

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 912 383**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 35/545 (2015.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2018** **PCT/US2018/028133**
87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2018** **WO18195175**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2018** **E 18724646 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.01.2022** **EP 3612557**

54 Título: **Células efectoras inmunitarias específicas de antígeno**

30 Prioridad:

18.04.2017 US 201762486875 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2022

73 Titular/es:

FUJIFILM CELLULAR DYNAMICS, INC. (100.0%)
525 Science Drive, Suite 200
Madison, WI 53711, US

72 Inventor/es:

VODYANYK, MAKSYM, A.;
ZHANG, XIN;
BRANDL, ANDREW, J.;
RAJESH, DEEPIKA;
SWANSON, BRADLEY;
MUNN, CHRISTIE;
BURTON, SARAH;
WANG WEN, BO y
MCLEOD, ETHAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 912 383 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células efectoras inmunitarias específicas de antígeno

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos con número de serie 62/486.875, presentada el 18 de abril de 2017.

Antecedentes

10 1. Campo

La presente invención se refiere en general al campo de la biología molecular. Más particularmente, se refiere a métodos relacionados con células efectoras inmunitarias específicas de antígeno, tales como células T y células NK.

15 2. Descripción de la técnica relacionada

A pesar de los avances tecnológicos en las opciones de diagnóstico y tratamiento disponibles para los pacientes diagnosticados con cáncer, el pronóstico a menudo sigue siendo malo y muchos pacientes no pueden curarse. La inmunoterapia tiene la promesa de ofrecer un tratamiento potente, pero dirigido, a pacientes diagnosticados con
20 varios tumores con el potencial de erradicar las células tumorales malignas sin dañar los tejidos normales. En teoría, las células T del sistema inmunitario son capaces de reconocer patrones de proteínas específicas de las células tumorales y mediar en su destrucción a través de diversos mecanismos efectores. La terapia de células T adoptivas es un intento de aprovechar y amplificar la capacidad de erradicación de tumores de las propias células T de un paciente y luego devolver estos efectores al paciente en un estado tal que eliminan efectivamente el tumor residual,
25 sin dañar el tejido sano. Aunque este enfoque no es nuevo en el campo de la inmunología tumoral, muchos inconvenientes en el uso clínico de la terapia de células T adoptivas impiden el uso completo de este enfoque en los tratamientos contra el cáncer. A continuación se describen ejemplos concretos de referencias de la técnica anterior: el documento WO2014165707 divulga métodos para generar células T fenotípicamente definidas, funcionales y/o expandibles a partir de células madre pluripotentes modificadas mediante modificaciones genéticas seguras.
30 Themeli M et al., (2013, Nature Biotechnology, 31 (10), 928-933) describen la generación de linfocitos T humanos dirigidos a tumores a partir de células madre pluripotentes inducidas para la terapia contra el cáncer, que también incluye información complementaria. Themeli M et al., (2015, Cell Stem Cell, 16(4), 357-366) también describen nuevas fuentes de células para el diseño de células T y la inmunoterapia adoptiva. Hermanson D et al., (2013, Blood, American Society of Hematology, 122 (21), 896) describen células asesinas naturales que expresan receptor de antígeno quimérico funcional derivadas de células madre pluripotentes humanas. Eguizábal C et al., (2014, Frontiers in immunology, 5, 1-63) describen células asesinas naturales para la inmunoterapia contra el cáncer con células NK derivadas de células madre pluripotentes como una perspectiva inmunoterapéutica.

Las terapias de células T adoptivas actuales están limitadas por la falta de células T específicas del tumor y del
40 paciente, incluida su rareza en el cuerpo, su incapacidad para superar una serie de mecanismos de evasión del sistema inmunitario del tumor y su corta vida útil. Es difícil aislar y expandir el número típicamente bajo de células T reactivas a un antígeno deseado. Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha de células inmunitarias específicas de antígeno terapéuticamente suficientes y funcionales para un uso eficaz en inmunoterapia.

45 Resumen

La presente invención proporciona el objeto definido en las reivindicaciones. En una primera realización, la presente invención proporciona un método como se define en las reivindicaciones para producir células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno que comprende el diseño de células madre pluripotentes (PSC) para expresar un
50 receptor de antígeno quimérico (CAR), produciendo así CAR-PSC; diferenciar las CAR-PSC de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) CD34⁺; diferenciar adicionalmente las HPC CD34⁺ en células T y/o células NK; y expandir las células T y/o las células NK. En algunos aspectos, la expansión comprende el cocultivo con células diana específicas de antígeno, produciendo así células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno.

55 En ciertos aspectos, las PSC modificadas para expresar un CAR son células madre pluripotentes inducidas (iPSC) o células madre embrionarias (ESC). En aspectos particulares, las iPSC se reprograman a partir de células somáticas, tales como las células T.

En los métodos de la presente invención, la etapa de diferenciar CAR-PSC en HPC CD34⁺ comprende realizar la
60 diferenciación dirigida como se define en las reivindicaciones, en los que la diferenciación dirigida comprende generar cuerpos embrioides (EB) en presencia de blebistatina, un inhibidor de GSK-3, FGF2 y VEGF; poner en contacto los EB con BMP4, VEGF y FGF2 para inducir la inducción del mesodermo; y diferenciar los EB en presencia del ligando de Flt-3, IL-3, SCF y TPO, produciendo así HPC. En algunos aspectos, la diferenciación está en los medios esencialmente libres o libres de BMP4. En otros aspectos, la diferenciación está en presencia de
65 BMP4. En aspectos particulares, el inhibidor de GSK-3 es CHIR99021. En algunos aspectos, la diferenciación comprende además la presencia de IL-11, cAMP y/o VEGF.

En algunos aspectos, la diferenciación dirigida comprende cultivar PSC individualizadas en una superficie recubierta de amina en presencia de blebistatina, BMP4, VEGF y bFGF; iniciar la diferenciación poniendo en contacto las PSC con BMP4, VEGF y FGF2; y diferenciar adicionalmente las PSC en presencia del ligando de Flt-3, IL-3, IL-6, SCF, TPO y heparina, produciendo así HPC, en el que el método no comprende la formación de EB.

En aspectos particulares, el método comprende cultivar las células en condiciones definidas sin alimentador, tal como durante la duración de todo el método. En algunos aspectos, las PSC están libres de transgenes. En aspectos particulares, las PSC son humanas. En ciertos aspectos, las células T son células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T citotóxicas, células T reguladoras, células T asesinas naturales, células T sin modificar, células T de memoria y/o células T gamma delta.

En ciertos aspectos, las PSC modificadas para expresar un CAR se modifican adicionalmente para expresar ERG/ETV2, GATA2 y HOXA9, tal como bajo el control de un único promotor inducible. En algunos aspectos, el método comprende además modificar las PSC para expresar HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 y/o HOXA4. Por lo tanto, en algunos aspectos, la etapa de diferenciar CAR-PSC en HPC CD34⁺ comprende inducir la expresión de ERG/ETV2, GATA2 y HOXA9 durante un periodo de tiempo suficiente para producir HPC y terminar la inducción de expresión antes de diferenciar aún más las HPC en células T y/o células NK.

En aspectos específicos, la etapa de diferenciar CAR-PSC en HPC CD34⁺ comprende además seleccionar células que expresan CD34 y/o CD43 antes de diferenciarse en células T específicas de antígeno y/o células NK. En aspectos particulares, la selección comprende realizar la clasificación de células activadas magnéticamente (MACS). En algunos aspectos, las células que expresan CD34 y/o CD43 comprenden al menos el 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o un porcentaje superior de la población total de células. En algunos aspectos, no se lleva a cabo la etapa de realizar MAC para seleccionar células positivas para CD34 y/o CD43.

En aspectos particulares, al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 o un porcentaje superior de las HPC expresan el CAR. En algunos aspectos, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o un porcentaje superior de las HPC expresan el CAR.

En algunos aspectos, la diferenciación de las HPC en células T y/o células NK comprende cultivar las HPC en una superficie recubierta de retronectina y Notch DLL-4 en presencia de ácido ascórbico y nicotinamida en condiciones hipóxicas. En algunos aspectos, el cultivo comprende además SCF, ligando de FLT-3, TPO e IL-7, y opcionalmente comprende un inhibidor de GSK (p. ej., CHIR99021), IL-2 y/o IL-12. En ciertos aspectos, la etapa de expansión comprende además el cultivo de células T específicas de antígeno en presencia de anticuerpo anti-CD3 e IL-2. En aspectos adicionales, la etapa de expansión comprende además el cultivo de células T específicas de antígeno en presencia de anticuerpo anti-CD3, IL-2, IL-15 e IL-21. En algunos aspectos, la etapa de expansión comprende el cultivo de células T específicas de antígeno en presencia de anticuerpo anti-CD3, ligando de FLT3, IL-7, IL-2 y/o IL-15, y opcionalmente comprende además SCF, TPO y/o IL-21. En aspectos particulares, al menos 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o un porcentaje superior de las HPC CD34⁺ diferenciadas son células T CD3⁺CAR⁺. En algunos aspectos, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o un porcentaje superior de las HPC CD34⁺ diferenciadas son células NK CD3⁺CAR⁺. En algunos aspectos, al menos el 2 por ciento de las HPC CD34⁺ expandidas son células T CD3⁺CAR⁺. En aspectos particulares, al menos el 10 por ciento de las HPC CD34⁺ expandidas son células NK CD3⁺CAR⁺.

En ciertos aspectos, el CAR y las células diana específicas de antígeno se dirigen al mismo antígeno. En un aspecto específico, el antígeno es CD19. En aspectos particulares, las células diana específicas de antígeno son células tumorales. En algunos aspectos, las células diana específicas de antígeno son humanas. En aspectos particulares, las células diana específicas de antígeno son negativas para HLA clase I. En algunos aspectos, al menos el 5, tal como 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o un porcentaje superior de las células T efectoras específicas de antígeno muestran actividad citotóxica contra células diana. En ciertos aspectos, al menos 10, tal como 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o un porcentaje superior de las células NK efectoras específicas de antígeno muestran actividad citotóxica contra las células diana.

En algunos aspectos, el CAR está codificado por ADN integrado en el genoma de las PSC. En ciertos aspectos, el CAR comprende un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno. En aspectos específicos, los dominios de señalización intracelular comprenden CD3ζ y CD28. En algunos aspectos, la región de unión al antígeno es un F(ab')₂, Fab', Fab, Fv o scFv.

En ciertos aspectos, las PSC son homocigotas para HLA. En algunos aspectos, las PSC homocigotas para HLA son homocigotas para uno o más de los alelos de loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP o HLA-DQ. En ciertos aspectos, las PSC homocigotas para HLA son homocigotas para dos de los alelos de loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP o HLA-DQ. En aspectos particulares, las PSC homocigotas para HLA son homocigotas para HLA-A y HLA-B. En ciertos aspectos, las PSC homocigotas para HLA son homocigotas para HLA-A, HLA-B y HLA-C.

Otra realización proporciona un método para producir células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno como se define en las reivindicaciones que comprende modificar PSC para expresar un CAR, produciendo así CAR-PSC; cultivar las CAR-PSC en presencia de blebistatina, un inhibidor de GSK-3, FGF2 y VEGF, generando así EB; poner en contacto los EB con BMP4, VEGF y FGF2 para inducir la inducción del mesodermo; diferenciar los EB en presencia del ligando de Flt-3, BMP4, IL-3, SCF y TPO, produciendo así HPC CD34⁺; diferenciar adicionalmente las HPC CD34⁺ en células T y/o células NK; y expandir las células T y/o las células NK, en el que la expansión comprende el cocultivo con células diana específicas de antígeno, produciendo así células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno. En aspectos particulares, el inhibidor de GSK-3 es CHIR99021.

En otra realización más, se proporciona un método para producir células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno como se define en las reivindicaciones que comprende modificar PSC para expresar un CAR, produciendo así CAR-PSC; cultivar CAR-PSC individualizados en una superficie recubierta de amina en presencia de blebistatina, BMP4, VEGF e iniciar la diferenciación poniendo en contacto las CAR-PSC con BMP4, VEGF y FGF2; diferenciar adicionalmente las CAR-PSC en presencia del ligando de Flt-3, IL-3, IL-6, SCF, TPO y heparina, produciendo así HPC CD34⁺; diferenciar las HPC CD34⁺ en células T y/o células NK; y expandir las células T y/o las células NK, en el que la expansión comprende el cocultivo con células diana específicas de antígeno, produciendo así células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno, en el que el método no comprende la formación de los EB.

Una realización adicional proporciona un método para producir células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno como se define en las reivindicaciones que comprende modificar PSC para expresar un CAR, produciendo así CAR-PSC; diferenciar las CAR-PSC en HPC CD34⁺; seleccionar HPC CD34⁺ CD43⁺; diferenciar adicionalmente las HPC CD34⁺ CD43⁺ en células T y/o células NK; y expandir las células T y/o las células NK, en el que la expansión comprende el cocultivo con células diana específicas de antígeno, produciendo así células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno.

Se describe además una población de células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno producidas de acuerdo con las realizaciones descritas anteriormente. También se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno producidas de acuerdo con las realizaciones descritas en este documento. En el presente documento se describe adicionalmente una composición que comprende las células T efectoras específicas de antígeno y/o las células NK producidas de acuerdo con las realizaciones para el tratamiento del cáncer en un sujeto. También se describe en el presente documento el uso de células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno producidas de acuerdo con las realizaciones para el tratamiento del cáncer.

Se describe adicionalmente un método para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno producidas de acuerdo con las realizaciones descritas en el presente documento. En algunos aspectos, el cáncer expresa un antígeno tumoral y las células T efectoras específicas de antígeno y/o las células NK se dirigen a dicho antígeno tumoral. En aspectos particulares, el sujeto es un ser humano.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican formas de realización preferidas de la invención, se proporcionan únicamente a modo de ilustración, ya que los expertos en la materia apreciarán varios cambios y modificaciones a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar aún más ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor con referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

Figuras 1A-1G: (Fig. 1A) Esquema que representa métodos para producir células T y células NK a partir de PSC, incluidos métodos de programación directa y métodos de diferenciación dirigida. (Fig. 1B) Diagrama que representa la diferenciación de células T y NK libres de alimentador y libres de suero de hPCS. Abreviaturas: CHIR - CHIR99021, inhibidor de GSK-3; HDM, medio de diferenciación hematopoyética libre de suero; TCDM, medio de diferenciación de células T; TCEM, medio de expansión de células T; HPC, células progenitoras hematopoyéticas; marcados con asterisco (*) son componentes de mejoramiento opcionales. (Fig. 1C) Eficiencia de HPC CD34⁺ CD43⁺ de PSC a través de diferenciación dirigida o programación directa. (Fig. 1D) Análisis de citometría de flujo de cultivos de diferenciación de T/NK. (Fig. 1E) Rendimiento de diferentes poblaciones celulares a lo largo de la diferenciación. (Fig. 1F) Fenotipo de células T derivadas de PSC. (Fig. 1G) Expansión de células T derivadas de PSC. Los anticuerpos anti-CD3 inmovilizados (iCD3) son para la expansión de células T derivadas de PSC (gráfico de barras). Las células T que proliferan en los cultivos de expansión adquieren una morfología característica de linfoblastos de forma irregular (fotografía). CD56 y expresión de CD8 de la expansión de células T de 2 semanas (diagramas de puntos de citometría de flujo).

Figura 2: Expresión de CAR en células T/NK derivadas de PSC. Expresión de CAR a lo largo de las etapas de diferenciación evaluada por citometría de flujo usando tinción de proteína L. Las células T CD3⁺ se tiñeron conjuntamente con mAb de ratón anti-CD3 humano de cadena lambda (clon SP34-2). Se muestran la expresión de CAR por PSC E11 y HPC derivadas de E1 1 y células T.

Figuras 3A-B: Citotoxicidad mediada por CAR anti-CD19 *in vitro* en células T/NK derivadas de PSC. (Fig. 3A) Ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando células diana Daudi y Raji CD19⁺ que expresan luciferasa. (Fig. 3B) Potencial citolítico de células CAR-T mediante recuento de células diana en tiempo real utilizando el sistema de análisis de células vivas Incucyte S3 (Essen Bioscience).

Figura 4: Producción de citocinas inducidas por CAR anti-CD19 *in vitro* en células T/NK derivadas de PSC.

Figuras 5A-5B: Potencial oncolítico *in vivo* de células T/NK-CAR derivadas de PSC. (Fig. 5A) Progresión tumoral en ratones monitorizada mediante imágenes bioluminiscentes *in vivo*. (Fig. 5B) Curvas de supervivencia en diferentes grupos de ratones tratados con células T (1C) o NK (A16) derivadas de PSC.

Descripción de realizaciones ilustrativas

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos altamente eficientes como se define en las reivindicaciones para generar células efectoras inmunitarias específicas de antígeno a partir de células madre pluripotentes (PSC) humanas que han sido modificadas para expresar un receptor de antígeno, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR), denominado en el presente documento CAR-PSC. Las células efectoras inmunitarias producidas por los métodos actuales pueden incluir, entre otras, células T, células NK y células iNKT.

