el porcentaje de células T naïve altamente beneficiosas con las PBMC en comparación con las células T aisladas. Por consiguiente, en base a la determinación del fenotipo del producto, se observa que si se comienza el flujo de trabajo usando PBMC se obtiene un flujo de trabajo más preferido y que se puede predecir que conducirá a resultados clínicos mejorados y una mayor persistencia de células CAR-T *in vivo*. Además, en este estudio también se investigó el uso de diferentes citoquinas (IL2, IL7, IL-15) o la ausencia de citoquinas durante la producción. Como se observa en la Tabla 5, no se observaron diferencias significativas durante el flujo de trabajo de 20 horas en cualquiera de las condiciones en términos del fenotipo de célula T de memoria/diferenciación cuando se comienza con PBMC, lo cual también sugiere que sorprendentemente las citoquinas no constituyen un componente necesario para este flujo de trabajo de producción cuando se comienza con PBMC agotadas en monocitos. Notablemente, cuando se comienza con células T aisladas hubo una reducción en las células T naïve observada cuando no se emplearon citoquinas lo cual sugiere que el uso de citoquinas puede ser más

importante para la producción cuando se emplean células T aisladas como la fuente de partida. Es posible que las PBMC proporcionen una fuente endógena de citoquinas.

[0075] **Tabla 5. Fenotipo de células T producidas usando el flujo de trabajo rápido.**

**Células T CD8+**

| <b>Células T</b> |                   |                  |                  |                  |                  |
|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                  |                   | <b>TEMRA</b>     | <b>Naïve</b>     | <b>CM</b>        | <b>EM</b>        |
| Activación       | Citoquina         | CCR7-<br>CD45RA+ | CCR7+CD4<br>5RA+ | CCR7+CD<br>45RA- | CCR7-<br>CD45RA- |
| No               | No                | 4,79             | 63               | 6,01             | 26,2             |
| Sí               | No                | 5,87             | 58,9             | 8,53             | 26,7             |
| Sí               | IL2 (300<br>u/ml) | 6,75             | 65,7             | 5,81             | 21,7             |
| Sí               | IL7 (10<br>ng/ml) | 6,73             | 62,1             | 6,6              | 24,6             |
| Sí               | IL15 (5<br>ng/ml) | 5,02             | 66,1             | 6,13             | 22,8             |
| Sí               | IL7 + IL15        | 5,62             | 65,4             | 6,86             | 22,2             |
|                  |                   |                  |                  |                  |                  |
| <b>PBMC</b>      |                   |                  |                  |                  |                  |
|                  |                   | <b>TEMRA</b>     | <b>naïve</b>     | <b>CM</b>        | <b>EM</b>        |
| Activación       | Citoquina         | CCR7-<br>CD45RA+ | CCR7+CD4<br>5RA+ | CCR7+CD<br>45RA- | CCR7-<br>CD45RA- |
| No               | No                | 3,3              | 66,8             | 8,2              | 21,8             |
| Sí               | No                | 10,4             | 64,8             | 10,1             | 14,8             |
| Sí               | IL2 (300<br>u/ml) | 10               | 64,7             | 12               | 13,3             |
| Sí               | IL15 (5<br>ng/ml) | 8,2              | 66,3             | 11,6             | 13,9             |
| Sí               | IL7 + IL15        | 5,6              | 68,4             | 11,8             | 14,2             |

**Células T CD4+**

| <b>Células T</b> |           |                  |                  |                  |                  |
|------------------|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                  |           | <b>TEMRA</b>     | <b>naïve</b>     | <b>CM</b>        | <b>EM</b>        |
| Activación       | Citoquina | CCR7-<br>CD45RA+ | CCR7+CD45<br>RA+ | CCR7+C<br>D45RA- | CCR7-<br>CD45RA- |
| No               | No        | 4,1              | 66,1             | 18,1             | 11,6             |

|                   |                  |                     |                     |                     |                     |
|-------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Sí                | No               | 3,5                 | 63,6                | 23,2                | 9,7                 |
| Sí                | IL2 (300 u/ml)   | 4,1                 | 70,3                | 18,3                | 7,3                 |
| Sí                | IL7 (10 ng/ml)   | 3,3                 | 68,0                | 20,4                | 8,3                 |
| Sí                | IL15 (5 ng/ml)   | 1,9                 | 70,1                | 21,2                | 6,8                 |
| Sí                | IL7 + IL15       | 2,4                 | 70,2                | 20,6                | 6,8                 |
|                   |                  |                     |                     |                     |                     |
|                   |                  |                     |                     |                     |                     |
| <b>PBMC</b>       |                  |                     |                     |                     |                     |
|                   |                  | <b>TEMRA</b>        | <b>naïve</b>        | <b>CM</b>           | <b>EM</b>           |
| <b>Activación</b> | <b>Citoquina</b> | <b>CCR7-CD45RA+</b> | <b>CCR7+CD45RA+</b> | <b>CCR7+CD45RA-</b> | <b>CCR7-CD45RA-</b> |
| No                | No               | 2,0                 | 74,4                | 15,9                | 7,8                 |
| Sí                | No               | 5,4                 | 77,0                | 13,8                | 3,8                 |
| Sí                | IL2 (300 u/ml)   | 4,7                 | 79,7                | 12,4                | 3,2                 |
| Sí                | IL15 (5 ng/ml)   | 3,8                 | 78,7                | 14,3                | 3,2                 |
| Sí                | IL7 + IL15       | 2,7                 | 82,0                | 12,3                | 3,1                 |