Las PSC pueden obtenerse mediante la reprogramación (p. ej., mediante métodos retrovirales o episomales) de una población inicial de células T para producir iPSC derivadas de células T (TiPSC). Las células T pueden aislarse de diversas fuentes, tales como una muestra de sangre. La población inicial de células T puede conservar sus reordenamientos característicos del gen del receptor de células T (TCR) y pueden ser células homocigotas de HLA (es decir, homocigotas para los genes del MHC Clase I y II). En consecuencia, las iPSC se pueden producir a partir de células aisladas de sujetos homocigotos de HLA, denominados en el presente documento superdonantes de HLA.

A continuación, las CAR-PSC pueden diferenciarse o programarse para producir células progenitoras hematopoyéticas (HPC) CD34⁺. Esto se puede lograr a través de la diferenciación dirigida usando una combinación de citocinas (p. ej., SCF, TPO, FLT-3, IL-6, IL-3 y heparina) (p. ej., descrita en el documento PCT/US2016/057899). En un método alternativo, las CAR-PSC pueden diferenciarse en las HPC CD34⁺ mediante programación directa con un constructo de expresión que codifica ETV2/ERG, GATA2 y HOXA9 (es decir, EGH) (p. ej., descrito en el documento PCT/US2016/057893). Estos EGH-PSC pueden modificarse aún más para expresar HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 y/o HOXA4 por la capacidad de injertarse a largo plazo.

Finalmente, los CAR-HPC CD34⁺ pueden diferenciarse en células T CD3⁺ o células NK CD56⁺CD3⁻. Un marco de tiempo óptimo durante la diferenciación de HPC (p. ej., día 7-11) para el potencial linfóide puede ser los días 7-11, identificados por la expresión de CD34 y CD43. Por ejemplo, las HPC con potencial linfóide mejorado pueden aislarse clasificando las fracciones de células positivas para dos o más de los marcadores CD144, CD34, CD45 y CD7.

Un ejemplo de método para la diferenciación de células T comprende el uso de RetroNectin y DLL-4 como una matriz libre de alimentador. La diferenciación de células T puede mejorarse aún más mediante el uso de ácido ascórbico para aumentar la eficacia y la maduración, así como mediante el cultivo en condiciones hipóxicas.

Además, las células T y/o las células NK pueden expandirse cultivando conjuntamente con células diana específicas de antígeno (por ejemplo, células tumorales) durante el proceso de diferenciación. Se descubrió que este método aumentaba la actividad citotóxica de las células T y las células NK contra las células diana, observada específicamente por una disminución en el crecimiento tumoral y un aumento en la supervivencia de los ratones inyectados con células tumorales.

Por lo tanto, los métodos de la presente divulgación podrían proporcionar un número ilimitado de células efectoras inmunitarias específicas de antígeno, tales como células T y células NK, para una amplia gama de aplicaciones tales como trasplante estable *in vivo*, selección de compuestos *in vitro*, y elucidación de los mecanismos de las enfermedades y lesiones hematológicas.

I. Definiciones

Como se usa en el presente documento, "esencialmente libre", en términos de un componente específico, se usa en el presente documento para indicar que ninguno de los componentes especificados se ha formulado a propósito en una composición y/o está presente solo como contaminante o en cantidades traza. Por lo tanto, la cantidad total del

componente especificado resultante de cualquier contaminación no intencionada de una composición está muy por debajo del 0,05 %, preferiblemente por debajo del 0,01 %. La más preferida es una composición en la que no se puede detectar ninguna cantidad del componente especificado con métodos analíticos estándar.

5 Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva, "un" o "uno, una" puede significar uno o más. Como se usa en el presente documento en la o las reivindicaciones, cuando se usa junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "uno, una" pueden significar uno o más de uno.

10 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o que las alternativas se excluyen mutuamente, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o". Como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

15 A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, siendo empleado el método para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

20 El término "exógeno", cuando se usa en relación con una proteína, gen, ácido nucleico o polinucleótido en una célula u organismo, se refiere a una proteína, gen, ácido nucleico o polinucleótido que se ha introducido en la célula u organismo por medios artificiales o naturales; o en relación con una célula, el término se refiere a una célula que fue aislada y posteriormente introducida en otras células o en un organismo por medios artificiales o naturales. Un ácido nucleico exógeno puede ser de un organismo o célula diferente, o puede ser una o más copias adicionales de un ácido nucleico que se produce de forma natural en el organismo o la célula. Una célula exógena puede ser de un organismo diferente o puede ser del mismo organismo. A modo de ejemplo no limitante, un ácido nucleico exógeno es uno que está en una ubicación cromosómica diferente en la que estaría en las células naturales, o está flanqueado por una secuencia de ácido nucleico diferente a la que se encuentra en la naturaleza.

30 Por "constructo de expresión" o "casete de expresión" se entiende una molécula de ácido nucleico que es capaz de dirigir la transcripción. Un constructo de expresión incluye, como mínimo, uno o más elementos de control transcripcional (tales como promotores, potenciadores o una estructura funcionalmente equivalente a los mismos) que dirigen la expresión génica en uno o más tipos de células, tejidos u órganos deseados. También se pueden incluir elementos adicionales, tales como una señal de terminación de la transcripción.

35 Un "vector" o "constructo" (a veces denominado sistema de administración de genes o "vehículo" de transferencia de genes) se refiere a una macromolécula o complejo de moléculas que comprende un polinucleótido que se administrará a una célula huésped, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

40 Un "plásmido", un tipo común de vector, es una molécula de ADN extracromosómico separada del ADN cromosómico que es capaz de replicarse independientemente del ADN cromosómico. En ciertos casos, es circular y de doble cadena.

45 Un "origen de replicación" ("ori") u "origen de replicación" es una secuencia de ADN, por ejemplo, en un virus del herpes linfotrófico, que cuando está presente en un plásmido en una célula es capaz de mantener secuencias unidas en el plásmido y/o un sitio en o cerca de donde se inicia la síntesis de ADN. Como ejemplo, un ori para EBV (virus de Epstein-Barr) incluye secuencias de FR (20 copias imperfectas de una repetición de 30 pb), y preferiblemente secuencias de DS; sin embargo, otros sitios en EBV se unen a EBNA-1, por ejemplo, las secuencias de Rep* pueden sustituir por DS como origen de replicación (Kirshmaier y Sugden, 1998). Por lo tanto, un origen de replicación de EBV incluye secuencias de FR, DS o Rep* o cualquier secuencia funcionalmente equivalente a través de modificaciones de ácidos nucleicos o combinaciones sintéticas derivadas de las mismas. Por ejemplo, la presente divulgación también puede usar el origen de replicación del EBV modificado genéticamente, tal como por inserción o mutación de elementos individuales, como se describe específicamente en Lindner et al., 2008.

50 Un "gen", "polinucleótido", "región codificante", "secuencia", "segmento", "fragmento" o "transgén" que "codifica" una proteína particular, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe y opcionalmente también se traduce en un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. La región codificante puede estar presente en forma de ADNc, ADN genómico o ARN. Cuando está presente en forma de ADN, la molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria (es decir, la cadena sentido) o bicatenaria. Los límites de una región codificante están determinados por un codón de inicio en el extremo terminal 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo terminal 3' (carboxilo). Un gen puede incluir, pero no se limita a, ADNc de ARNm procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procariota o eucariota y secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción normalmente se ubicará en 3' con respecto a la secuencia del gen.

65 El término "elementos de control" se refiere colectivamente a regiones promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores secuencia arriba, orígenes de replicación, sitios de entrada de ribosomas internos (IRES), potenciadores, uniones de empalme y similares, que colectivamente

proporcionan la replicación, transcripción, procesamiento postranscripcional y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No es necesario que todos estos elementos de control estén presentes siempre que la secuencia de codificación seleccionada pueda replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada.

El término "promotor" se usa en el presente documento en su sentido ordinario para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, en la que la secuencia reguladora se deriva de un gen que es capaz de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una cadena de codificación secuencia abajo (dirección 3'). Puede contener elementos genéticos a los que se pueden unir proteínas y moléculas reguladoras, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácido nucleico. Las frases "posicionado operativamente", "unido operativamente", "bajo control" y "bajo control transcripcional" significan que un promotor está en una ubicación y/u orientación funcional correcta en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio transcripcional y/o la expresión de esa secuencia.

Por "potenciador" se entiende una secuencia de ácido nucleico que, cuando se coloca cerca de un promotor, confiere una mayor actividad de transcripción en relación con la actividad de transcripción resultante del promotor en ausencia del dominio potenciador.

Por "unido operativamente" o coexpresado con referencia a moléculas de ácido nucleico se entiende que dos o más moléculas de ácido nucleico (p. ej., una molécula de ácido nucleico que se va a transcribir, un promotor y un elemento potenciador) están conectadas de tal manera que permitan la transcripción de la molécula de ácido nucleico. "Unido operativamente" o "coexpresado" con referencia a moléculas peptídicas y/o polipeptídicas significa que dos o más moléculas peptídicas y/o polipeptídicas están conectadas de tal manera que para producir una única cadena polipeptídica, es decir, un polipéptido de fusión, que tiene al menos una propiedad de cada componente peptídico y/o polipeptídico de la fusión. El polipéptido de fusión es preferiblemente quimérico, es decir, compuesto por moléculas heterólogas.

"Homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o dos polipéptidos. La correspondencia entre una secuencia y otra puede determinarse mediante técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, la homología se puede determinar mediante una comparación directa de la información de la secuencia entre dos moléculas polipeptídicas alineando la información de la secuencia y utilizando programas informáticos fácilmente disponibles. Alternativamente, la homología se puede determinar por hibridación de polinucleótidos en condiciones que promuevan la formación de dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa o nucleasas específicas monocatenarias y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Dos secuencias de ADN, o de dos polipéptidos, son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando al menos aproximadamente el 80 %, preferiblemente al menos aproximadamente el 90 %, y lo más preferiblemente aproximadamente al menos el 95 % de los nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, coinciden en una longitud definida de las moléculas, determinada usando los métodos anteriores.

El término "célula" se usa en el presente documento en su sentido más amplio en la técnica y se refiere a un cuerpo vivo que es una unidad estructural de tejido de un organismo multicelular, está rodeado por una estructura de membrana que lo aísla del exterior, tiene la capacidad de autorreplicarse, y tiene información genética y un mecanismo para expresarla. Las células utilizadas en el presente documento pueden ser células naturales o células modificadas artificialmente (p. ej., células de fusión, células modificadas genéticamente, etc.).

El término "célula madre" se refiere en el presente documento a una célula que, en condiciones adecuadas, es capaz de diferenciarse en una amplia gama de tipos de células especializadas, mientras que, en otras condiciones adecuadas, es capaz de autorrenovarse y permanecer en un estado pluripotente esencialmente no diferenciado. El término "célula madre" también abarca una célula pluripotente, una célula multipotente, una célula precursora y una célula progenitora. Ejemplos de células madre humanas pueden obtenerse a partir de células madre hematopoyéticas o mesenquimales obtenidas de tejido de la médula ósea, células madre embrionarias obtenidas de tejido embrionario (sin destrucción de embriones humanos) o células germinales embrionarias obtenidas de tejido genital de un feto (sin destrucción de embriones humanos). Los ejemplos de células madre pluripotentes también se pueden producir a partir de células somáticas reprogramándolas a un estado pluripotente mediante la expresión de ciertos factores de transcripción asociados con la pluripotencia; estas células se denominan "células madre pluripotentes inducidas" o "células iPSC o iPS".

Una "célula madre embrionaria (ES)" es una célula pluripotente no diferenciada que se obtiene de un embrión en una etapa temprana (sin destrucción de embriones humanos), tal como la masa celular interna en la etapa de blastocisto, o producida por medio artificial (p. ej., transferencia nuclear) y puede dar lugar a cualquier tipo de célula diferenciada en un embrión o en un adulto, incluidas las células germinales (p. ej., espermatozoides y óvulos).

Las "células madre pluripotentes inducidas (células iPSC o iPS)" son células generadas mediante la reprogramación de una célula somática expresando o induciendo la expresión de una combinación de factores (en el presente documento denominados factores de reprogramación). Las células iPS se pueden generar usando células somáticas

fetales, posnatales, de recién nacido, juveniles o adultas. En ciertas realizaciones, los factores que se pueden usar para reprogramar células somáticas en células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, Oct4 (a veces denominado Oct 3/4), Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog y Lin28. En algunas realizaciones, las células somáticas se reprograman expresando al menos dos factores de reprogramación, al menos tres factores de reprogramación, al menos cuatro factores de reprogramación, al menos cinco factores de reprogramación, al menos seis factores de reprogramación o al menos siete factores de reprogramación para reprogramar una célula somática en una célula madre pluripotente.

"Células progenitoras hematopoyéticas" o "células precursoras hematopoyéticas" se refiere a células que están comprometidas con un linaje hematopoyético pero que son capaces de una mayor diferenciación hematopoyética e incluyen células madre hematopoyéticas, células madre hematopoyéticas multipotenciales, progenitores mieloides comunes, progenitores de megacariocitos, progenitores de eritrocitos y progenitores linfoides. Las células madre hematopoyéticas (HSC) son células madre multipotentes que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas, incluidos mieloides (monocitos y macrófagos, granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos y mastocitos), eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linajes linfoides (células T, células B, células NK) (véase, por ejemplo, Doulatov et al., 2012; Notta et al., 2015). Un "progenitor multilinfoide" (MLP) se define para describir cualquier progenitor que da lugar a todos los linajes linfoides (células B, T y NK), pero que puede o no tener otros potenciales (mieloide) (Doulatov et al., 2010) y es CD45RA⁺/CD10⁺/CD7⁻. Cualquier progenitor de B, T y NK puede denominarse MLP. Un "progenitor mieloide común" (CMP) se refiere a un progenitor mieloide común que se define por la expresión de células CD45⁺/CD31⁺/CD43⁺/CD34⁻ que pueden dar lugar a granulocitos, monocitos, megacariocitos y eritrocitos. Las células progenitoras hematopoyéticas pueden expresar CD34. Las células progenitoras hematopoyéticas pueden coexpresar CD133 y ser negativas para la expresión de CD38. Las células precursoras hematopoyéticas incluyen células precursoras hematopoyéticas CD34⁺/CD45⁺ y células precursoras hematopoyéticas CD34⁺/CD45⁺/CD43⁺. Las células precursoras hematopoyéticas CD34⁺/CD43⁺/CD45⁺ pueden estar muy enriquecidas en progenitores mieloides. Las células hematopoyéticas también incluyen varios subconjuntos de células hematopoyéticas primitivas que incluyen: células CD34⁺/CD133⁺/CD38⁻ (células precursoras hematopoyéticas primitivas), CD43(+)/CD235a(+)/CD41a(+/-) (eritro-megacariopoyéticas), lin(-)/CD34(+)/CD43(+)/CD45(-) (multipotentes) y lin(-)/CD34(+)/CD43(+)/CD45(+) (sesgadas mieloides), CD133+/ALDH+ (aldehidohidrogenasa). Se anticipa que cualquiera de estos tipos de células hematopoyéticas primitivas o células precursoras hematopoyéticas se pueden convertir en células iPS como se describe en este documento. En algunos aspectos, las células pueden incluir mastocitos, células de Langerhans, osteoclastos, células NK, células T, células T CIK u otros subtipos de células T, células NK y células B.

Como se usa en el presente documento, el término "célula o células inmunitarias" se refiere a células del sistema inmunitario, incluidas, entre otras, células T, células NK, células T/NK, células dendríticas, macrófagos, células B, neutrófilos, eritrocitos, monocitos, basófilos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y cualquier combinación de los mismos.

Un "activador" de una célula T o una condición que activará una célula T se refiere a un estímulo que activa las células T e incluye antígenos, que pueden presentarse en células presentadoras de antígenos o en otras superficies; activadores policlonales, que se unen a muchos complejos de receptores de células T (TCR) independientemente de su especificidad, e incluyen lectinas, por ejemplo, concanavalina-A (Con-A) y fitohemaglutinina (PHA) y agentes tales como anticuerpos que se unen específicamente a epítopos marco invariantes en proteínas TCR o CD3; y superantígenos, que estimulan un número significativo de células T e incluyen, por ejemplo, enterotoxinas, tales como enterotoxinas estafilocócicas.

Los términos "linfocito T" y "célula T" se usan indistintamente y se refieren a una célula que expresa un TCR capaz de reconocer antígeno cuando se muestra en la superficie de células presentadoras de antígeno o matriz junto con una o más moléculas del MHC o, una o más moléculas del MHC no clásicas.

El término "célula T" se refiere a los linfocitos T como se define en la técnica y pretende incluir timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo o linfocitos T activados. Las células T pueden ser células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T CD4⁺CD8⁺ o células CD4⁻CD8⁻. Las células T también pueden ser células T cooperadoras, tales como las células T cooperadoras 1 (TH1), o las células T cooperadoras 2 (TH2), o las células TH17, así como las células T citotóxicas, las células T reguladoras, las células T asesinas naturales, las células T no modificadas, células T de memoria o células T gamma delta (Wilson et al., 2009; Wynn, 2005; Ladi et al., 2006). Las células T que se diferencian entre sí por al menos un marcador, tal como CD4, se denominan en el presente documento "subconjuntos" de células T.