[0076] Las células T se produjeron usando el flujo de trabajo rápido que se describe en la sección *Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida* o usando un flujo de trabajo idéntico excepto que se usaron células T aisladas como la fuente de células de partida. Después de 20 horas las células fueron evaluadas por el fenotipo de las células T mediante citometría de flujo.

[0077] Dado que los estudios *in vitro* demostraron que las citoquinas no parecen ser necesarias para transducir eficazmente las células T o para mantener un fenotipo preferido de células T de memoria/diferenciación usando el proceso de producción rápida cuando se comienza con PBMC, luego se condujeron estudios de eficacia en ratón *in vivo* para confirmar estos hallazgos. Las células CD19 CAR-T se produjeron usando el flujo de trabajo de producción rápida que comienza con PBMC agotadas en monocitos usando ya sea IL-7 (10 ng/ml) e IL-15 (5 ng/ml) o ninguna citoquina durante el cultivo. Se empleó el

mismo modelo de tumor de linfoma humano (RAJI) en ratones NSG que se describió precedentemente. En este caso, se inyectaron  $1,2 \times 10^6$  células CD19 CAR T positivas por ratón 7 días después de la inyección de las células tumorales. Como se observa en la Figura 6, el producto de CAR-T producido en ausencia completa de citoquinas exógenas permitió controlar eficazmente el progreso del tumor de una manera similar al producto elaborado con citoquinas. Todos los ratones con control de vehículo habían muerto debido al progreso de la enfermedad antes de la obtención de imágenes realizada el día 45. Notablemente, la dosis baja de  $1,2 \times 10^6$  células CD19 CAR T positivas mostró una eficacia alta como se muestra en la Figura 6A lo cual demuestra adicionalmente la potencia del producto de CAR-T rápido. Este estudio también demuestra claramente que no es necesaria una citoquina exógena para crear un producto de CAR-T con la producción rápida (menos de 1 día) comenzando a partir de PBMC.

[0078] Además de una eficacia similar, no hubo una disminución de las células T humanas en circulación en los ratones cuando se utilizaba el producto libre de citoquinas. Las células T humanas se cuantificaron en la sangre de ratón del experimento que se muestra en la Figura 6 el día 41 después de la inyección de células tumorales usando un anticuerpo anti-CD3 humano específico y análisis de citometría de flujo. Grupo CAR-T sin citoquinas: 4495 células T humanas por microlitro de sangre de ratón. Grupo de CAR-T IL7/IL15: 1618 células T humanas por microlitro de sangre de ratón.

*Ejemplo detallado del flujo de trabajo de la producción rápida.*

[0079] Las modificaciones representativas seleccionadas de este flujo de trabajo se muestran entre paréntesis. Además de este flujo de trabajo

relativamente manual que se muestra a continuación, todo el flujo de trabajo se puede realizar de una manera totalmente cerrada y/o semiautomatizada o automatizada. Por ejemplo, el lavado, la cosecha de células, etc. se pueden realizar usando un equipo automatizado.

Proceso de elaboración para producir un producto de CAR-T en menos de 1 día comenzando con PBMC agotadas en monocitos:

A. Obtención de las células de partida (día -1 o 0)

Se obtuvieron células mononucleares autólogas de sangre periférica de pacientes usando leucoféresis (o una extracción de sangre periférica). Los productos celulares se procesaron de manera inmediata o se mantuvieron durante la noche. (Si se desea, el producto celular también se puede criopreservar y procesar en un momento posterior).

B. Procesamiento de la muestra de aféresis (día 0)

La muestra de aféresis se lavó mediante centrifugación para eliminar el plasma y reducir el número de plaquetas contaminantes. (Si se usó una extracción de sangre periférica en lugar de una muestra de aféresis entonces las PBMC se aislaron, tal como mediante un método de aislamiento basado en Ficoll). A continuación, la muestra de aféresis se diluyó en medio de cultivo tal como TexMACS (Miltenyi Biotec) suplementado con reemplazo de suero de células inmunológicas CTS (ThermoFisher Scientific), se incubó en uno o más frascos de cultivo tisular o bolsas de cultivo celular y se colocó en una incubadora de cultivo a 37 °C ( $\pm$  2 °C) para adherir los monocitos a una concentración de hasta 5 millones de células por ml. Después de la adherencia de los monocitos a los frascos o las bolsas durante por lo menos 2 horas, las células no adheridas fueron transferidas a frascos o bolsas de cultivo tisular nuevos. El volumen se

ajustó en 2 millones de células por ml con medio de cultivo que contiene IL7 (10 ng/ml) e IL15 (5 ng/ml). (El medio de cultivo también se puede preparar sin la adición de ninguna citoquina exógena o con IL-7 sola, IL15 sola u otras citoquinas).

C. Activación de las células T (Día 0)

Se puede agregar el reactivo de activación de células T CD3/CD28 Cloudz® (R&D Systems/Biotechne) a frascos que contienen el producto de aféresis agotado en monocitos y procesado. (Se pueden usar otros reactivos de activación que incluyen un anticuerpo anti-CD3 soluble, un anticuerpo anti-CD3/CD28 soluble, un anticuerpo anti-CD3 unido a una superficie con o sin un anticuerpo anti-CD28 soluble, Immunocult® (Stemcell Technologies) o cualquier otro reactivo de activación de células T).

D. Transducción de las células (Día 0)

Se agregó un vector viral a los frascos o bolsas que contienen las PBMC agotadas en monocitos inmediatamente después de la adición del reactivo de activación de células T usando una multiplicidad de infección (MOI) determinada que conducirá a un número de copias por células de menos de 5. Las células se incubaron en una incubadora con 5% ( $\pm 0,5\%$ ) de CO<sub>2</sub> a 37 °C ( $\pm 2$  °C) durante 17-20 h.

E. Cosecha de las células (Día 1)

Se agregó solución amortiguadora de liberación grado GMP 6X (R&D Systems/Biotechne) directamente a los frascos o bolsas que contienen a las células activadas/transducidas si las células se habían activado usando el reactivo Cloudz®. A continuación, las células se lavaron y se resuspendieron en solución amortiguadora de congelamiento, tal como Plasmalyte-A, 5% de HSA y

5% de DMSO en criobolsas o viales.

*Descripción del método que permite realizar pruebas del número de copias del vector y de liberación de virus de replicación competente con un producto rápido de células T modificadas genéticamente:*

**[0080]** Dado que un obstáculo clave en el campo de flujos de trabajo de la producción rápida de células T que involucra vectores virales consiste en realizar pruebas de liberación del producto requerido, se desarrolló el método que se describe a continuación. Los requerimientos actuales de las pruebas de liberación requeridas para los productos de terapia de células transducidas retrovirales o lentivirales incluyen evaluar el lentivirus de replicación competente y el número de copias del vector. Estos dos ensayos proporcionan resultados falso positivos significativos cuando aún hay un nivel bajo de contaminación con el plásmido libre al utilizar los ensayos basados en qPCR tradicionales. El plásmido libre residual de transfecciones de células 293 está presente en el vector viral. En los puntos de tiempo tempranos durante la producción después de la transducción viral, hay plásmidos residuales remanentes del vector y es casi imposible eliminar los resultados falsos positivos usando las metodologías de prueba tradicionales. Esta reactividad falsa positiva ha constituido un obstáculo importante y limita la capacidad de producir de manera rápida productos que se puedan usar en los pacientes.

**[0081]** Dado que el ADN de interés tanto para la integración viral como para el vector de replicación competente es un ADN viral que está integrado, el flujo de trabajo de producción incluido aquí está acoplado con un método para eliminar el ADN del plásmido residual libre de modo que las reacciones de PCR u otras pruebas moleculares se pueden realizar tanto para el número de copias

del vector como para el lentivirus de replicación competente sin esta reacción de falsos positivos. En particular, el ADN del plásmido libre es mucho más pequeño que el ADN genómico. Se usa un método basado en centrifugación para eliminar el ADN pequeño conservando al mismo tiempo el ADN genómico más grande. Cuando se usa este método no hay una reactividad de falsos positivos por el ADN del plásmido, lo cual permite superar el importante obstáculo para una producción rápida de CAR-T siendo aún factible medir el ADN integrado en el genoma.