"Células T CD4⁺" se refiere a un subconjunto de células T que expresan CD4 en su superficie y están asociadas con una respuesta inmunitaria mediada por células. Se caracterizan por los perfiles de secreción que siguen a la estimulación, que pueden incluir la secreción de citocinas tales como IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-4 e IL-10. "CD4" son glicoproteínas de 55 kD definidas originalmente como antígenos de diferenciación en los linfocitos T, pero también se encuentran en otras células, incluidos los monocitos/macrófagos. Los antígenos CD4 son miembros de la familia de supergenes de inmunoglobulina y están implicados como elementos de reconocimiento asociativo en las

respuestas inmunitarias restringidas del MHC (complejo principal de histocompatibilidad) de clase II. En los linfocitos T, definen el subconjunto colaborador/inductor.

Las "células T CD8⁺" se refieren a un subconjunto de células T que expresan CD8 en su superficie, están restringidas por el MHC de clase I y funcionan como células T citotóxicas. Las moléculas "CD8" son antígenos de diferenciación que se encuentran en los timocitos y en los linfocitos T citotóxicos y supresores. Los antígenos CD8 son miembros de la familia de supergenes de inmunoglobulina y son elementos de reconocimiento asociativos en interacciones restringidas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I.

"Célula madre pluripotente" se refiere a una célula madre que tiene el potencial de diferenciarse en todas las células que constituyen uno o más tejidos u órganos, o preferiblemente, cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, los pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, urogenital) o ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso).

Como se usa en el presente documento, el término "célula somática" se refiere a cualquier célula distinta de las células germinales, tales como un óvulo, un espermatozoide o similares, que no transfiere directamente su ADN a la siguiente generación. Típicamente, las células somáticas tienen una pluripotencia limitada o nula. Las células somáticas usadas en el presente documento pueden ser naturales o modificadas genéticamente.

La "programación" es un proceso que altera el tipo de progenie que puede producir una célula. Por ejemplo, una célula ha sido programada cuando ha sido alterada para que pueda formar descendencia de al menos un nuevo tipo de célula, ya sea en cultivo o *in vivo*, en comparación con lo que habría podido formar en las mismas condiciones sin programación. Esto significa que después de una proliferación suficiente, se observa una proporción mensurable de progenie que tiene características fenotípicas del nuevo tipo celular, si es que esencialmente no se podría formar tal progenie antes de la programación; alternativamente, la proporción que tiene características del nuevo tipo celular es considerablemente mayor que antes de la programación. Este proceso incluye la diferenciación, la desdiferenciación y la transdiferenciación.

La "diferenciación" es el proceso por el cual una célula menos especializada se convierte en un tipo de célula más especializado. La "desdiferenciación" es un proceso celular en el que una célula diferenciada parcial o terminalmente vuelve a una etapa de desarrollo anterior, tal como pluripotencia o multipotencia. La "transdiferenciación" es un proceso de transformación de un tipo de célula diferenciada en otro tipo de célula diferenciada. Típicamente, la transdiferenciación por programación ocurre sin que las células pasen por una etapa intermedia de pluripotencia, es decir, las células se programan directamente de un tipo de célula diferenciada a otro tipo de célula diferenciada. Bajo ciertas condiciones, la proporción de progenie con características del nuevo tipo celular puede ser de al menos aproximadamente 1%, 5%, 25% o más en orden de preferencia creciente.

La "reprogramación" es un proceso que confiere a una célula una capacidad mensurablemente mayor para formar descendencia de al menos un nuevo tipo de célula, ya sea en cultivo o *in vivo*, que la que tendría en las mismas condiciones sin reprogramación. Más concretamente, la reprogramación es un proceso que confiere a una célula somática un potencial pluripotente. Esto significa que después de una proliferación suficiente, una proporción medible de la progenie tiene características fenotípicas del nuevo tipo celular, si esencialmente no se podría formar tal progenie antes de la reprogramación; de lo contrario, la proporción que tiene características del nuevo tipo celular es considerablemente mayor que antes de la reprogramación. Bajo ciertas condiciones, la proporción de progenie con características del nuevo tipo celular puede ser de al menos aproximadamente 1%, 5%, 25% o más en orden de preferencia creciente.

El término "programación directa" se refiere a la programación de una célula multipotente o pluripotente, a diferencia de una célula somática diferenciada que no tiene pluripotencia, mediante la provisión de uno o más genes determinantes del linaje o productos génicos específicos para la célula multipotente o pluripotente. Por ejemplo, la programación directa puede describir el proceso de programación de ESC o iPSC en células precursoras hematopoyéticas u otras células precursoras, o en células hematopoyéticas u otras células somáticas diferenciadas.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "sujeto que lo necesita" se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano, hombre o mujer de cualquier edad que necesita un trasplante de células o tejidos. Normalmente, el sujeto es que necesita un trasplante de células o tejidos (también denominado en el presente documento como receptor) debido a un trastorno o una condición, estado o síndrome patológico o no deseado, o una anomalía física, morfológica o fisiológica que es susceptible de tratamiento mediante trasplante de células o tejidos.

Como se usa en el presente documento, una "interrupción" de un gen se refiere a la eliminación o reducción de la expresión de uno o más productos génicos codificados por el gen en cuestión en una célula, en comparación con el nivel de expresión del producto génico en ausencia de la interrupción. Los ejemplos de productos génicos incluyen ARNm y productos proteicos codificados por el gen. La interrupción en algunos casos es transitoria o reversible y en otros casos es permanente. La interrupción en algunos casos es de una proteína o ARNm funcional o de longitud completa, a pesar de que se puede producir un producto truncado o no funcional. En algunas realizaciones del

presente documento, se interrumpe la actividad o función del gen, en oposición a la expresión. La alteración génica generalmente se induce mediante métodos artificiales, es decir, mediante la adición o introducción de un compuesto, molécula, complejo o composición, y/o mediante la alteración del ácido nucleico del gen o asociado con él, tal como a nivel de ADN. Los ejemplos de métodos para la interrupción de genes incluyen técnicas de silenciamiento de genes, inactivación, eliminación y/o interrupción de genes, tales como edición de genes. Los ejemplos incluyen tecnología antisentido, tal como ARNi, ARNpi, ARNph y/o ribozimas, que generalmente dan como resultado una reducción transitoria de la expresión, así como técnicas de edición de genes que dan como resultado la inactivación o interrupción de genes específicos, por ejemplo, por inducción de roturas y/o recombinación homóloga. Los ejemplos incluyen inserciones, mutaciones y eliminaciones. Las interrupciones típicamente dan como resultado la represión y/o la ausencia completa de expresión de un producto normal o de "tipo silvestre" codificado por el gen. Ejemplos de dichas alteraciones génicas son las inserciones, el cambio de marco y las mutaciones de sentido erróneo, las eliminaciones, la inserción y eliminación del gen o parte del gen, incluidas las eliminaciones del gen completo. Tales interrupciones pueden ocurrir en la región de codificación, por ejemplo, en uno o más exones, dando como resultado la incapacidad de producir un producto de longitud completa, un producto funcional o cualquier producto, tal como por ejemplo mediante la inserción de un codón de parada. Tales interrupciones también pueden ocurrir por interrupciones en el promotor o potenciador u otra región que afecta la activación de la transcripción, para evitar la transcripción del gen. Las interrupciones de genes incluyen el direccionamiento de genes, incluida la inactivación dirigida a los genes mediante recombinación homóloga.

El "ligando Notch" es una proteína capaz de unirse a un polipéptido receptor Notch presente en la membrana de varias células de mamífero diferentes, tales como células madre hematopoyéticas. Los receptores Notch que se han identificado en células humanas incluyen Notch-1, Notch-2, Notch-3 y Notch-4. Los ligandos Notch suelen tener un dominio DSL (D-Delta, S-Serrate y L-Lag2) que comprende de 20 a 22 aminoácidos en el extremo terminal amino y entre 3 y 8 repeticiones similares a EGF (Furie y Furie, 1988; Knust et al., 1987; Suzuki et al., 1987) en la superficie extracelular.

Los "súper donantes" se denominan en el presente documento individuos que son homocigotos para ciertos genes del MHC de clase I y II. Estos individuos homocigotos pueden servir como superdonantes y sus células, incluidos los tejidos y otros materiales que componen sus células, pueden trasplantarse en individuos que son homocigotos o heterocigotos para ese haplotipo. El superdonante puede ser homocigoto para los alelos de locus/loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP o HLA-DQ, respectivamente.

El término "receptores de antígenos quiméricos (CAR)", como se usa en el presente documento, puede referirse a receptores de células T artificiales, receptores quiméricos de células T o inmunorreceptores quiméricos, por ejemplo, y abarcan receptores modificados que injertan una especificidad artificial en una célula efectora inmunitaria particular. Los CAR pueden emplearse para impartir la especificidad de un anticuerpo monoclonal a una célula T, lo que permite generar un gran número de células T específicas, por ejemplo, para su uso en terapia celular adoptiva. En realizaciones específicas, los CAR dirigen la especificidad de la célula a un antígeno asociado a un tumor, por ejemplo. En algunas realizaciones, los CAR comprenden un dominio de activación intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno asociada a tumor. En aspectos particulares, los CAR comprenden fusiones de fragmentos variables monocatenarios (scFv) derivados de anticuerpos monoclonales, fusionados con CD3-zeta, un dominio y endodominio transmembrana. La especificidad de otros diseños de CAR puede derivarse de ligandos de receptores (p. ej., péptidos) o de receptores de reconocimiento de patrones, tales como Dectinas. En ciertos casos, el espaciado del dominio de reconocimiento de antígeno puede modificarse para reducir la muerte celular inducida por la activación. En ciertos casos, los CAR comprenden dominios para señalización coestimuladora adicional, tal como CD3ζ, FcR, CD27, CD28, CD137, DAP10 y/u OX40. En algunos casos, las moléculas se pueden coexpresar con CAR, incluidas las moléculas coestimuladoras, los genes informadores para la obtención de imágenes (por ejemplo, para tomografía de emisión de positrones), productos génicos que ablacionan condicionalmente las células T tras la adición de un profármaco receptores buscadores de blancos, quimiocinas, receptores de quimiocinas, citocinas y receptores de citocinas.

El término "células presentadoras de antígeno (APC)" se refiere a una clase de células capaces de presentar uno o más antígenos en forma de complejo péptido-MHC reconocible por células efectoras específicas del sistema inmunitario y, por lo tanto, una respuesta inmunitaria celular eficaz contra el antígeno o antígenos que se presentan. Las APC pueden ser células completas intactas, tales como macrófagos, células B, células endoteliales, células T activadas y células dendríticas; u otras moléculas, naturales o sintéticas, tales como moléculas del MHC clase I purificadas complejadas con β2-microglobulina. Si bien muchos tipos de células pueden ser capaces de presentar antígenos en su superficie celular para el reconocimiento de células T, solo las células dendríticas tienen la capacidad de presentar antígenos en una cantidad eficiente para activar las células T no modificadas para las respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL).

II. Células madre pluripotentes

En ciertas realizaciones, las células madre pluripotentes se modifican para expresar un receptor antigénico, tal como un CAR. Las (dichas) células madre pluripotentes pueden ser células madre que incluyen, entre otras, células madre pluripotentes inducidas y células madre embrionarias no humanas. En aspectos particulares, las células madre

pluripotentes utilizadas en el presente documento son células madre embrionarias no humanas (ESC) o células madre pluripotentes inducidas (iPSC) que son capaces de proliferación a largo plazo *in vitro*, al tiempo que conservan el potencial de diferenciarse en todos los tipos de células del cuerpo, incluidas las células precursoras hematopoyéticas de la presente divulgación.

A. Células madre embrionarias

En ciertos aspectos, las células madre pluripotentes son ESC. Las células ES pueden derivarse de la masa celular interna de los blastocistos (sin destrucción de embriones humanos) y tienen una alta capacidad de diferenciación *in vitro*. Las células ES pueden aislarse eliminando la capa externa del trofotodermo de un embrión en desarrollo y luego cultivando las células de la masa interna en una capa alimentadora de células que no crecen. Las células nuevamente sembradas en placa pueden seguir proliferando y producir nuevas colonias de células ES que se pueden eliminar, disociar, volver a sembrar y permitir que crezcan. Este proceso de "subcultivo" de células ES no diferenciadas puede repetirse varias veces para producir líneas celulares que contienen células ES no diferenciadas (patentes de los Estados Unidos Nos. 5.843.780; 6.200.806; 7.029.913). Las células ES tienen el potencial de proliferar mientras mantienen su pluripotencia. Por ejemplo, las células ES son útiles en investigación de células y genes que controlan la diferenciación celular. La pluripotencia de las células ES combinada con la manipulación y selección genética se puede utilizar para estudios de análisis de genes *in vivo* a través de la generación de ratones transgénicos, quiméricos y con eliminación de genes.

Los métodos para producir células ES de ratón son bien conocidos. En un método, un blastocisto de preimplantación de la cepa 129 de ratón se trata con antisero de ratón para eliminar el trofotodermo, y la masa celular interna se cultiva en una capa de células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados químicamente en un medio que contiene suero fetal de ternera. Las colonias de células ES no diferenciadas que se desarrollan se subcultivan en capas alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón en presencia de suero de ternera fetal para producir poblaciones de células ES. En algunos métodos, las células ES de ratón se pueden cultivar en ausencia de una capa alimentadora agregando el factor inhibidor de leucemia de citocinas (LIF) al medio de cultivo que contiene suero. En otros métodos, las células ES de ratón se pueden cultivar en medio sin suero en presencia de proteína morfogenética ósea y LIF.

En la presente invención, la producción de células ES humanas no implica la destrucción de embriones humanos. En general, las células ES humanas se pueden producir o derivar de un embrión de mamífero en etapa de cigoto o blastocisto producido por la fusión de un espermatozoide y un óvulo, la transferencia nuclear, la patogénesis o la reprogramación de la cromatina y la posterior incorporación de la cromatina reprogramada en una membrana plasmática para producir una célula embrionaria mediante métodos previamente descritos (Thomson y Marshall, 1998; Reubinoff et al., 2000). En un método (no reivindicado), los blastocistos humanos se exponen a suero antihumano, y las células trofotodérmicas se lisan y extraen de la masa celular interna que se cultiva en una capa alimentadora de fibroblastos embrionarios de ratón. Además, los grupos de células derivadas de la masa celular interna se disocian química o mecánicamente, se vuelven a sembrar y las colonias con morfología no diferenciada se seleccionan mediante micropipeta, se disocian y se vuelven a sembrar. En algunos métodos, las células ES humanas se pueden cultivar sin suero cultivando las células ES en una capa alimentadora de fibroblastos en presencia del factor de crecimiento de fibroblastos básico. En otros métodos, las células ES humanas se pueden cultivar sin una capa de células alimentadoras cultivando las células en una matriz proteica tal como MATRIGEL^{MC} o laminina en presencia de un medio "acondicionado" que contiene factor de crecimiento de fibroblastos básico (Xu et al., 2001).

Las células ES también se pueden derivar de otros organismos, incluidos el mono rhesus y el tití mediante métodos descritos anteriormente (Thomson y Marshall, 1998; Thomson et al., 1995; Thomson y Odorico, 2000; patente de los Estados Unidos No. 5.843.780), así como de líneas celulares humanas y de ratón establecidas. Por ejemplo, las líneas celulares ES humanas establecidas incluyen MAOI, MA09, ACT-4, HI, H7, H9, H13, H14 y ACT30. Como otro ejemplo, las líneas de células ES de ratón que se han establecido incluyen la línea de células CGR8 establecida a partir de la masa celular interna de los embriones de la cepa 129 de ratón, y los cultivos de células CGR8 se pueden cultivar en presencia de LIF sin capas alimentadoras.

Las células madre ES pueden detectarse mediante marcadores proteicos que incluyen el factor de transcripción Oct4, fosfatasa alcalina (AP), antígeno embrionario específico de la etapa SSEA-1, antígeno embrionario específico de la etapa SSEA-3, antígeno embrionario específico de la etapa SSEA-4, factor de transcripción NANOG, antígeno de rechazo tumoral 1-60 (TRA-1-60), antígeno de rechazo tumoral 1-81 (TRA-1-81), SOX2 o REX1.

B. Células madre pluripotentes inducidas

En otros aspectos, las células madre pluripotentes utilizadas en el presente documento son células madre pluripotentes inducidas (iPS), comúnmente abreviadas como células iPS o iPSC. La inducción de la pluripotencia se logró originalmente en 2006 utilizando células de ratón (Yamanaka et al., 2006) y en 2007 utilizando células humanas (Yu et al., 2007; Takahashi et al., 2007) mediante la reprogramación de células somáticas a través de la introducción de factores de transcripción que están relacionados con la pluripotencia. El uso de iPSC evita la

mayoría de los problemas éticos y prácticos asociados con el uso clínico a gran escala de células ES, y es posible que los pacientes con trasplantes autólogos derivados de iPSC no requieran tratamientos inmunosupresores de por vida para prevenir el rechazo del injerto.