**[0082]** Con el fin de eliminar el ADN del plásmido libre en los productos de CAR-T que han sido expandidos por períodos cortos (por ejemplo, 0-3 días), se puede eliminar el ADN de tamaño pequeño (por ejemplo, de menos de 10 kb) en tanto se mantiene el ADN genómico usando centrifugación (por ejemplo, usando soluciones tales como soluciones de sales/polímeros para precipitar preferencialmente el ADN de alto peso molecular). Por ejemplo, se puede usar el kit eliminador de lecturas cortas PacBio Short Read Eliminator (PacBio; Menlo Park, California) que permite esta separación en un solo paso de centrifugación ([circulomics.com/store/Short-Read-Eliminator-Kit-p131401036](https://www.circulomics.com/store/Short-Read-Eliminator-Kit-p131401036)). Además de este reactivo comercial, un método alternativo consiste en utilizar 4% de PVP 360,000, KCl 1,2 M, Tris-HCl 20 mM, a pH 8, en el protocolo que se describirá más abajo en lugar de la solución amortiguadora SRE comercial ya que previamente ha demostrado eliminar eficazmente los fragmentos de tamaño pequeño (por ejemplo, < 10 kb del ADN total) (11). Luego se puede usar directamente el ADN purificado en los ensayos de evaluación (por ejemplo, en ensayos de qPCR). Aunque este kit no fue diseñado para esta indicación en particular, funciona bien y provee un enfoque simple, efectivo en cuanto al costo

y rápido.

**[0083]** Un ejemplo de cómo se puede emplear este método comprende aislar inicialmente el ADN total usando cualquier kit de aislamiento de ADN total comercial que permita aislar ADN genómico humano (por ejemplo, el kit DNeasy Blood and Tissue, Qiagen, Hilden, Alemania). A continuación, se puede utilizar el siguiente método, o un enfoque similar, para eliminar el ADN de fragmentos pequeños.

1. Usando una punta de pipeta de diámetro ancho, se agregó solución amortiguadora SRE a la muestra de ADN genómico de partida y se mezcló exhaustivamente mediante pipeteo. Si no se emplea PacBio u otros reactivos comerciales, se puede agregar 4% de PVP 360,000, KCl 1,2 M, Tris-HCl 20 mM, a pH 8, a la muestra de ADN total a una relación de volumen 1:1.
2. Centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Eliminación del sobrenadante con una pipeta.
4. Agregado de 70% de etanol al tubo.
5. Centrifugación del tubo a 10.000 x g por aproximadamente 2 minutos a temperatura ambiente.
6. Eliminación del sobrenadante y repetición del lavado con 70% de etanol
7. Agregado de la solución amortiguadora EB (o Tris-HCl 10 mM a pH 8 si no se usa el kit PacBio) al tubo e incubación a 50 °C durante 10-30 minutos y luego resuspensión del pélet de ADN.

**[0084]** El uso del flujo de trabajo de eliminación de fragmentos pequeños en combinación con el flujo de trabajo de producción rápida demostró que era un

proceso efectivo para poder realizar las pruebas de liberación con productos de células T modificadas genéticamente en puntos de tiempo tempranos del cultivo (por ejemplo, entre 17 h y 3 días). Por ejemplo, el producto CAR-T producido usando el flujo de trabajo de 17-20 horas se cosechó a las 20 h y se cosechó una alícuota sustituta a las 72 horas. El ADN total se aisló usando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) y el ADN agotado en fragmentos pequeños se preparó usando el kit de eliminador de lecturas cortas (PacBio). El ADN agotado en fragmentos pequeños, así como las muestras de ADN total fueron evaluados por el lentivirus de replicación competente usando un ensayo de PCR en tiempo real para VSV-G y la integración del vector usando un ensayo de PCR en tiempo real para GAG y el gen de mantenimiento PTBP2. Los cebadores y las sondas fluorescentes usados en las reacciones de PCR se pueden consultar en la Tabla 6.

**[0085] Tabla 6. Cebadores y sondas para la PCR usados en los ensayos de qPCR con GAG, VSV-G y PTPBP2.**

*Cebadores para GAG*

5'-GGA GCT AGA ACG ATT CGC AGT TA- 3'

5' GGT TGT AGC TGT CCC AGT ATT TGT C- 3'

*Sonda para GAG*

5'-/56-FAM/ACA GCC TTC TGA TGT TTC TAA CAG GCC AGG 3'BHQ-1

*Cebadores para PTPBP2*

5'-TCT CCA TTC CCT ATG TTC ATG C-3'

5'-GTT CCC GCA GAA TGG TGA GGT G-3'

*Sonda para PTPBP2*

5'-/5HEX/ATG TTC CTC /ZEN/GGA CCA ACT TG 3iabfq 3'

*Cebadores para VSVG*

5'-AGG GAA CTG TGG GAT GAC TG

5'-GAA CAC CTG AGC CTT TGA GC

*Sonda para VSVG*

5'-6FAM-GAACACCTGAGCCTTTGAGC MGBNFQ-3'

[0086] Los productos de la PCR se cuantificaron usando una sonda estándar que consistía en un plásmido linealizado modificado para expresar copias individuales de GAG, VSV-G y PTBP2. Como se observa en la Figura 7A, las reacciones de qPCR que se realizaron con el ADN agotado en fragmentos pequeños no detectaron VSV-G y por ello fueron negativas para los lentivirus de replicación competente según lo esperado con dos productos diferentes producidos durante 20 horas. Por el contrario, cuando se usó el ADN genómico total sin depleción de fragmentos pequeños, ambas muestras dieron resultados de qPCR falsos positivos para VSV-G probablemente debido a la contaminación con plásmidos libres de fragmentos pequeños. Para evaluar si enfoques alternativos, tales como lavado o cultivo de las células durante 3 días (en oposición a 20 horas), permitirían superar la reactividad falsa positiva con la evaluación con el lentivirus de replicación competente, los inventores condujeron ensayos adicionales. En particular, los inventores cosecharon productos de CD19 CAR-T transducidas con lentivirus a las 20 horas y 72 horas y realizaron lavados extensivos de las células antes de aislar el ADN genómico. En particular, las células ( $5 \times 10^6$  células) se lavaron 15 veces en un volumen de 50 ml de PBS en el caso de las muestras de 72 horas y 5 veces en el caso de las muestras de 20 horas. En todos los casos (muestras de 20 y 72 horas para ambos productos), hubo reactividad falsa positiva usando el ensayo de qPCR para VSV-G. Por

consiguiente, una duración de cultivo aumentada a 3 días y un extenso lavado de las células no son suficientes para reducir esta reactividad falsa positiva.

**[0087]** Notablemente, en las pruebas con lentivirus de replicación competente, nunca se informó una prueba positiva para los productos clínicos a la FDA durante los últimos 10 años lo cual refuerza que la reactividad positiva observada de manera consistente con la producción rápida del producto a las 17-20 h y 72 horas se debe a una reactividad falsa positiva ([fda.gov/media/113790/download](https://www.fda.gov/media/113790/download)). Además, cuando las duraciones de cultivo se extienden a 8 días, los ensayos de qPCR con VSV-G se vuelven negativos lo cual sugiere que el ADN del plásmido libre se había perdido al alcanzar dicho punto de tiempo y que no hubo un verdadero virus de replicación competente.

**[0088]** De manera similar a las pruebas con el lentivirus de replicación competente, otra prueba de liberación importante para los productos para terapias de células transducidas viralmente comprende la integración de un vector que a menudo se mide mediante qPCR contra el gen GAG con el cual también hay contaminación con el plásmido libre en el vector viral y puede dar una reactividad falsa positiva. Inicialmente, se condujo una qPCR con GAG/PTPB2 para determinar el número de copias del vector sobre las células T CD19 CAR transducidas lentiviralmente que se mantuvieron en cultivo durante 8 días a fin de evaluar la multiplicidad de infección (MOI) del vector y para evaluar un nivel basal para una integración completa del vector. Como se observa en la Figura 7B, un valor de MOI de 10:1 condujo a un número de copias pico del vector por célula T transducida (es decir, que expresan CD19 CAR) de 1,5. A continuación, se determinó el número de copias del vector por célula transducida usando el flujo de trabajo de producción rápida cuando se empleaba un valor de

MOI del vector CD19 CAR de 10:1 excepto que las células se cosecharon a las 20 horas, 3 días y 7 días. Además, se utilizó el kit SRE (PacBio) para eliminar el ADN de fragmentos pequeños. Como se observa en la Figura 7C, los resultados de integración del vector fueron similares en todos los puntos de tiempo. Notablemente, la expresión en superficie de CD19 CAR es muy baja a las 20 horas, aunque presenta una expresión completa a las 72 horas aproximadamente.

[0089] Finalmente, la electroforesis en gel de muestras de ADN total preparadas a partir de dos productos de producción rápida de 20 horas de células T antes y después de la eliminación de fragmentos pequeños demuestra que hay un mantenimiento del ADN genómico como era esperado y por consiguiente solo se eliminaron los fragmentos moleculares de peso bajo indeseables (Figura 7D). Además, la cuantificación de la concentración de ADN usando el espectrofotómetro Nanodrop® (ThermoFisher Scientific) no reveló ningún cambio medible en la concentración de ADN antes y después de la eliminación de fragmentos pequeños lo cual demuestra que solo se eliminan cantidades mínimas de ADN.

[0090] Como se podrá apreciar, el flujo de trabajo de la producción de células CAR-T que se describe en la presente proporciona mejoras significativas frente a las metodologías del arte anterior. En particular, sin intención de limitación alguna:

1. Primariamente se conduce una producción usando células no fraccionadas de un producto de aféresis o células de aféresis que se habían sometido a depleción de monocitos mediante adherencia a una superficie sólida. Además, se pueden utilizar células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

o PBMC agotadas en monocitos aisladas directamente de sangre periférica. Por consiguiente, no requiere células T purificadas lo cual se suponía era importante para un flujo de trabajo rápido de CAR-T que involucra una transducción viral. Hasta donde saben los inventores, este es el primer protocolo de 1 día o menos que emplea PBMC y no células T aisladas como la fuente de partida para una producción rápida de células T modificadas genéticamente usando transducción viral.