Con la excepción de las células germinales, cualquier célula puede usarse como punto de partida para las iPSC. Por ejemplo, los tipos de células podrían ser queratinocitos, fibroblastos, células hematopoyéticas, células mesenquimales, células hepáticas o células estomacales. Las células T también se pueden usar como fuente de células somáticas para la reprogramación (patente de los Estados Unidos No. 8.741.648). No hay limitación sobre el grado de diferenciación celular o la edad de un animal del que se recolectan las células; incluso las células progenitoras no diferenciadas (incluidas las células madre somáticas) y finalmente las células maduras diferenciadas pueden usarse como fuentes de células somáticas en los métodos divulgados en el presente documento.

Las células somáticas se pueden reprogramar para producir iPSC usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Un experto en la técnica puede producir fácilmente células madre pluripotentes inducidas, véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos No. 20090246875, la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 2010/0210014; solicitud de patente publicada de los Estados Unidos No. 20120276636; patente de los Estados Unidos N° 8.058.065; patente de Estados Unidos N° 8.129.187; patente de los Estados Unidos N° 8.268.620; publicación PCT No. WO 2007/069666 A1 y patente de Estados Unidos N° 8.268.620. Generalmente, los factores de reprogramación nuclear se utilizan para producir células madre pluripotentes a partir de una célula somática. En algunas realizaciones, se utilizan al menos tres o al menos cuatro de Klf4, c-Myc, Oct3/4, Sox2, Nanog y Lin28. En otras realizaciones, se utilizan Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4.

Las secuencias de ADNc humanas y de ratón de estas sustancias de reprogramación nuclear están disponibles con referencia a los números de acceso del NCBI mencionados en el documento WO 2007/069666 y la patente de los Estados Unidos No. 8.183.038. Los métodos para introducir una o más sustancias de reprogramación, o ácidos nucleicos que codifican estas sustancias de reprogramación, se conocen en la técnica y se divulgan, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 8.268.620, 8.691.574, 8.741.648, 8.546.140, en la patente publicada de los Estados Unidos No. 8.900.871 y en la patente de los Estados Unidos No. 8.071.369.

Una vez derivadas, las iPSC pueden cultivarse en un medio suficiente para mantener la pluripotencia. Las iPSC pueden usarse con varios medios y técnicas desarrolladas para cultivar células madre pluripotentes, más específicamente, células madre embrionarias, como se describe en la patente de los Estados Unidos 7.442.548 y la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2003/0211603. En el caso de células de ratón, el cultivo se realiza con la adición del factor Inhibidor de Leucemia (LIF) como factor de supresión de la diferenciación a un medio ordinario. En el caso de células humanas, es deseable que se añada factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en lugar de LIF. Con los presentes métodos se pueden usar otros métodos para el cultivo y mantenimiento de iPSC, como sería conocido por un experto en la técnica.

En ciertas realizaciones, se pueden usar condiciones indefinidas; por ejemplo, las células pluripotentes pueden cultivarse en células alimentadoras de fibroblastos o en un medio que ha sido expuesto a células alimentadoras de fibroblastos para mantener las células madre en un estado no diferenciado. En algunas realizaciones, la célula se cultiva en presencia conjunta de fibroblastos embrionarios de ratón tratados con radiación o un antibiótico para terminar la división celular, como células alimentadoras. Alternativamente, las células pluripotentes pueden cultivarse y mantenerse en un estado esencialmente no diferenciado utilizando un sistema de cultivo definido e independiente del alimentador, tal como un medio TESR^{MC} (Ludwig et al., 2006a; Ludwig et al., 2006b) o medio E8^{MC}/Essential 8^{MC} (Chen et al., 2011).

Los plásmidos se han diseñado con una serie de objetivos en mente, tal como lograr un alto número de copias regulado y evitar posibles causas de inestabilidad de plásmidos en bacterias, y proporcionar medios para la selección de plásmidos que sean compatibles con el uso en células de mamíferos, incluidas las células humanas. Se ha prestado especial atención a los requisitos duales de los plásmidos para su uso en células humanas. En primer lugar, son adecuados para el mantenimiento y la fermentación en *E. coli*, de modo que se puedan producir y purificar grandes cantidades de ADN. En segundo lugar, son seguros y adecuados para su uso en pacientes humanos y animales. El primer requisito exige plásmidos con un alto número de copias que puedan seleccionarse y mantenerse estables con relativa facilidad durante la fermentación bacteriana. El segundo requisito llama la atención sobre elementos tales como marcadores seleccionables y otras secuencias de codificación. En algunas realizaciones, los plásmidos que codifican un marcador se componen de: (1) un origen de replicación de alto número de copias, (2) un marcador seleccionable, tal como, pero no se limitan a, el gen neo para la selección de antibióticos con kanamicina, (3) secuencias de terminación de la transcripción, incluido el potenciador de tirosinasa y (4) un sitio de clonación múltiple para la incorporación de varios casetes de ácido nucleico; y (5) una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador ligado operativamente al promotor de tirosinasa. Existen numerosos vectores de plásmidos que se conocen en la técnica para inducir un ácido nucleico que codifica una proteína. Estos incluyen, pero no se limitan a, los vectores divulgados en la patente de los Estados Unidos No. 6,103,470; patente de los Estados Unidos No. 7.598.364; patente de los Estados Unidos No. 7.989.425; y patente de los Estados Unidos No. 6.416.998.

Un sistema de suministro de genes episomales puede ser un plásmido, un vector episomal basado en el virus de Epstein-Barr (EBV) (patente de los Estados Unidos No. 8.546.140), un vector basado en levadura, un vector basado en adenovirus, un vector episomal basado en el virus de simio 40 (SV40), un vector basado en el virus del papiloma bovino (BPV), o un vector lentiviral. Un sistema de suministro de genes virales puede ser un vector viral basado en ARN o basado en ADN.

1. células para la producción de iPSC

Ciertas realizaciones de la presente divulgación se refieren a una población inicial de células somáticas (p. ej., células sanguíneas o células de la piel) que se reprograman en iPSC. La población de células sanguíneas puede incluir células mononucleares de sangre periférica (PBMC), sangre completa o fracciones de la misma que contienen poblaciones mixtas, células de bazo, células de médula ósea, linfocitos que se infiltran en tumores, células obtenidas por leucoféresis, tejido de biopsia y ganglios linfáticos, por ejemplo, ganglios linfáticos que drenan de un tumor. Los donantes adecuados incluyen donantes inmunizados, donantes no inmunizados (no modificados), donantes tratados o no tratados. Un donante "tratado" es aquel que ha estado expuesto a uno o más modificadores biológicos. Un donante "no tratado" no ha estado expuesto a uno o más modificadores biológicos.

En algunos aspectos, la población de células sanguíneas comprende células T. Las células T pueden ser una población purificada de células T o, alternativamente, las células T pueden estar en una población con células de un tipo diferente, tal como células B y/u otras células de sangre periférica. Las células T pueden ser una población purificada de un subconjunto de células T, tal como las células T CD4⁺, o pueden ser una población de células T que comprende diferentes subconjuntos de células T. En otra realización, las células T son clones de células T que se han mantenido en cultivo durante periodos de tiempo prolongados. Los clones de células T se pueden transformar en diferentes grados. En una realización específica, las células T son un clon de células T que prolifera indefinidamente en cultivo.

En algunos aspectos, las células T son células T primarias. El término "células T primarias" pretende incluir células T obtenidas de un individuo, en contraposición a las células T que se han mantenido en cultivo durante periodos prolongados de tiempo. Por lo tanto, las células T primarias son particularmente células T de sangre periférica obtenidas de un sujeto. Una población de células T primarias puede estar compuesta principalmente por un subconjunto de células T. Alternativamente, la población de células T primarias puede estar compuesta por diferentes subconjuntos de células T.

Las células T pueden ser de muestras de sangre previamente almacenadas, de un individuo sano o, alternativamente, de un individuo afectado por una afección. La afección puede ser una enfermedad infecciosa, tal como una condición resultante de una infección viral, una infección bacteriana o una infección por cualquier otro microorganismo, o una enfermedad hiperproliferativa, tal como un cáncer tipo melanoma. En una realización específica, las células T son de un individuo infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). En aún otra realización, las células T son de un sujeto que padece o es susceptible de padecer una enfermedad autoinmune o patologías de células T. Las células T pueden ser de origen humano, de origen murino o de cualquier otra especie de mamífero.

Los métodos para obtener poblaciones de células que comprenden células T son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se pueden obtener como se describe de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de dichos métodos se exponen en los Ejemplos y se analizan en Kim et al., (1992); Biswas et al., (1990); Biswas et al., (1991).

En algunos aspectos, la población inicial de células sanguíneas comprende células madre hematopoyéticas (HSC). Las HSC normalmente residen en la médula ósea, pero pueden ser forzadas a pasar a la sangre, un proceso denominado movilización que se usa clínicamente para recolectar grandes cantidades de HSC en la sangre periférica. Un agente movilizador de elección es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Las células madre hematopoyéticas CD34⁺ o progenitoras que circulan en la sangre periférica pueden recogerse mediante técnicas de aféresis en estado imperturbable o tras la movilización después de la administración externa de factores de crecimiento hematopoyéticos tipo G-CSF. El número de células madre o progenitoras recogidas tras la movilización es mayor que el obtenido tras la aféresis en estado no perturbado. En algunos aspectos, la fuente de la población celular es un sujeto cuyas células no han sido movilizadas por factores aplicados extrínsecamente porque no hay necesidad de enriquecer células madre hematopoyéticas o células progenitoras.

Los métodos para obtener células precursoras hematopoyéticas a partir de poblaciones de células también son bien conocidos en la técnica. Las células precursoras hematopoyéticas pueden expandirse usando diversas citocinas, tales como hSCF, hFLT3 y/o IL-3 (Akina et al., 1996), o las células CD34⁺ pueden enriquecerse usando MACS o FACS. Como se mencionó anteriormente, también pueden usarse técnicas de selección negativa para enriquecer células CD34⁺.

Las poblaciones de células para usar en los métodos descritos en el presente documento pueden ser células de mamíferos, tales como células humanas, células de primates no humanos, células de roedores (p. ej., ratón o rata),

- células bovinas, células ovinas, células porcinas, células equinas, células de oveja, células caninas y células felinas o una mezcla de las mismas. Las células de primates no humanos incluyen células de macaco rhesus. Las células pueden obtenerse de un animal, por ejemplo, un paciente humano, o pueden ser de líneas celulares. Si las células se obtienen de un animal, pueden usarse como tales, por ejemplo, como células no separadas (es decir, una población mixta); pueden haberse establecido primero en el cultivo, por ejemplo, por transformación; o pueden haber sido sometidas a métodos preliminares de purificación. Por ejemplo, una población de células puede manipularse mediante selección positiva o negativa basada en la expresión de marcadores de superficie celular; estimulada con uno o más antígenos *in vitro* o *in vivo*; tratada con uno o más modificadores biológicos *in vitro* o *in vivo*; o una combinación de cualquiera o todos estos. En una realización ilustrativa, una población de células se somete a selección negativa para el agotamiento de células no T y/o subconjuntos de células T particulares. La selección negativa se puede realizar sobre la base de la expresión en la superficie de la célula de una variedad de moléculas, incluidos marcadores de células B tales como CD19 y CD20; marcador de monocitos CD14; el marcador de células NK CD56. Alternativamente, una población de células puede someterse a selección negativa para el agotamiento de células hematopoyéticas no CD34⁺ y/o subconjuntos de células hematopoyéticas particulares. La selección negativa se puede realizar sobre la base de la expresión en la superficie de la célula de una variedad de moléculas, tal como un cóctel de anticuerpos (por ejemplo, CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, CD235a y CD41 (por ejemplo, para células de linaje de megacariocitos) que pueden usarse para la separación de otros tipos de células, por ejemplo, a través de MACS o separación en columna.
- También es posible obtener una muestra de células de un sujeto y luego enriquecerla para un tipo de célula deseado. Por ejemplo, las PBMC y/o las células hematopoyéticas CD34⁺ pueden aislarse de la sangre como se describe en el presente documento. La centrifugación a contracorriente (elutriación) se puede utilizar para enriquecer las células T a partir de las PBMC. Las células también se pueden aislar de otras células usando una variedad de técnicas, tales como el aislamiento y/o la activación con un anticuerpo que se une a un epítipo en la superficie celular del tipo de célula deseado, por ejemplo, algunos kits de aislamiento de células T usan perlas conjugadas con anticuerpos para activar las células y luego permitir la separación en columna con las mismas perlas. Otro método que se puede usar incluye la selección negativa usando anticuerpos contra marcadores de superficie celular para enriquecer selectivamente un tipo de célula específico sin activar la célula mediante la asociación con el receptor.
- Las células de la médula ósea se pueden obtener de la cresta ilíaca, fémur, tibia, columna vertebral, costilla u otros espacios medulares. La médula ósea puede extraerse del paciente y aislarse a través de varias separaciones y procedimientos de lavado. Un procedimiento conocido para el aislamiento de células de médula ósea comprende las siguientes etapas: a) separación por centrifugación de la suspensión de médula ósea en tres fracciones y recolección de la fracción intermedia, o capa leucocitaria; b) la fracción de la capa leucocitaria de la etapa (a) se centrifuga una vez más en un fluido de separación, comúnmente Ficoll (una marca comercial de Pharmacia Fine Chemicals AB), y se recoge una fracción intermedia que contiene las células de la médula ósea; y c) lavado de la fracción recogida de la etapa (b) para la recuperación de células de médula ósea que pueden transfundirse nuevamente.
- Si se desea utilizar una población de células enriquecida en células T, tales poblaciones de células se pueden obtener a partir de una población mixta de células mediante leucocitaria y aféresis mecánica utilizando un separador de células de flujo continuo. Por ejemplo, las células T pueden aislarse de la capa leucocitaria mediante cualquier método conocido, incluida la separación mediante gradiente de Ficoll-Hypaque^{MC}, la separación mediante gradiente de Percoll o la elutriación.
- En ciertos aspectos, las células T son activadas por agentes que se unen a los receptores de las células T para desencadenar una cascada de señalización para la activación de las células T. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo CD3. Para la expansión de células T hasta un número significativo y un estado de proliferación para la reprogramación, también se puede usar una citocina, tal como IL-2. En cierto aspecto, pueden usarse tanto anti-CD3 como anti-CD28 para la activación de células T cuando está implicada la coestimulación. En un aspecto alternativo, se puede aplicar el entrecruzamiento del anti-CD3, tal como el anti-CD3 unido a la placa. Si se usa anti-CD3 soluble para activar las células T en PBMC, el anticuerpo anti-CD3 soluble puede unirse a las APC en las PBMC, que luego presenta el anticuerpo a las células T. Si el anticuerpo anti-CD3 soluble solo se usa en una población de células T purificadas, se produciría anergia por las razones mencionadas anteriormente. Una cierta realización comprende el cultivo de células T en presencia de anti-CD3 (OKT3) e IL2, lo cual es ventajoso y conveniente porque no hay necesidad de usar perlas costosas y engorrosas o anticuerpo unido a placa; después de agregar OKT3 e IL2, el medio celular de las PBMC ayudaría a activar las células T. Luego, las células T se superponen a los otros tipos de células en el cultivo de PBMC debido a la expansión preferencial.
- En ciertos aspectos, la población inicial de células sanguíneas comprende células linfoblastoides, tales como líneas de células linfoblastoides (LCL). La generación de LCL se conoce en la técnica, por ejemplo, mediante la infección de células B con el virus de Epstein-Barr (EBV) (Frisan et al., 2001).

2. Reprogramación de células somáticas

En algunas realizaciones, la población inicial de células (p. ej., células T) se reprograma hasta iPSC, tal como por los métodos descritos en la publicación de la patente de los Estados Unidos No. 2014/0315304. En determinados aspectos de la presente divulgación, los factores de reprogramación se expresan a partir de casetes de expresión comprendidos en uno o más vectores, tal como un vector de integración o un vector episomal. En otro aspecto, las proteínas de reprogramación podrían introducirse directamente en las células somáticas mediante la transducción de proteínas.

Un experto en la técnica estaría bien equipado para construir un vector a través de técnicas recombinantes estándar (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2001 y Ausubel et al., 1996). Los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus de plantas) y cromosomas artificiales (p. ej., YAC), tal como vectores retrovirales (p. ej., derivados de los vectores del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV, MSCV, SFFV, MPSV, SNV, etc.)), vectores lentivirales (p. ej., derivados de HIV-1, HIV-2, SIV, BIV, FIV, etc.), vectores adenovirales (Ad) que incluyen sus formas competentes en replicación, débiles y deficientes en replicación, vectores virales adeno asociados (AAV), vectores del virus del simio 40 (SV-40), vectores del virus del papiloma bovino, vectores del virus Epstein-Barr, vectores del virus del herpes, vectores del virus vaccinia, vectores del virus del sarcoma murino de Harvey, vectores del virus del tumor mamario murino, vectores del virus del sarcoma de Rous.

a. Vectores virales

Se pueden proporcionar vectores virales en ciertos aspectos de la presente divulgación. Al generar vectores virales recombinantes, los genes no esenciales normalmente se reemplazan con un gen o una secuencia codificante para una proteína heteróloga (o no nativa). Un vector viral es un tipo de constructo de expresión que utiliza secuencias virales para introducir ácido nucleico y posiblemente proteínas en una célula. La capacidad de ciertos virus para infectar células o ingresar a las células a través de la endocitosis mediada por receptores, y para integrarse en los genomas de las células huésped y expresar genes virales de manera estable y eficiente, los ha convertido en candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos extraños a las células (por ejemplo, células de mamíferos). A continuación se describen ejemplos no limitantes de vectores de virus que pueden usarse para administrar un ácido nucleico de ciertos aspectos de la presente divulgación.

Los retrovirus son prometedores como vectores de administración de genes debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma del huésped, transferir una gran cantidad de material genético extraño, infectar un amplio espectro de especies y tipos de células y empaquetarse en líneas celulares especiales (Miller, 1992).

Para construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico en el genoma viral en lugar de ciertas secuencias virales para producir un virus que es defectuoso en la replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y env, pero sin la LTR ni los componentes de empaquetamiento (Mann et al., 1983). Cuando se introduce en una línea celular especial un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con la LTR retroviral y las secuencias de empaquetamiento (p. ej., mediante precipitación con fosfato de calcio), la secuencia de empaquetamiento permite que el transcripto de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas virales, que luego se secretan en el medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). A continuación, se recoge el medio que contiene los retrovirus recombinantes, se concentra opcionalmente y se utiliza para la transferencia de genes. Los vectores retrovirales pueden infectar una amplia variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de las células huésped (Paskind et al., 1975).

Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovirales comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivirales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1997; Blomer et al., 1997; patentes de los Estados Unidos Nos. 6.013.516 y 5.994.136).

Los vectores lentivirales recombinantes son capaces de infectar células que no se dividen y se pueden usar para la transferencia de genes y la expresión de secuencias de ácido nucleico tanto *in vivo* como *ex vivo*. Por ejemplo, un lentivirus recombinante capaz de infectar una célula que no se divide, en el que una célula huésped adecuada se transfecta con dos o más vectores que portan las funciones de empaquetamiento, a saber, gag, pol y env, así como rev y tat, se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5.994.136.

b. Vectores episomales

El uso de vectores extracromosómicos (es decir, episomales) basados en plásmidos o liposomas también se puede proporcionar en ciertos aspectos de la presente divulgación. Dichos vectores episomales pueden incluir, por ejemplo, vectores basados en oriP y/o vectores que codifican un derivado de EBNA-1. Estos vectores pueden permitir que grandes fragmentos de ADN se introduzcan en una célula y se mantengan extracromosómicamente, se repliquen una vez por ciclo celular, se dividan en células hijas de manera eficiente y no provoquen sustancialmente ninguna respuesta inmunitaria.

En particular, EBNA-1, la única proteína viral necesaria para la replicación del vector de expresión basado en oriP, no provoca una respuesta inmunitaria celular porque ha desarrollado un mecanismo eficaz para eludir el procesamiento necesario para la presentación de sus antígenos en moléculas del MHC de clase I (Levitskaya et al., 1997). Además, EBNA-1 puede actuar en trans para potenciar la expresión del gen clonado, induciendo la expresión de un gen clonado hasta 100 veces en algunas líneas celulares (Langle-Rouault et al., 1998; Evans et al., 1997). Finalmente, la fabricación de dichos vectores de expresión basados en oriP es económica.

Otros vectores extracromosómicos incluyen otros vectores basados en el virus del herpes linfotrófico. El virus del herpes linfotrófico es un virus del herpes que se replica en un linfoblasto (p. ej., un linfoblasto B humano) y se convierte en un plásmido durante una parte de su ciclo de vida natural. El virus del herpes simple (HSV) no es un virus del herpes "linfotrófico". Los ejemplos de virus del herpes linfotrófico incluyen, pero no se limitan a EBV, virus del herpes del sarcoma de Kaposi (KSHV); Herpesvirus saimiri (HS) y virus de la enfermedad de Marek (MDV). También se contemplan otras fuentes de vectores basados en episomas, tales como ARS de levadura, adenovirus, SV40 o BPV.

Un experto en la técnica estaría bien equipado para construir un vector a través de técnicas recombinantes estándar (véase, por ejemplo, Maniatis et al., 1988 y Ausubel et al., 1994).

Los vectores también pueden comprender otros componentes o funcionalidades que modulan aún más el suministro de genes y/o la expresión de genes, o que de otro modo proporcionan propiedades beneficiosas a las células diana. Dichos otros componentes incluyen, por ejemplo, componentes que influyen en la unión o el direccionamiento a las células (incluidos los componentes que median la unión específica de tipo celular o tejido); componentes que influyen en la absorción del ácido nucleico del vector por la célula; componentes que influyen en la localización del polinucleótido dentro de la célula después de la absorción (tales como agentes que median en la localización nuclear); y componentes que influyen en la expresión del polinucleótido.

Dichos componentes también pueden incluir marcadores, tales como marcadores detectables y/o de selección que pueden usarse para detectar o seleccionar células que han absorbido y están expresando el ácido nucleico suministrado por el vector. Dichos componentes se pueden proporcionar como una característica natural del vector (tal como el uso de ciertos vectores virales que tienen componentes o funcionalidades que median en la unión y la absorción), o los vectores se pueden modificar para proporcionar dichas funcionalidades. Se conoce en la técnica una gran variedad de tales vectores y están generalmente disponibles. Cuando un vector se mantiene en una célula huésped, el vector puede ser replicado de manera estable por las células durante la mitosis como una estructura autónoma, incorporado dentro del genoma de la célula huésped o mantenido en el núcleo o citoplasma de la célula huésped.

c. Sistema basado en transposones

En ciertos aspectos, el suministro de factores de programación puede usar un sistema transposón-transposasa. Por ejemplo, el sistema transposón-transposasa podría ser el bien conocido Sleeping Beauty, el sistema transposón-transposasa Frog Prince (para una descripción de este último, véase, por ejemplo, el documento EP1507865), o el sistema PiggyBac de transposón específico de TTAA.

Los transposones son secuencias de ADN que pueden moverse a diferentes posiciones dentro del genoma de una sola célula, un proceso llamado transposición. En el proceso, pueden causar mutaciones y cambiar la cantidad de ADN en el genoma. Los transposones también se denominaron genes saltadores y son ejemplos de elementos genéticos móviles.

Hay una variedad de elementos genéticos móviles, y se pueden agrupar en función de su mecanismo de transposición. Los elementos genéticos móviles de clase I, o retrotransposones, se copian a sí mismos al ser transcritos primero en ARN, luego ser transcritos de nuevo en ADN por transcriptasa inversa y luego ser insertados en otra posición en el genoma. Los elementos genéticos móviles de clase II se mueven directamente de una posición a otra usando una transposasa para "cortarlos y pegarlos" dentro del genoma.

En realizaciones particulares, los constructos (p. ej., el constructo multilinaje) proporcionados en la presente divulgación usan un sistema de expresión PiggyBac. Los transposones de ADN PiggyBac (PB) se movilizan a través de un mecanismo de "cortar y pegar" mediante el cual una enzima transposasa (transposasa PB), codificada por el propio transposón, escinde y reintegra el transposón en otros sitios dentro del genoma. La transposasa PB reconoce específicamente las repeticiones terminales invertidas (ITR) de PB que flanquean el transposón; se une a estas secuencias y cataliza la escisión del transposón. Luego, PB se integra en los sitios TTAA en todo el genoma, de manera relativamente aleatoria. Para la creación de mutaciones de trampa génica (o adaptadas para generar animales transgénicos no humanos), la transposasa se suministra en trans en un plásmido y se cotransfecta con un plásmido que contiene un transposón donante, un transposón recombinante que comprende una trampa génica flanqueada por los sitios de unión para la transposasa (ITR). La transposasa catalizará la escisión del transposón del plásmido y la posterior integración en el genoma. La integración dentro de una región codificante capturará los elementos necesarios para la expresión de la trampa génica. PB posee varias propiedades ideales: (1) se inserta

preferiblemente dentro de los genes (50 a 67% de las inserciones llegan a los genes) (2) no exhibe saltos locales (cobertura genómica generalizada) (3) no es sensible a la inhibición de la sobreproducción cuyos niveles elevados de transposasa provocan una disminución de la transposición, 4) se corta limpiamente de un sitio donante, sin dejar "huellas", a diferencia de la Sleeping Beauty.

d. Elementos reguladores

Los casetes de expresión incluidos en los vectores de reprogramación útiles en la presente divulgación contienen preferiblemente (en una dirección de 5' a 3') un promotor transcripcional eucariota unido operativamente a una secuencia codificante de proteínas, señales de empalme que incluyen secuencias intermedias y una secuencia de terminación/poliadenilación transcripcional.

(i) Promotor/Potenciadores

Los constructos de expresión proporcionados en el presente documento comprenden un promotor para impulsar la expresión de los genes de programación. Un promotor generalmente comprende una secuencia que funciona para posicionar el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El ejemplo más conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, como, por ejemplo, el promotor para el gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamíferos y el promotor de los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que recubre el sitio de partida por sí mismo ayuda a fijar el lugar de iniciación. Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Por lo general, estos están ubicados en la región 30-110 pb secuencia arriba del sitio de inicio, aunque también se ha demostrado que varios promotores contienen elementos funcionales secuencia abajo del sitio de inicio. Para poner una secuencia de codificación "bajo el control de" un promotor, se posiciona el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del marco de lectura transcripcional "secuencia abajo" (es decir, 3' de) el promotor elegido. El promotor "secuencia arriba" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

El espaciamiento entre los elementos promotores frecuentemente es flexible, de modo que la función promotora se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven entre sí. En el promotor tk, la separación entre los elementos del promotor se puede aumentar a 50 pb antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción. Un promotor puede usarse o no junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en cis implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede estar asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, como se puede obtener aislando las secuencias no codificantes 5' ubicadas secuencia arriba del segmento codificante y/o exón. Tal promotor puede denominarse "endógeno". De manera similar, un potenciador puede estar asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, ubicada secuencia abajo o secuencia arriba de esa secuencia. Alternativamente, se obtendrán ciertas ventajas colocando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor heterólogo o recombinante, que se refiere a un promotor que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores o potenciadores que no "ocurren de forma natural", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción, y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que se usan más comúnmente en la construcción de ADN recombinante incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa (penicilinas), lactosa y triptófano (trp). Además de producir secuencias de ácidos nucleicos de promotores y potenciadores de forma sintética, las secuencias se pueden producir usando clonación recombinante y/o tecnología de amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo PCR^{MC}, en relación con las composiciones divulgadas en el presente documento (véanse las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.683.202 y 5.928.906). Además, se contempla que también se pueden emplear las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias dentro de orgánulos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos y similares.

Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el orgánulo, tipo de célula, tejido, órgano u organismo elegido para la expresión. Los expertos en la técnica de la biología molecular generalmente conocen el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos de células para la expresión de proteínas (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles y/o útiles en las condiciones apropiadas para dirigir un alto nivel de expresión del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

Además, cualquier combinación de promotor/potenciador (tal como, por ejemplo, la base de datos de promotores eucariotas EPDB) también podría usarse para impulsar la expresión. El uso de un sistema de expresión citoplasmático T3, T7 o SP6 es otra realización posible. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción

citoplasmática de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, ya sea como parte del complejo de suministro o como un constructo de expresión genética adicional.

Los ejemplos no limitativos de promotores incluyen promotores virales tempranos o tardíos, tales como promotores tempranos o tardíos de SV40, promotores tempranos inmediatos de citomegalovirus (CMV), promotores tempranos del virus del sarcoma de Rous (RSV); promotores de células eucariotas, tales como, por ejemplo, promotor de beta actina (Ng, 1989; Quitsche et al., 1989), promotor de GADPH (Alexander et al., 1988, Ercolani et al., 1988), promotor de metalotioneína (Karin et al., 1989; Richards et al., 1984); y promotores de elementos de respuesta concatenados, tales como promotores de elementos de respuesta de AMP cíclico (cre), promotores de elementos de respuesta de suero (sre), promotores de éster de forbol (TPA) y promotores de elementos de respuesta (tre) cerca de una caja TATA mínima. También es posible utilizar secuencias promotoras de la hormona del crecimiento humano (p. ej., el promotor mínimo de la hormona del crecimiento humano descrito en Genbank, número de acceso X05244, nucleótido 283-341) o un promotor de tumor mamario de ratón (disponible a través de la ATCC, Cat. No. ATCC 45007).

La expresión transgénica específica de tejido, especialmente para la expresión del gen indicador en células hematopoyéticas y precursores de células hematopoyéticas derivadas de la programación, puede ser deseable como una forma de identificar precursores y células hematopoyéticas derivadas. Para aumentar tanto la especificidad como la actividad, se ha contemplado el uso de elementos reguladores que actúan en cis. Por ejemplo, puede usarse un promotor específico de células hematopoyéticas. Muchos de estos promotores específicos de células hematopoyéticas se conocen en la técnica, tal como los promotores de los genes hematopoyéticos proporcionados en la Tabla 1.

En ciertos aspectos, los métodos de la presente divulgación también se refieren a secuencias potenciadoras, es decir, secuencias de ácido nucleico que aumentan la actividad de un promotor y que tienen el potencial de actuar en cis, e independientemente de su orientación, incluso a distancias relativamente largas (hasta varias kilobases de distancia del promotor objetivo). Sin embargo, la función potenciadora no está necesariamente restringida a distancias tan largas, ya que también pueden funcionar muy cerca de un promotor dado.

Se han identificado muchas secuencias potenciadoras y promotoras de células hematopoyéticas, y pueden ser útiles en los métodos presentes. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.556.954; la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20020055144; la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20090148425.

(ii) Señales de iniciación y expresión vinculada

También se puede usar una señal de iniciación específica en los constructos de expresión proporcionados en la presente divulgación para la traducción eficiente de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Es posible que sea necesario proporcionar señales de control de traducción exógenas, incluido el codón de iniciación ATG. Un experto normal en la técnica sería fácilmente capaz de determinar esto y proporcionar las señales necesarias. Es bien sabido que el codón de iniciación debe estar "en marco" con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de todo el inserto. Las señales de control de traducción exógenas y los codones de iniciación pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados.

En ciertas realizaciones, los elementos de los sitios internos de entrada de ribosomas (IRES) se usan para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES pueden eludir el modelo de exploración de ribosomas de la traducción dependiente de Cap metilada en 5' y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito elementos IRES de dos miembros de la familia de los picornavirus (poliomielitis y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un mensaje IRES de un mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES se pueden vincular a marcos de lectura abiertos heterólogos. Se pueden transcribir juntos múltiples marcos de lectura abiertos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a los ribosomas para una traducción eficiente. Múltiples genes pueden expresarse eficientemente usando un solo promotor/potenciador para transcribir un solo mensaje (véanse las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.925.565 y 5.935.819).

Además, ciertos elementos de la secuencia 2A podrían usarse para crear la coexpresión o unión de genes de programación en los constructos proporcionados en la presente divulgación. Por ejemplo, las secuencias de escisión podrían usarse para coexpresar genes uniendo marcos de lectura abiertos para formar un solo cistron. Un ejemplo de secuencia de escisión es la F2A (virus de la fiebre aftosa 2A) o una secuencia "similar a 2A" (p. ej., el virus *Thosea asigna* 2A; T2A). En realizaciones particulares, se usa un péptido de escisión de F2A para vincular la expresión de los genes en el constructo multilínea.

e. Orígenes de replicación

Para propagar un vector en una célula huésped, puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (a menudo denominados "ori"), por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico correspondiente a oriP de EBV como se describió anteriormente o un oriP genéticamente modificado con una función similar o elevada en la programación, que es una secuencia de ácido nucleico específica en la que se inicia la replicación. Alternativamente, se puede emplear un origen de replicación de otro virus que se replica extracromosómicamente como se describió anteriormente o una secuencia que se replica en forma autónoma (ARS).

f. Marcadores de selección y detectables

En determinadas realizaciones, las células que contienen un constructo de ácido nucleico pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* mediante la inclusión de un marcador en el vector de expresión. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable a la célula que permitiría una fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión. Generalmente, un marcador de selección es aquel que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador de selección positivo es aquel en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador de selección negativo es aquel en el que su presencia impide su selección. Un ejemplo de un marcador de selección positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

Normalmente, la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a neomicina, puomicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores de selección útiles. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de transformantes en función de la implementación de condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores que incluyen marcadores detectables tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Alternativamente, se pueden utilizar enzimas detectables como marcadores de selección negativa tales como la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simple o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la técnica también sabría cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con el análisis de FACS. No se cree que el marcador utilizado sea importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Otros ejemplos de marcadores de selección y detectables son bien conocidos por los expertos en la técnica.

La introducción de un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, en las células madre pluripotentes para ser programadas en células precursoras hematopoyéticas con la divulgación actual puede usar cualquier método adecuado para el suministro de ácido nucleico para la transformación de una célula, como se describe en este documento o como sería conocido por un experto en la materia. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, el suministro directo de ADN, tal como por transfección *ex vivo* (Wilson et al., 1989; Nabel et al., 1989), por inyección (patentes de los Estados Unidos Nos. 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), incluida la microinyección (Harland y Weintraub, 1985; patente de los Estados Unidos No. 5.789.215); por electroporación (patente de los Estados Unidos No. 5.384.; Tur-Kaspa et al., 1986; Potter et al., 1984); por precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe et al., 1990); usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer et al., 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988); mediante bombardeo con microproyectiles (solicitudes PCT números WO 94/09699 y 95/06128; patentes de los Estados Unidos Nos. 5.610.042; 5.322.783; 5.563.055; 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepler et al., 1990; patentes de los Estados Unidos Nos. 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de los Estados Unidos Nos. 5.591.616 y 5.563.055); por absorción de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus et al., 1985), y cualquier combinación de tales métodos. A través de la aplicación de técnicas como estas, (el)los orgánulos, células, tejidos u organismos pueden transformarse de forma estable o transitoria.