2. La activación de las células se lleva a cabo usando diferentes métodos. Las esferas magnéticas demoran días en desprenderse de las células y por consiguiente las metodologías que emplean dichas esferas retrasan el día en que se pueden cosechar los productos y/o dan como resultado un rendimiento de producto significativamente reducido debido a la pérdida de células unidas a las esferas. Además, inesperadamente los inventores observaron una eficiencia de transducción mejorada usando reactivos de activación de células T basados en esferas no magnéticas específicas. Los enfoques de activación que se describen en la presente proveen una eficiencia de transducción mejorada al tiempo que evitan el aumento de los costos y una mayor complejidad de producción relacionados con el uso de esferas magnéticas tal como requieren los métodos del arte anterior.

3. El proceso de producción que se describe en la presente es el primer flujo de trabajo de una producción rápida de CAR-T descrito que se puede llevar a cabo de manera eficaz en la ausencia de citoquinas exógenas. Las citoquinas usadas durante la producción agregan un costo significativamente mayor y también pueden conducir a cambios en las células T. Dado que uno de los principales beneficios del flujo de trabajo de producción rápida consiste en

mantener la población de partida de células T (por ejemplo, células T naïve) tan parecida como sea posible a las células originales recolectadas del paciente, la posibilidad de evitar las citoquinas exógenas es considerada como un beneficio importante.

4. El uso descrito de un sistema completamente cerrado para producir el producto de células T usando bolsas permite proveer un producto conveniente basado en un kit en donde el virus/medios/reactivo de activación, etc. se proporcionarán en una bolsa y luego se mezcla con el producto de la aféresis. El producto se podría producir usando este método fuera de una sala limpia para facilitar el uso y la producción generalizados del producto, lo cual puede reducir los costos y aumentar la accesibilidad.

5. Los métodos que se describen en la presente superan un obstáculo clave en el campo de realización de pruebas de liberación del producto requeridas. Los requerimientos actuales de las pruebas de liberación requeridas para productos de terapias con células transducidas con retrovirus o lentivirus incluyen evaluar el lentivirus de replicación competente y el número de copias del vector. Ambos ensayos proveen resultados falsos positivos significativos cuando aún hay un nivel de contaminación bajo con el plásmido libre usando los ensayos tradicionales basados en qPCR. Hay plásmidos libres residuales de las células productoras de virus, tales como células 293, en el vector viral. En los puntos de tiempo tempranos durante la producción después de la transducción viral, hay plásmidos residuales remanentes del vector y los resultados falsos positivos son prácticamente imposibles de eliminar usando las metodologías de evaluación tradicionales. Esta reactividad falsa positiva ha constituido un obstáculo importante para otros grupos y limita la capacidad para producir de

manera rápida productos que se puedan utilizar en pacientes. Dado que el ADN de interés tanto para la integración viral como para el vector de replicación competente es un ADN viral que está integrado, el flujo de trabajo de producción incluido aquí está acoplado con un método para eliminar el ADN del plásmido libre residual de modo que las reacciones de qPCR se pueden realizar tanto para el número de copias del vector como para lentivirus de replicación competente sin esta reacción de falsos positivos. En particular, el ADN del plásmido libre es mucho más pequeño que el ADN genómico. Se usa un método basado en centrifugación para eliminar el ADN pequeño conservando al mismo tiempo el ADN genómico más grande. Cuando se usa este método no hay una reactividad de falsos positivos del ADN del plásmido, lo cual permite superar el importante obstáculo para una producción rápida de CAR-T siendo aún factible medir el ADN integrado en el genoma.

**[0091]** A menos que se define de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende un experto en la técnica a que la(s) invención(es) pertenece(n).

**[0092]** Todas las patentes, las solicitudes de patente, solicitudes publicadas y publicaciones, secuencias en Genbank, bases de datos, sitios de Internet y otros materiales publicados a que se hace referencia en toda la divulgación en este documento, a menos que se indique lo contrario, se incorporan en su totalidad a modo de referencia.

**[0093]** Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección de ese tipo, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y que la información particular de Internet puede estar disponible y luego no, pero que mediante una búsqueda en Internet se puede encontrar información

equivalente. La referencia a las mismas evidencia la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

**[0094]** Tal como se utiliza en la presente, las abreviaturas para cualquiera de los grupos protectores, aminoácidos y otros compuestos son, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas o la Nomenclatura de la Comisión IUPAC-IUB o la Nomenclatura Bioquímica (véase, *Biochem.*, (1972) 11(9): 1726-1732).

**[0095]** A pesar de que en la práctica o en los ensayos del objeto que se divulga en la presente se puede usar cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los que se describen aquí, los métodos, dispositivos y materiales representativos son los que se describen en la presente.