C. Coincidencia de haplotipos del MHC

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es la causa principal del rechazo inmunitario de los trasplantes de órganos alogénicos. Hay tres haplotipos principales de MHC de clase I (A, B y C) y tres haplotipos principales de MHC de clase II (DR, DP y DQ). Los loci de HLA son altamente polimórficos y están distribuidos en 4 Mb en el cromosoma 6. La capacidad de haplotipar los genes de HLA dentro de la región es clínicamente importante ya que esta región está asociada con enfermedades autoinmunes e infecciosas y la compatibilidad de los haplotipos de HLA entre el donante y el receptor puede influir en los resultados clínicos del trasplante. Los HLA correspondientes al MHC de clase I presentan péptidos desde el interior de la célula y los HLA correspondientes al MHC de clase II presentan antígenos desde el exterior de la célula a los linfocitos T. La incompatibilidad de los haplotipos del MHC entre el injerto y el huésped desencadena una respuesta inmunitaria contra el injerto y conduce a su rechazo. Por lo tanto, un paciente puede ser tratado con un inmunosupresor para prevenir el rechazo. Las líneas de células madre compatibles con HLA pueden superar el riesgo de rechazo inmunitario.

Debido a la importancia de HLA en el trasplante, los loci de HLA normalmente se tipifican mediante serología y PCR para identificar pares de donante-receptor favorables. La detección serológica de antígenos HLA de clase I y II puede lograrse mediante una prueba de linfocitotoxicidad mediada por el complemento con linfocitos T o B

purificados. Este procedimiento se utiliza predominantemente para emparejar los loci de HLA-A y HLA-B. La tipificación molecular de tejidos puede ser a menudo más precisa que las pruebas serológicas. Los métodos moleculares de baja resolución, tales como los métodos SSOP (sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia), en los que los productos de PCR se analizan frente a una serie de sondas de oligonucleótidos, se pueden usar para identificar antígenos HLA, y actualmente estos métodos son los más comunes utilizados para tipificación de HLA de clase II. Las técnicas de alta resolución tales como los métodos SSP (cebador específico de secuencia) que utilizan cebadores específicos de alelo para la amplificación por PCR pueden identificar alelos específicos del MHC.

La compatibilidad del MHC entre un donante y un receptor aumenta significativamente si las células del donante son homocigotas para HLA, es decir, contienen alelos idénticos para cada proteína presentadora de antígeno. La mayoría de los individuos son heterocigotos para los genes del MHC de clase I y II, pero algunos individuos son homocigotos para estos genes. Estos individuos homocigotos pueden servir como súper donantes y los injertos generados a partir de sus células se pueden trasplantar en todos los individuos que sean homocigotos o heterocigotos para ese haplotipo. Además, si las células de donantes homocigotos tienen un haplotipo que se encuentra con alta frecuencia en una población, estas células pueden tener aplicación en terapias de trasplante para un gran número de individuos.

En consecuencia, en algunas realizaciones, las PSC de los presentes métodos se pueden producir a partir de células somáticas del sujeto a tratar, o de otro sujeto con el mismo o sustancialmente el mismo tipo de HLA que el del paciente. En un caso, los principales HLA (p. ej., los tres loci principales de HLA-A, HLA-B y HLA-DR) del donante son idénticos a los principales HLA del receptor. En algunos casos, el donante de células somáticas puede ser un súper donante; por lo tanto, las PSC derivadas de un superdonante homocigoto del MHC pueden usarse para generar HPC y, posteriormente, células inmunitarias, tales como las células T. Por lo tanto, las células efectoras inmunitarias derivadas de un superdonante pueden trasplantarse en sujetos que son homocigotos o heterocigotos para ese haplotipo. Por ejemplo, las células inmunitarias pueden ser homocigotas en dos alelos de HLA, tales como HLA-A y HLA-B. Como tales, las células inmunitarias producidas a partir de superdonantes se pueden usar en los métodos divulgados en el presente documento para producir células inmunitarias que potencialmente pueden "coincidir" con un gran número de receptores potenciales.

D. Receptores antigénicos genéticamente modificados

Las PSC pueden modificarse genéticamente para expresar receptores de antígeno tales como TCR o CAR modificados. Por ejemplo, las PSC (p. ej., autólogas o alogénicas) se modifican para expresar un TCR o CAR que tiene especificidad antigénica para un antígeno canceroso.

Los métodos de modificación adecuados son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y Ausubel, citados anteriormente. Por ejemplo, las células pueden transducirse para expresar un TCR que tiene especificidad antigénica para un antígeno canceroso usando técnicas de transducción descritas en Heemskerk et al. Hum Gene Ther. 19:496-510 (2008) y Johnson et al., Blood 114:535-46 (2009).

La electroporación del ARN que codifica las cadenas α y β (o γ y δ) de TCR de longitud completa se puede utilizar como alternativa para superar los problemas a largo plazo con la autorreactividad causada por el emparejamiento de cadenas de TCR transducidas retroviralmente y endógenas. Incluso si dicho emparejamiento alternativo tiene lugar en la estrategia de transfección transitoria, las células T autorreactivas posiblemente generadas perderán esta autorreactividad después de algún tiempo, porque las cadenas α y β del TCR introducidas solo se expresan de forma transitoria. Cuando la expresión de la cadena α y β del TCR introducida disminuye, solo quedan células T autólogas normales. Este no es el caso cuando se introducen cadenas de TCR de longitud completa mediante transducción retroviral estable, que nunca perderá las cadenas de TCR introducidas, provocando una autorreactividad constantemente presente en el paciente.

En algunas realizaciones, las células comprenden uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante modificación genética que codifican uno o más receptores de antígenos, y productos modificados genéticamente de dichos ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, normalmente no están presentes en una célula o muestra obtenida de la célula, tal como una obtenida de otro organismo o célula, que por ejemplo, no se encuentra normalmente en la célula que se está modificando y/o o un organismo del que se deriva dicha célula. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos no son de origen naturales, tal como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza (p. ej., quimérico).

En algunas realizaciones, CAR contiene un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno es una proteína expresada en la superficie de las células. En algunas realizaciones, el CAR es un CAR similar a TCR y el antígeno es un antígeno peptídico procesado, tal como un antígeno peptídico de una proteína intracelular, que, al igual que un TCR, se reconoce en la superficie celular en el contexto de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

Los ejemplos de receptores de antígeno, incluidos los CAR y los TCR recombinantes, así como los métodos para modificar e introducir los receptores en las células, incluyen los descritos, por ejemplo, en las publicaciones de las solicitudes internacionales de patente Nos. WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, las publicaciones de las solicitudes de patente de los Estados Unidos Nos. US2002131960, US2013287748, US20130149337, las patentes de los Estados Unidos Nos.: 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353, y 8.479.118, y la solicitud de patente europea No EP2537416, y/o las descritas por Sadelain et al., Cancer Discov. Abril de 2013; 3(4): 388-398; Dávila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., octubre de 2012; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, marzo de 2012; 18 (2): 160-75. En algunos aspectos, los receptores de antígeno modificados genéticamente incluyen un CAR como se describe en la patente de los Estados Unidos No.: 7.446.190, y los descritos en la publicación de la solicitud internacional de patente No.: WO/2014055668 A1.

1. Receptores de antígenos quiméricos

En algunas realizaciones, el CAR comprende: a) un dominio de señalización intracelular, b) un dominio transmembrana y c) un dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno.

En algunas realizaciones, los receptores de antígenos modificados incluyen CAR, que incluyen CAR activadores o estimulantes, CAR coestimuladores (véase el documento WO2014/055668) y/o CAR inhibidores (iCAR, véase Fedorov et al., 2013). Los CAR generalmente incluyen un dominio de unión a antígeno extracelular (o ligando) unido a uno o más componentes de señalización intracelular, en algunos aspectos a través de enlazadores y/o dominio dominios transmembrana. Dichas moléculas típicamente imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo.

Ciertas realizaciones de la presente divulgación se refieren al uso de ácidos nucleicos, incluidos los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido CAR específico de antígeno, incluido un CAR que se ha humanizado para reducir la inmunogenicidad (hCAR), que comprende un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular que comprende uno o más motivos de señalización. En ciertas realizaciones, el CAR puede reconocer un epítipo que comprende el espacio compartido entre uno o más antígenos. En ciertas realizaciones, la región de unión puede comprender regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo monoclonal, regiones variables de un anticuerpo monoclonal y/o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En otra realización, esa especificidad se deriva de un péptido (p. ej., citocina) que se une a un receptor.

Se contempla que los ácidos nucleicos de CAR humanos pueden ser genes humanos usados para mejorar la inmunoterapia celular para pacientes humanos. En una realización específica, la invención incluye una región codificante o ADNc de CAR de longitud completa. Las regiones o dominios de unión a antígeno pueden comprender un fragmento de las cadenas V_H y V_L de un fragmento variable monocaténario (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal humano particular, tal como los descritos en la patente de los Estados Unidos No. 7.109.304. El fragmento también puede ser cualquier número de diferentes dominios de unión a antígeno de un anticuerpo específico de antígeno humano. En una realización más específica, el fragmento es un scFv específico de antígeno codificado por una secuencia que está optimizada para el uso de codones humanos para la expresión en células humanas.

La disposición podría ser multimérica, tal como un diacuerpo o multímeros. Lo más probable es que los multímeros se formen por apareamiento cruzado de la porción variable de las cadenas ligera y pesada en un diacuerpo. La porción de bisagra del constructo puede tener múltiples alternativas, desde eliminarse por completo, mantener la primera cisteína, una sustitución de prolina en lugar de serina, hasta truncarse hasta la primera cisteína. La porción de Fc se puede eliminar. Cualquier proteína que sea estable y/o se dimerice puede servir para este propósito. Se podría usar solo uno de los dominios de Fc, por ejemplo, el dominio CH2 o CH3 de la inmunoglobulina humana. También se podría usar la región bisagra, CH2 y CH3 de una inmunoglobulina humana que se ha modificado para mejorar la dimerización. También se podría usar solo la porción de bisagra de una inmunoglobulina. También se podrían usar porciones de CD8alfa.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico del CAR comprende una secuencia que codifica otros receptores coestimuladores, tales como un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular CD28 modificado. Otros receptores coestimuladores incluyen, pero no se limitan a, uno o más de CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10 y 4-1BB (CD137). Además de una señal primaria iniciada por CD3ζ, una señal adicional proporcionada por un receptor coestimulador humano insertado en un CAR humano es importante para la activación completa de las células NK y podría ayudar a mejorar la persistencia *in vivo* y el éxito terapéutico de la inmunoterapia adoptiva.

En algunas realizaciones, CAR se construye con una especificidad para un antígeno particular (o marcador o ligando), tal como un antígeno expresado en un tipo de célula particular para ser el objetivo de la terapia adoptiva, por ejemplo, un marcador de cáncer, y/o un antígeno destinado a inducir una respuesta amortiguadora, tal como un antígeno expresado en un tipo de célula normal o no enferma. Por lo tanto, el CAR típicamente incluye en su porción

extracelular una o más moléculas de unión a antígeno, tales como uno o más fragmentos, dominios o porciones de unión a antígeno, o uno o más dominios variables de anticuerpo y/o moléculas de anticuerpo. En algunas realizaciones, el CAR incluye una porción o porciones de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) derivado de las cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de un anticuerpo monoclonal (mAb).

En ciertas realizaciones del receptor de antígeno quimérico, la porción específica de antígeno del receptor (que puede denominarse dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno) comprende un antígeno asociado a tumor o un dominio de unión a antígeno específico de patógeno. Los antígenos incluyen antígenos de carbohidratos reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones, tales como Dectin-1. Un antígeno asociado a un tumor puede ser de cualquier tipo siempre que se exprese en la superficie celular de las células tumorales. Ejemplos de realizaciones de antígenos asociados a tumores incluyen CD19, CD20, antígeno carcinoembrionario, alfafetoproteína, CA-125, MUC-1, CD56, EGFR, c-Met, AKT, Her2, Her3, antígeno de tumor epitelial, antígeno asociado a melanoma, p53 mutado, ras mutado, y así sucesivamente.

La secuencia del marco de lectura abierto que codifica el receptor quimérico puede obtenerse de una fuente de ADN genómico, una fuente de ADNc o puede sintetizarse (p. ej., mediante PCR) o combinaciones de los mismos. Dependiendo del tamaño del ADN genómico y del número de intrones, puede ser deseable usar ADNc o una combinación de los mismos, ya que se ha descubierto que los intrones estabilizan el ARNm. Además, puede ser más ventajoso usar regiones no codificantes endógenas o exógenas para estabilizar el ARNm.

Se contempla que el constructo quimérico pueda introducirse en células inmunitarias como ADN desnudo o en un vector adecuado. Los métodos para transfectar células de forma estable mediante electroporación usando ADN desnudo son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6.410.319. El ADN desnudo generalmente se refiere al ADN que codifica un receptor quimérico contenido en un vector de expresión de plásmido en la orientación adecuada para la expresión.

Alternativamente, se puede usar un vector viral (p. ej., un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector viral adenoasociado o un vector lentiviral) para introducir el constructo quimérico en las células inmunitarias. Los vectores adecuados para su uso de acuerdo con el método de la presente divulgación son los que no se replican en las células inmunitarias. Se conocen un gran número de vectores basados en virus, en los que el número de copias del virus mantenido en la célula es suficientemente bajo para mantener la viabilidad de la célula, tal como por ejemplo, vectores basados en HIV, SV40, EBV, HSV o BPV.

En algunos aspectos, el componente de unión o reconocimiento específico de antígeno está unido a uno o más dominios de señalización transmembrana e intracelular. En algunas realizaciones, el CAR incluye un dominio transmembrana fusionado con el dominio extracelular del CAR. En una realización, se usa el dominio transmembrana que está asociado naturalmente con uno de los dominios en el CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se selecciona o modifica por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana superficial para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

El dominio transmembrana en algunas realizaciones se deriva de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio en algunos aspectos se deriva de cualquier proteína transmembrana o unida a la membrana. Las regiones transmembrana incluyen aquellas derivadas de (es decir, comprenden al menos la región o regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, moléculas CD28, CD3 zeta, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD3 delta, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D y DAP. Alternativamente, el dominio transmembrana en algunas realizaciones es sintético. En algunos aspectos, el dominio transmembrana sintético comprende residuos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. En algunos aspectos, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético.

En determinadas realizaciones, las tecnologías de plataforma divulgadas en el presente documento para modificar genéticamente las células inmunitarias, tales como las células NK, comprenden (i) la transferencia de genes no virales utilizando un dispositivo de electroporación (por ejemplo, un nucleofector), (ii) los CAR que emiten señales a través de endodominios (p. ej., CD28/CD3- ζ , CD137/CD3- ζ u otras combinaciones), (iii) los CAR con longitudes variables de dominios extracelulares que conectan el dominio de reconocimiento de antígeno con la superficie celular y, en algunos casos, (iv) células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) derivadas de K562 para poder expandir de forma robusta y numérica las células inmunitarias CAR⁺ (Singh et al., 2008; Singh et al., 2011).

2. Receptor de células T (TCR)

En algunas realizaciones, los receptores de antígeno modificados genéticamente incluyen TCR recombinantes y/o TCR clonados a partir de células T naturales. Un "receptor de células T" o "TCR" se refiere a una molécula que contiene cadenas variables α y β (también conocidas como TCR α y TCR β , respectivamente) o cadenas variables γ

y δ (también conocidas como TCR γ y TCR δ , respectivamente) y que es capaz de unirse específicamente a un péptido antigénico unido a un receptor del MHC. En algunas realizaciones, el TCR está en forma $\alpha\beta$.

Típicamente, los TCR que existen en formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ son generalmente similares estructuralmente, pero las células T que los expresan pueden tener funciones o ubicaciones anatómicas distintas. Un TCR se puede encontrar en la superficie de una célula o en forma soluble. Generalmente, un TCR se encuentra en la superficie de las células T (o linfocitos T) en las que generalmente es responsable de reconocer los antígenos unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). En algunas realizaciones, un TCR también puede contener un dominio constante, un dominio transmembrana y/o una cola citoplásmica corta (véase, por ejemplo, Janeway et al, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3a Ed., Current Biology Publications, pág. 433, 1997). Por ejemplo, en algunos aspectos, cada cadena del TCR puede poseer un dominio variable de inmunoglobulina en el extremo terminal N, un dominio constante de inmunoglobulina, una región transmembrana y una cola citoplásmica corta en el extremo terminal C. En algunas realizaciones, un TCR está asociado con proteínas invariantes del complejo CD3 implicadas en la mediación de la transducción de señales. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "TCR" abarca fragmentos de TCR funcionales del mismo. El término también abarca los TCR intactos o de longitud completa, incluidos los TCR en forma $\alpha\beta$ o forma $\gamma\delta$.

Por lo tanto, para los fines del presente documento, la referencia a un TCR incluye cualquier TCR o fragmento funcional, tal como una porción de unión a antígeno de un TCR que se une a un péptido antigénico específico unido en una molécula del MHC, es decir, un complejo MHC-péptido. Una "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un TCR, que se puede usar indistintamente, se refiere a una molécula que contiene una porción de los dominios estructurales de un TCR, pero que se une al antígeno (p. ej., complejo MHC-péptido) al cual se une el TCR completo. En algunos casos, una porción de unión a antígeno contiene los dominios variables de un TCR, tal como la cadena α variable y la cadena β variable de un TCR, suficientes para formar un sitio de unión para unirse a un complejo MHC-péptido específico, tal como generalmente cuando cada cadena contiene tres regiones determinantes de complementariedad.

En algunas realizaciones, los dominios variables de las cadenas de TCR se asocian para formar bucles, o regiones determinantes de complementariedad (CDR) análogas a las inmunoglobulinas, que confieren reconocimiento de antígeno y determinan la especificidad del péptido al formar el sitio de unión de la molécula de TCR y determinar la especificidad del péptido. Típicamente, como las inmunoglobulinas, las CDR están separadas por regiones marco (FR) (véase, por ejemplo, Jores et al., 1990; Chothia et al., 1988; Lefranc et al., 2003). En algunas realizaciones, la CDR3 es la principal CDR responsable de reconocer el antígeno procesado, aunque también se ha demostrado que la CDR1 de la cadena alfa interactúa con la parte del extremo terminal N del péptido antigénico, mientras que la CDR1 de la cadena beta interactúa con la parte del extremo terminal C del péptido. Se cree que CDR2 reconoce la molécula del MHC. En algunas realizaciones, la región variable de la cadena β puede contener una región de hipervariabilidad adicional (HV4).

En algunas realizaciones, las cadenas de TCR contienen un dominio constante. Por ejemplo, al igual que las inmunoglobulinas, la porción extracelular de las cadenas de TCR (p. ej., cadena α , cadena β) puede contener dos dominios de inmunoglobulina, un dominio variable (p. ej., Va o Vp; normalmente los aminoácidos 1 a 116 de acuerdo con la numeración de Kabat, Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Servicio de Salud Pública de los Institutos Nacionales de Salud, 1991, 5a ed.) en el extremo terminal N y un dominio constante (p. ej., dominio constante de cadena α o Ca, típicamente los aminoácidos 117 a 259 de acuerdo con en Kabat, dominio constante de cadena β o Cp, típicamente aminoácidos 117 a 295 de acuerdo con Kabat) adyacente a la membrana celular. Por ejemplo, en algunos casos, la porción extracelular del TCR formado por las dos cadenas contiene dos dominios constantes próximos a la membrana y dos dominios variables distantes a la membrana que contienen CDR. El dominio constante del dominio de TCR contiene secuencias de conexión cortas en las que un residuo de cisteína forma un enlace disulfuro, formando un enlace entre las dos cadenas. En algunas realizaciones, un TCR puede tener un residuo de cisteína adicional en cada una de las cadenas α y β de modo que el TCR contenga dos enlaces disulfuro en los dominios constantes.

En algunas realizaciones, las cadenas de TCR pueden contener un dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana está cargado positivamente. En algunos casos, las cadenas de TCR contienen una cola citoplásmica. En algunos casos, la estructura permite que el TCR se asocie con otras moléculas tales como CD3. Por ejemplo, un TCR que contiene dominios constantes con una región transmembrana puede anclar la proteína en la membrana celular y asociarse con subunidades invariantes del aparato o complejo de señalización de CD3.

En general, CD3 es un complejo multiproteico que puede poseer tres cadenas distintas (γ , δ y ϵ) en mamíferos y la cadena ζ . Por ejemplo, en los mamíferos, el complejo puede contener una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , dos cadenas CD3 ϵ y un homodímero de las cadenas CD3 ζ . Las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ son proteínas de superficie celular altamente relacionadas de la superfamilia de inmunoglobulinas que contienen un solo dominio de inmunoglobulina. Las regiones transmembrana de las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ están cargadas negativamente, lo cual es una característica que permite que estas cadenas se asocien con las cadenas receptoras de células T cargadas positivamente. Las colas intracelulares de las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ contienen cada una un solo

motivo conservado conocido como motivo de activación basado en tirosina de inmunoceptor o ITAM, mientras que cada cadena CD3 ζ tiene tres. Generalmente, los ITAM están involucrados en la capacidad de señalización del complejo TCR. Estas moléculas accesorias tienen regiones transmembrana cargadas negativamente y desempeñan un papel en la propagación de la señal del TCR dentro de la célula. Las cadenas CD3 y ζ , junto con el TCR, forman lo que se conoce como complejo receptor de células T.

En algunas realizaciones, el TCR puede ser un heterodímero de dos cadenas α y β (u opcionalmente γ y δ) o puede ser un constructo de TCR de cadena única. En algunas realizaciones, el TCR es un heterodímero que contiene dos cadenas separadas (cadenas α y β o cadenas γ y δ) que están unidas, tal como mediante un enlace disulfuro o enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, se identifica un TCR para un antígeno diana (p. ej., un antígeno canceroso) y se introduce en las células. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el TCR se puede obtener de una variedad de fuentes, tal como mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias de ADN del TCR disponibles públicamente. En algunas realizaciones, el TCR se obtiene de una fuente biológica, tal como de células tales como a partir de una célula T (por ejemplo, una célula T citotóxica), hibridomas de células T u otra fuente disponible públicamente. En algunas realizaciones, las células T se pueden obtener a partir de células aisladas *in vivo*. En algunas realizaciones, se puede aislar un clon de células T de alta afinidad de un paciente y aislar el TCR. En algunas realizaciones, las células T pueden ser un hibridoma o clon de células T cultivadas. En algunas realizaciones, el clon de TCR para un antígeno diana se ha generado en ratones transgénicos modificados con genes del sistema inmunitario humano (p. ej., el sistema de antígenos leucocitarios humanos o HLA). En algunas realizaciones, la presentación en fagos se usa para aislar los TCR frente a un antígeno diana. En algunas realizaciones, el TCR o su porción de unión a antígeno puede generarse sintéticamente a partir del conocimiento de la secuencia del TCR.

3. Células presentadoras de antígeno

Las APC, que incluyen macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, se distinguen por su expresión de una molécula particular del MHC. Las APC internalizan el antígeno y vuelven a expresar una parte de ese antígeno, junto con la molécula del MHC en su membrana celular externa. El MHC es un gran complejo genético con múltiples loci. Los loci del MHC codifican dos clases principales de moléculas de membrana del MHC, denominadas MHC de clase I y clase II. Los linfocitos T colaboradores generalmente reconocen el antígeno asociado con las moléculas del MHC de clase II, y los linfocitos T citotóxicos reconocen el antígeno asociado con las moléculas del MHC de clase I. En humanos, el MHC se denomina complejo HLA y en ratones, complejo H-2.

En algunos casos, las aAPC son útiles para preparar composiciones terapéuticas y productos de terapia celular de las realizaciones. Para una orientación general sobre la preparación y el uso de sistemas de presentación de antígenos, véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.225.042, 6.355.479, 6.362.001 y 6.790.662.

Los sistemas de aAPC pueden comprender al menos una molécula auxiliar exógena. Puede emplearse cualquier número y combinación adecuados de moléculas auxiliares. La molécula auxiliar puede seleccionarse entre moléculas auxiliares tales como moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión. Los ejemplos de moléculas coestimuladoras incluyen CD86, CD64 (Fc γ RI), ligando 41BB e IL-21. Las moléculas de adhesión pueden incluir glicoproteínas que se unen a carbohidratos, tales como las selectinas, glicoproteínas que se unen a la transmembrana, tales como las integrinas, proteínas dependientes del calcio, tales como las cadherinas, y proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) transmembrana de un solo paso, tales como las moléculas de adhesión intercelular (ICAM), que promueven, por ejemplo, el contacto de célula con célula o de célula con matriz. Los ejemplos de moléculas de adhesión incluyen LFA-3 e ICAM, tal como ICAM-1. Las técnicas, métodos y reactivos útiles para la selección, clonación, preparación y expresión de ejemplos de moléculas auxiliares, incluidas moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión, se ejemplifican, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.225.042, 6.355.479 y 6.362.001.

4. Antígenos

Entre los antígenos a los que se dirigen los receptores de antígenos modificados genéticamente se encuentran aquellos expresados en el contexto de una enfermedad, afección o tipo de célula a los que se dirige la terapia celular adoptiva. Entre las enfermedades y afecciones se encuentran enfermedades y trastornos proliferativos, neoplásicos y malignos, incluidos cánceres y tumores, incluidos cánceres hematológicos, cánceres del sistema inmunitario, tales como linfomas, leucemias y/o mielomas, tales como leucemias B, T y mieloides, linfomas y mielomas múltiples. En algunas realizaciones, el antígeno se expresa selectivamente o se sobreexpresa en células de la enfermedad o afección, por ejemplo, células tumorales o patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no diana. En otras realizaciones, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en células modificadas.

Cualquier antígeno adecuado puede encontrar uso en el presente método. Los ejemplos de antígenos incluyen, pero no se limitan a, moléculas antigénicas de agentes infecciosos, autoantígenos/antígenos propios, antígenos asociados a tumores/cáncer y neoantígenos tumorales (Linnemann et al., 2015).

Los antígenos asociados a tumores pueden derivarse de cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmón, pancreático, renal, mesotelioma, ovario o melanoma. Ejemplos de antígenos asociados a tumores o antígenos derivados de células tumorales incluyen MAGE 1, 3 y MAGE 4 (u otros antígenos MAGE); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (también conocido como NY-ESO-1); SAGE; y HAGE o GAGE. Estos ejemplos no limitantes de antígenos tumorales se expresan en una amplia gama de tipos de tumores tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma de vejiga. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6.544.518. Los antígenos asociados a tumores de cáncer de próstata incluyen, por ejemplo, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno específico de próstata (PSA), fosfatos de ácido prostático, NKX3.1 y antígeno epitelial transmembrana seis de la próstata (STEAP).

Otros antígenos asociados a tumores incluyen Plu-1, HASH-1, Hash-2, Cripto y Criptin. Además, un antígeno tumoral puede ser una hormona peptídica propia, tal como la hormona que libera la hormona gonadotropina de longitud completa (GnRH), un péptido corto de 10 aminoácidos de longitud, útil en el tratamiento de muchos cánceres.

Los antígenos tumorales incluyen antígenos tumorales derivados de cánceres que se caracterizan por la expresión de antígenos asociados a tumores, tal como la expresión de HER-2/neu. Los antígenos asociados a tumores de interés incluyen antígenos tumorales específicos de linaje tales como los antígenos de linaje de melanocitos-melanoma MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, tirosinasa y proteína relacionada con tirosinasa. Los antígenos ilustrativos asociados a tumores incluyen, pero no se limitan a, antígenos tumorales derivados de o que comprenden uno o más de p53, Ras, c-Myc, serina/treonina quinasas citoplasmáticas (p. ej., A-Raf, B-Raf y C-Raf, quinasas dependientes de ciclina), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, DAM-10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTERT, iCE, MUC1, MUC2, fosfoinositida 3-quinasa (PI3K), receptores de TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno del tumor de Wilms (WT1), AFP, -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, anexina II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, factor 4 regulador de interferón (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, transductor 1 de señal de calcio asociado a tumor (TACSTD1) TACSTD2, receptor de tirosina quinasas (p. ej., receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (en particular, EGFRVIII), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)), tirosina quinasas citoplasmáticas (p. ej., familia src, familia syk-ZAP70), quinasa ligada a integrina (ILK), transductores de señales y activadores de la transcripción STAT3, STATS y STATE, factores inducibles por hipoxia (p. ej., HIF-1 y HIF-2), factor nuclear-kappa B (NF-B), receptores Notch (p. ej., Notch1-4), c-Met, dianas de rapamicina en mamíferos (mTOR), WNT, quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y sus subunidades reguladoras, PMSA, PR-3, MDM2, mesotelina, carcinoma de células renales-5T4, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I (CAI) y IX (CAIX) (también conocida como G250), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinasa3, hTERT, puntos de ruptura de translocación de sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisialílico, MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesoteliano, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLobH, NY-BR-1, RGsS, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMW-MAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumina, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, antígeno 1 relacionado con fos, CBX2, CLDN6, SPANX, TPTE, ACTL8, ANKRD30A, CDKN2A, MAD2L1, CTAG1B, SUNC1, LRRN1 e idiopio.

Los antígenos pueden incluir regiones epitópicas o péptidos epitópicos derivados de genes mutados en células tumorales o de genes transcritos a diferentes niveles en células tumorales en comparación con células normales, tales como la enzima telomerasa, survivina, mesotelina, ras mutado, reordenamiento bcr/abl, Her2/neu, p53 mutado o de tipo silvestre, citocromo P450 1B1 y secuencias de intrones anormalmente expresadas tales como N-acetilglucosaminiltransferasa-V; reordenamientos clonales de genes de inmunoglobulina que generan idiotipos únicos en mieloma y linfomas de células B; antígenos tumorales que incluyen regiones epitópicas o péptidos epitópicos derivados de procesos oncovirales, tales como las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano; proteína del virus de Epstein-Barr LMP2; proteínas oncofetales no mutadas con expresión tumoral selectiva, tales como el antígeno carcinoembrionario y la alfafetoproteína.

En otras realizaciones, un antígeno se obtiene o deriva de un microorganismo patógeno o de un microorganismo patógeno oportunista (también llamado en el presente documento microorganismo de enfermedad infecciosa), tal como un virus, hongo, parásito y bacteria. En determinadas realizaciones, los antígenos derivados de dicho microorganismo incluyen proteínas de longitud completa.

III. Células efectoras inmunitarias

A. Células precursoras hematopoyéticas

Las PSC en el contexto de la presente divulgación modificadas para expresar un receptor antigénico, tal como un CAR, pueden diferenciarse de las HPC mediante métodos conocidos en la técnica. En un método, las CAR-PSC se diferencian en HPC CD34⁺ a través de la diferenciación dirigida. En otro método, que no forma parte de la invención

tal como se define en las presentes reivindicaciones, las CAR-PSC se diferencian de las HPC CD34⁺ mediante programación directa.

1. Diferenciación dirigida

Ciertas realizaciones de la presente divulgación se refieren a la diferenciación de CAR-PSC en HPC. Los CAR-PSC se pueden diferenciar en HPC mediante métodos conocidos en la técnica, como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 8.372.642. En un método, pueden usarse combinaciones de BMP4, VEGF, ligando de Flt3, IL-3 y GM-CSF para promover la diferenciación hematopoyética. En determinadas realizaciones, la exposición secuencial de cultivos celulares a un primer medio para preparar las PSC para la diferenciación, un segundo medio que incluye BMP4, VEGF y FGF, seguido de cultivo en un tercer medio que incluye ligando de Flt3, SCF, TPO, IL-3, e IL-6 puede diferenciar células pluripotentes en HPC y células hematopoyéticas. El segundo medio definido también puede comprender heparina. Además, la inclusión de FGF-2 (50 ng/ml) en los medios que contienen BMP4 y VEGF puede mejorar la eficacia de la generación de células precursoras hematopoyéticas a partir de células pluripotentes. Además, la inclusión de un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) (por ejemplo, CHIR99021, BIO y SB-216763) en el primer medio definido puede mejorar aún más la producción de las HPC.

Generalmente, la diferenciación de células pluripotentes en células precursoras hematopoyéticas se puede realizar usando condiciones definidas o no definidas. Se apreciará que las condiciones definidas son generalmente preferibles en las realizaciones en las que se pretende administrar las células resultantes a un sujeto humano. Las células madre hematopoyéticas pueden derivarse de células madre pluripotentes en condiciones definidas (p. ej., utilizando un medio TeSR) y las células hematopoyéticas pueden generarse a partir de cuerpos embrioides derivados de células pluripotentes. En otras realizaciones, las células pluripotentes pueden cultivarse conjuntamente en células OP9 o células de fibroblastos embrionarios de ratón y posteriormente diferenciarse.

Se puede permitir que las células pluripotentes formen cuerpos embrioides o agregados como parte del proceso de diferenciación. La formación de "cuerpos embrioides" (EB), o grupos de células en crecimiento, para inducir la diferenciación generalmente implica la agregación *in vitro* de células madre pluripotentes humanas en EB y permite la diferenciación espontánea y aleatoria de células madre pluripotentes humanas en múltiples tipos de tejidos que representan los orígenes del endodermo, ectodermo y mesodermo. Por lo tanto, los EB tridimensionales pueden usarse para producir alguna fracción de células hematopoyéticas y células endoteliales.