**[0096]** En determinados casos, los nucleótidos y polipéptidos que se divulgan en la presente están incluidos en las bases de datos disponibles al público, tales como GENBANK® y SWISSPROT. La información que incluye secuencias y otra información relacionada con tales nucleótidos y polipéptidos incluidos en dichas bases de datos disponibles al público se incorpora expresamente a modo de referencia. A menos que se indique o sea evidente de otra manera, las referencias a dichas bases de datos disponibles al público son referencias a la versión más reciente de la base de datos a partir de la fecha de presentación de esta Solicitud.

**[0097]** A menos que se indique de otra manera, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como condiciones de reacción y semejantes, utilizados en la Descripción y las reivindicaciones se interpretarán como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, los

parámetros numéricos indicados en esta Descripción y en las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se intentan obtener con el objeto divulgado en la presente.

**[0098]** Siempre que se utilicen las frases “por ejemplo”, “tal como”, “que incluyen” y semejantes en la presente, se comprenderá que la frase “y sin limitaciones” les sigue a menos que explícitamente se defina de otra manera. De manera similar, “un ejemplo”, “ejemplo de” y semejantes se consideran no limitantes. El término “sustancialmente” permite desviaciones con respecto al descriptor que no afecta negativamente el propósito pretendido. Se comprenderá que los términos descriptivos serán modificados por el término “sustancialmente” aún si la palabra “sustancialmente” no está explícitamente indicada. Así, por ejemplo, la frase “en donde la palanca se extiende verticalmente” significa “en donde la palanca se extiende verticalmente de manera sustancial” siempre que no sea necesaria una disposición vertical precisa para que la palanca pueda cumplir su función.

**[0099]** Los términos “que comprende” y “que incluye” y “que tiene” y “que involucra” (y de manera similar “comprende”, “incluye”, “tiene” e “involucra”) y semejantes se usan indistintamente y tienen el mismo significado. Específicamente, cada uno de los términos se define de manera consistente con la definición común en la Ley de Patentes de los EEUU de “que comprende” y por ende se interpreta que es un término abierto que significa “por lo menos el siguiente”, y también se interpretará que no excluye características, limitaciones, aspectos, etc. adicionales. Así, por ejemplo, “un proceso que comprende los pasos a, b y c” significa que el proceso incluye por lo menos los pasos a, b y c. Siempre que se utilicen los términos “un” o “una”, se comprenderá que es “uno

o más”, a menos que dicha interpretación no tenga sentido en el contexto. Los términos “comprenden”, “tienen”, “incluyen” y “contienen” (y variantes de los mismos) son verbos copulativos abiertos y permiten la adición de otros elementos cuando se usan en una reivindicación.

**[00100]** El uso de la palabra “un” o “una”, cuando se emplea junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones o en la descripción significa uno o más de uno, a menos que el contexto indique lo contrario.

**[00101]** Tal como se usa en la presente, el término “aproximadamente”, con referencia a un valor o a una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje pretende abarcar variaciones de algunas formas de realización de  $\pm 20\%$ , en algunas formas de realización  $\pm 10\%$ , en algunas formas de realización  $\pm 5\%$ , en algunas formas de realización  $\pm 1\%$ , en algunas formas de realización  $\pm 0,5\%$ , en algunas formas de realización  $\pm 0,1\%$ , en algunas formas de realización  $\pm 0,01\%$  y en algunas formas de realización  $\pm 0,001\%$  con respecto a la cantidad especificada, dado que dichas variaciones son apropiadas para llevar a cabo el método divulgado. El uso del término “o” en las reivindicaciones significa “y/o” a menos que explícitamente se indique que solo se refiere a alternativas o si las alternativas son mutuamente excluyentes.

**[00102]** Tal como se usa en la presente, los rangos se pueden expresar como desde “aproximadamente” un valor particular y/o hasta “aproximadamente” otro valor particular. También se comprenderá que en la presente se divulgan numerosos valores, y que cada valor también se divulga en la presente como “aproximadamente” dicho valor particular además del propio valor. Por ejemplo, si se divulga el valor “10”, entonces también se divulga

“aproximadamente 10”. También se comprenderá que se divulga asimismo cada unidad entre dos unidades particulares. Por ejemplo, si se divulga entre 10 y 15, entonces también se divulga 11, 12, 13 y 14.

**[00103]** Tal como se utiliza en la presente, "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia que se describe a continuación de este término tiene lugar o no, y que la descripción incluye casos donde dicho evento o circunstancia tiene lugar y casos donde no tiene lugar. Por ejemplo, una porción opcionalmente variante significa que la porción es una variante o no es una variante.

**[00104]** Se comprenderá que es posible cambiar varios detalles del objeto divulgado aquí sin apartarse del alcance del objeto divulgado en la presente. Aún más, la descripción precedente se ofrece a efectos ilustrativos solamente, y no con la intención de limitación alguna. Las modificaciones y variaciones evidentes son posibles a la luz de las enseñanzas precedentes. Todas dichas modificaciones y variaciones se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas cuando se interpretan de acuerdo con la amplitud a la cual tienen derecho de manera justa, legal y equitativa.

**[00105]** Referencias:

**[00106]** 1. Rodriguez J, Caballero MD, Gutierrez A, Solano C, Arranz R, Lahuerta JJ, Sierra J, Gandarillas M, Perez-Simon JA, Zuazu J, Lopez-Guillermo A, Sureda A, Carreras E, Garcia-Larana J, Marin J, Garcia JC, Fernandez De Sevilla A, Rifon J, Varela R, Jarque I, Albo C, Leon A, SanMiguel J, Conde E. Autologous stem-cell transplantation in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma not achieving complete response after induction chemotherapy: the GEL/TAMO experience. Ann Oncol. 2004; 15(10):1504-9.

Epub 2004/09/16. doi: 10.1093/annonc/mdh391. PubMed PMID: 15367411.

**[00107]** 2. Vose JM, Zhang MJ, Rowlings PA, Lazarus HM, Bolwell BJ, Freytes CO, Pavlovsky S, Keating A, Yanes B, van Besien K, Armitage JO, Horowitz MM, Autologous B, Marrow Transplant Registry Lymphoma Working C. Autologous transplantation for diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma in patients never achieving remission: a report from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol.* 2001; 19(2):406-13. Epub 2001/02/24. doi: 10.1200/JCO.2001.19.2.406. PubMed PMID: 11208832.

**[00108]** 3. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, Link BK, Hay A, Cerhan JR, Zhu L, Boussetta S, Feng L, Maurer MJ, Navale L, Wieszorek J, Go WY, Gisselbrecht C. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood.* 2017; 130(16):1800-8. Epub 2017/08/05. doi: 10.1182/blood-2017-03-769620. PubMed PMID: 28774879; PMCID: PMC5649550.

**[00109]** 4. Westin JR, Kersten MJ, Salles G, Abramson JS, Schuster SJ, Locke FL, Andreadis C. Efficacy and Safety of CD19-Directed CAR-T Cell Therapies in Patients With Relapsed/Refractory Aggressive B-Cell Lymphomas: Observations From the JULIET, ZUMA-1, and TRANSCEND Trials. *American journal of hematology.* 2021. Epub 2021/07/27. doi: 10.1002/ajh.26301. PubMed PMID: 34310745.

**[00110]** 5. Harrison RP, Zylberberg E, Ellison S, Levine BL. Chimeric antigen receptor-T cell therapy manufacturing: modelling the effect of offshore production on aggregate cost of goods. *Cytotherapy.* 2019; 21(2):224-

33. Epub 2019/02/17. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.01.003. PubMed PMID: 30770285.

**[00111]** 6. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff PJ, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, McSweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wiecek J, Go WY. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017; 377(26):2531-44. Epub 2017/12/12. doi: 10.1056/NEJMoa1707447. PubMed PMID: 29226797; PMCID: PMC5882485.

**[00112]** 7. Kersten MJ, Spanjaart AM, Thieblemont C. CD19-directed CAR T-cell therapy in B-cell NHL. *Curr Opin Oncol*. 2020; 32(5):408-17. Epub 2020/08/03. doi: 10.1097/CCO.0000000000000668. PubMed PMID: 32740094.

**[00113]** 8. Zhang H, Zhao P, Huang H. Engineering better chimeric antigen receptor T cells. *Exp Hematol Oncol*. 2020; 9(1):34. Epub 2020/12/10. doi: 10.1186/s40164-020-00190-2. PubMed PMID: 33292660; PMCID: PMC7709221.

**[00114]** 9. Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *Journal of translational medicine*. 2010; 8:104. Epub 2010/10/28. doi: 10.1186/1479-5876-8-104. PubMed PMID: 20977748; PMCID: PMC2987859.

**[00115]** 10. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, Jager U, Jaglowski S, Andreadis C, Westin JR, Fleury

I, Bachanova V, Foley SR, Ho PJ, Mielke S, Magenau JM, Holte H, Pantano S, Pacaud LB, Awasthi R, Chu J, Anak O, Salles G, Maziarz RT, Investigators J. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2019; 380(1):45-56. Epub 2018/12/07. doi: 10.1056/NEJMoa1804980. PubMed PMID: 30501490.

11. Jones A, Torkel C, Stanley D, Nasim J, Borevitz J, Schwessinger B. High-molecular weight DNA extraction, clean-up and size selection for long-read sequencing. *PloS One*. 2021; 16(7):e0253830. Epub 2021/07/16. doi: 10.1371/journal.pone.0253830. PubMed PMID: 34264958; PMCID: PMC8282028.