Los EB se pueden formar usando el siguiente protocolo. Las iPSC no diferenciadas adaptadas al crecimiento sin alimentador en placas recubiertas con MATRIGEL^{MC} se pueden recolectar en la confluencia utilizando un tratamiento con EDTA 0,5 M durante aproximadamente 8-10 minutos a temperatura ambiente. El EDTA se aspira después de la incubación y los EB pueden formarse recogiendo las células en medios SFD que contienen inhibidor de rock o blebbistatina. Los medios pueden cambiarse al día siguiente por medios de diferenciación EB1 que contengan diferentes formulaciones de citocinas. Las células se siembran en placa a una densidad de 0,25-0,5 millones de células por ml para promover la formación de agregados.

Para promover la formación de agregados, las células se pueden transferir a placas de baja adherencia para una incubación durante la noche en medio de diferenciación libre de suero (SFD), que consta de 75 % de IMDM (Gibco), 25 % de F12 modificado de Ham (Cellgro) complementado con N2 al 0,05 % y B-27 sin complementos de AR, 1-glutamina 200 mM, 0,05 mg/ml de sal 2-fosfato de magnesio de ácido ascórbico (Asc 2-P) (WAKO) y 4,5 x 10⁻⁴ MTG. Al día siguiente, las células pueden recogerse de cada pocillo y centrifugarse. A continuación, las células pueden resuspenderse en "medios de diferenciación de EB", que consisten en medios basales SFD complementados con aproximadamente 50 ng/ml del factor morfogenético óseo (BMP4), aproximadamente 50 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y 50 ng/ml de FGF zb durante los primeros cuatro días de diferenciación. Las células se alimentan a medias cada 48 horas. En el quinto día de la diferenciación, el medio se reemplaza con un segundo medio compuesto por medio SFD complementado con 50 ng/ml de factor de células madre (SCF), aproximadamente 50 ng/ml de ligando de Flt-3 (Flt-3L), 50 ng/ml de interleucina 6 (IL-6), 50 ng/ml de interleucina 3 (IL-3), 50 ng/ml de trombopoyetina (TPO). Las células se alimentan a medias cada 48 horas con medio de diferenciación fresco. Los cambios de medio se realizan centrifugando los cultivos de diferenciación a 300 g durante 5 minutos y aspirando la mitad del volumen de los cultivos de diferenciación y rellenándolo con medio fresco. En ciertas realizaciones, los medios de diferenciación de EB pueden incluir aproximadamente BMP4 (por ejemplo, aproximadamente 50 ng/ml), VEGF (por ejemplo, aproximadamente 50 ng/ml) y, opcionalmente, FGF-2 (por ejemplo, aproximadamente 25-75 ng/ml o aproximadamente 50 ng/ml). El sobrenadante se puede aspirar y reemplazar con medio de diferenciación fresco. Como alternativa, las células se pueden alimentar a medias cada dos días con medio fresco. Las células se pueden recolectar en diferentes momentos durante el proceso de diferenciación.

Las HPC pueden cultivarse a partir de células madre pluripotentes usando un medio definido. Los métodos para la diferenciación de células pluripotentes en células madre hematopoyéticas CD34⁺ utilizando un medio definido se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 12/715.136 (consúltese la patente de los Estados Unidos No. 8.372.642). Se anticipa que estos métodos pueden usarse con la presente divulgación.

Por ejemplo, puede usarse un medio definido para inducir la diferenciación hematopoyética de CD34⁺. El medio definido puede contener los factores de crecimiento BMP4, VEGF, ligando de Flt3, IL-3 y/o GM-CSF. Las células pluripotentes se pueden cultivar en un primer medio definido que comprende BMP4, VEGF y, opcionalmente, FGF-2, seguido de cultivo en un segundo medio que comprende (ligando de Flt3, IL-3 y GM-CSF) o (ligando de Flt3, IL-3, IL-6 y TPO). El primer y segundo medio también pueden comprender uno o más de SCF, IL-6, G-CSF, EPO, FGF-2 y/o TPO. Las condiciones sustancialmente hipóxicas (p. ej., menos del 20 % de O₂) pueden promover aún más la diferenciación hematopoyética o endotelial.

Las células pueden individualizarse sustancialmente por medios mecánicos o enzimáticos (p. ej., usando tripsina o TrypLE^{MC}). También se puede incluir en los medios un inhibidor de ROCK (p. ej., H1152 o Y-27632). Se anticipa que estos enfoques pueden automatizarse usando, por ejemplo, automatización robótica.

En ciertas realizaciones, pueden usarse condiciones sustancialmente hipóxicas para promover la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras hematopoyéticas. Como reconocería un experto en la técnica, un contenido de oxígeno atmosférico de menos de aproximadamente 20,8% se consideraría hipóxico. Las células humanas en cultivo pueden crecer en condiciones atmosféricas con un contenido de oxígeno reducido en comparación con el aire ambiente. Esta hipoxia relativa puede lograrse disminuyendo el oxígeno atmosférico al que se exponen los medios de cultivo. Las células embrionarias se desarrollan típicamente *in vivo* en condiciones de oxígeno reducido, generalmente entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 6 % de oxígeno atmosférico, con dióxido de carbono a niveles ambientales. Sin desear limitarse a la teoría, se anticipa que las condiciones hipóxicas pueden imitar un aspecto de ciertas condiciones de desarrollo embrionario. Como se muestra en los siguientes ejemplos, las condiciones hipóxicas se pueden usar en ciertas realizaciones para promover la diferenciación adicional de células pluripotentes, tales como iPSC o hESC, en un tipo de célula más diferenciado, tal como las HPC.

Las siguientes condiciones hipóxicas pueden usarse para promover la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras hematopoyéticas. En ciertas realizaciones, un contenido de oxígeno atmosférico de menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 19 %, menos de aproximadamente 18 %, menos de aproximadamente 17 %, menos de aproximadamente 16 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 14 %, menos de aproximadamente 13 %, menos de aproximadamente 12 %, menos de aproximadamente 11 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 9 %, menos de aproximadamente 8 %, menos de aproximadamente 7 %, menos de aproximadamente 6 %, menos de aproximadamente 5 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2% o aproximadamente el 1% para promover la diferenciación en células precursoras hematopoyéticas. En determinadas realizaciones, la atmósfera hipóxica comprende aproximadamente un 5 % de oxígeno gaseoso.

Independientemente del medio específico que se utilice en cualquier expansión de células progenitoras hematopoyéticas dada, el medio utilizado se complementa preferiblemente con al menos una citocina a una concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, más usualmente 10 ng/ml a 100 ng/ml. Las citocinas adecuadas incluyen, entre otras, ligando de c-kit (KL) (también llamado factor de acero (StI), factor de crecimiento de mastocitos (MGF) y factor de células madre (SCF)), IL-6, G-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-1 α , IL-11 MIP-1 α , LIF, ligando c-mpl/TPO y ligando flk2/flk3 (Flt2L o Flt3L). Particularmente, el cultivo incluirá al menos uno de SCF, Flt3L y TPO. Más particularmente, el cultivo incluirá SCF, Flt3L y TPO.

En una realización, las citocinas están contenidas en el medio y se reponen mediante la perfusión del medio. Alternativamente, cuando se utiliza un sistema de biorreactor, las citocinas se pueden agregar por separado, sin perfusión de medios, como una solución concentrada a través de puertos de entrada separados. Cuando las citocinas se agregan sin perfusión, generalmente se agregarán como una solución de 10X a 100X en una cantidad igual a una décima parte a 1/100 del volumen en los biorreactores y se agregarán citocinas frescas aproximadamente cada 2 a 4 días. Además, las citocinas concentradas frescas también se pueden añadir por separado además de las citocinas en los medios perfundidos.

En algunas realizaciones, las HPC exhiben proteína 2 de unión a metil-CpG interrumpida (MeCP2) y se cultivan en condiciones para promover la diferenciación mieloide o la diferenciación linfóide. En algunos aspectos, las HPC expresan un MeCP2 no funcional que esencialmente no se une al ADN metilado. En ciertos aspectos, las HPC no expresan MeCP2 a niveles suficientes para efectuar la actividad de unión al ADN de MeCP2. En aspectos particulares, el MeCP2 no es funcional en virtud de un truncamiento o mutación en el gen MeCP2. En algunos aspectos, la obtención de HPC que exhiben MeCP2 alterado comprende poner en contacto las HPC con ARNpi, ARNph o un inhibidor de molécula pequeña de MeCP2.

(i) Ejemplo de método de diferenciación tridimensional

Un ejemplo de método para la diferenciación de PSC en HPC comprende el mantenimiento en condiciones sin alimentador, tal como en placas recubiertas con MATRIGEL^{MC} o vitronectina en medio Essential 8 (E8). Los agregados están hechos de PSC, particularmente subconfluentes, tal como <80% de confluencia) a una densidad de

0,5-1 millón de células por ml en el medio Essential 3 (E3) (p. ej., que contiene solo 3 de 8 componentes del medio E8: medio basal DMEM/F12, ácido ascórbico (p. ej., 100-500 μ M), 2-fosfato de magnesio y selenito de sodio) complementado con 50 ng/ml de FGF2, 50 ng/ml de VEGF, CHIR99021 2 μ M (inhibidor de GSK-3), y blebistatina (inhibidor de miosina-II) (p. ej., 2-10 μ M, tal como 10 μ M)). La formación de agregados y las etapas posteriores se realizan durante un cultivo de 24 horas en matraces de unión ultrabaja (ULA) con agitación continua.

Los agregados celulares formados (es decir, EB) se transfieren adicionalmente a un medio de diferenciación sin suero (por ejemplo, 50 % de IMDM, 50 % de medio F12 de Ham, 100 μ g/ml de alcohol polivinílico, 100 μ g/ml de albúmina de suero humano recombinante, 1x complemento de aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 0,1x complemento de lípidos químicamente definidos (Invitrogen), 2-fosfato de magnesio de ácido ascórbico 125 μ M, ácido linoleico 0,25 μ M, complementos de oligoelementos A (0,3x), B (0,2x) y C (0,1x) (Corning), cloruro de sodio 5 mM, monotioglicerol 100 μ M, etanolamina 20 μ M, 100 ng/ml de heparina y 10 ng/ml de IGF1) complementado con citocinas inductoras del mesodermo hematopoyético - 25 ng/ml de BMP4, 50 mg/ml de VEGF y 50 ng/ml de FGF2. Se continúan los cultivos, por ejemplo durante 4 días, con cambio completo del medio el segundo día.

Para apoyar la diferenciación y expansión de los progenitores CD34⁺ hematopoyéticos, los agregados celulares se transfieren adicionalmente a un medio de diferenciación sin suero (como antes) complementado con citocinas de apoyo hematopoyético, tal como 50 ng/ml de SCF, 20 mg/ml de TPO, 10 ng/ml de FLT3L, 20 ng/ml de IL-3 y 25 ng/ml de BMP4. Se continúan los cultivos, por ejemplo durante 4 días, con cambio completo del medio el segundo día.

Los cultivos se recolectan después del proceso de diferenciación, tal como después de 9 días. La suspensión de células individuales se obtiene mediante la digestión de agregados de células diferenciadas, tal como en la Accutase. A continuación, las células CD34⁺ aisladas, tal como las aisladas mediante MACS, se sembraron en cultivos de diferenciación de T/NK o se crioconservaron para su uso posterior en el plazo de 1 hora después del aislamiento.

(ii) Ejemplo de método de diferenciación bidimensional

En un ejemplo de método alternativo, las PSC se someten a un protocolo de diferenciación bidimensional para la producción de HPC. En primer lugar, las PSC se aclimatan a condiciones hipóxicas, tal como durante 5 a 10 pases, en condiciones sin alimentador, tal como en MATRIGEL^{MC} o recubiertos con vitronectina en medio Essential 8 (E8). Las PSC se individualizan y se colocan en placas de 6 pocillos recubiertas con amina PureCoat (Corning Inc.) a una densidad de 25000/cm² en presencia de medio definido sin suero (SFD) complementado con blebistatina 5 μ M (por ejemplo, 2-10 μ M, tal como 10 μ M). El medio basal SFD puede contener 75% de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con Glutamina y HEPES25 mM +P/S), 25% de F12 de Ham (Mediatech 10-080-CV), complemento de N2 al 0,5% (Invitrogen 17502-048), complemento de B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y monotioglicerol 4,5 x 10⁻⁴ M complementado con 50 ng/ml de BMP-4, VEGF y bFGF.

La inducción de la diferenciación hematopoyética se inicia el día 1 cultivando, por ejemplo, en medio basal SFD que contiene 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES 25 mM + P/S), 25 % de F12 de Ham (Mediatech 10-080-CV), complemento de N2 al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), complemento de B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y monotioglicerol 4,5 x 10⁻⁴ M complementado con 50 ng/ml de BMP4, VEGF y bFGF. El día 2, se aspira el medio y se colocan las células en medio EB1 fresco (p. ej., medio basal SFD que contiene 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES 25 mM + P/S), 25 % de F12 de Ham (Mediatech 10-080-CV), complemento de N2 al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), complemento de B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y monotioglicerol 4,5 x 10⁻⁴ M complementado con 50 ng/ml de BMP4, VEGF y bFGF) durante 48 horas adicionales.

En los días 5-10, se aspira el medio y las células se colocan en medio EB2 durante las siguientes 48 horas. El medio EB2 puede comprender medio basal SFD fresco que contiene 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES 25 mM + P/S), 25 % F12 de Ham (Mediatech 10-080-CV complemento de N2 al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), complemento de B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y monotioglicerol al 4,5 x 10⁻⁴ M complementado con 50 ng/ml de ligando de Flt-3, IL3, IL6, SCF y TPO cada uno a razón de 50 ng/ml y 5000 U/ml de heparina. Las células se recogen los días 7, 8, 9, 10 de diferenciación utilizando TrypLE y se tiñen para detectar la presencia de marcadores de HPC y progenitores linfoides.

2. Programación directa

Otros aspectos descritos en el presente documento proporcionan HPC mediante la programación directa de las CAR-PSC mediante la expresión de una combinación de genes de programación importantes para la diferenciación/función de las células hematopoyéticas. En un método, las PSC se modifican para expresar al menos tres genes de programación de precursores hematopoyéticos, tales como un gen ETS (p. ej., ETC2 o ERG), un gen de desarrollo hematopoyético (p. ej., GATA2) y un gen homeobox (p. ej., HOXA9), tal como se describe en el documento PCT/US2016/057893. En aspectos particulares, los genes ETV2/ERG, GATA2 y HOXA9 se coexpresan

mediante un vector, tal como un vector PiggyBac inducible, utilizando un promotor Tight bidireccional que se transfecta en las CAR-PSC.

Además, los EGH-CAR-PSC pueden modificarse adicionalmente para expresar genes adicionales para el potencial de injerto a largo plazo. Los ejemplos de genes incluyen HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1, HOXA4, ZNF414, KLF4, ZNF131, BCL2, ETV6, ZNF350 y/o RBAK. Por ejemplo, las PSC pueden transfectarse con uno o más vectores para expresar HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 y HOXA4.

Preferiblemente, los genes ETV2/GAT2/HOXA9 se expresan solo durante un período de tiempo suficiente para programación directa de las PSC en células precursoras hematopoyéticas. En consecuencia, los genes de programación de precursores hematopoyéticos pueden estar bajo el control de un promotor inducible. Por lo tanto, la expresión de los genes de programación de precursores hematopoyéticos puede inducirse en las PSC durante un período de tiempo suficiente para programación directa de las células precursoras hematopoyéticas de múltiples linajes. El período de tiempo puede ser de aproximadamente 1 día a aproximadamente 20 días, tal como aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días. Alternativamente, los genes de programación de precursores hematopoyéticos pueden introducirse en las PSC mediante un vector episomal. Por lo tanto, los genes de programación de precursores hematopoyéticos podrían expresarse transitoriamente en las PSC.

B. Diferenciación de células linfoides

Las HPC pueden luego diferenciarse adicionalmente a células de linaje linfóide, incluyendo células T, células NK y células T/NK. En algunos aspectos, las HPC durante la diferenciación se aíslan en los días 7-12, tal como en los días 8-11, para la diferenciación en células linfoides. Las HPC en esta etapa pueden identificarse mediante la expresión de CD34 y CD43. Además, las HPC con potencial linfóide pueden expresar CD144, DLL4, CD7 y CD235 a niveles bajos que disminuyen en el día 11, lo que implica que se necesita cierto nivel de umbral de expresión de estos marcadores para cebar las células hacia la diferenciación linfóide en presencia de DLL4.

En algunos aspectos, las HPC aisladas en los días 7-11, tal como el día 7, el día 8, el día 9, el día 10 o el día 11 del proceso de diferenciación, pueden diferenciarse en células linfoides tal como células T y NK. En algunos aspectos, la sincronización del origen de los progenitores linfoides coincide con la disminución de los progenitores hematoendoteliales y la aparición de progenitores eritroides durante la diferenciación de HPC. En aspectos particulares, las HPC del día 9 pueden tener una mayor eficiencia en la generación de células T. Las HPC capaces de diferenciación linfóide pueden aislarse y/o identificarse mediante la expresión de ciertos marcadores. Por ejemplo, las células con expresión superficial de CD34 y/o CD43, particularmente que expresan tanto CD34 como CD43, pueden seleccionarse para la diferenciación linfóide, tal como por clasificación MACS.

Los marcadores adicionales para detectar progenitores linfoides incluyen DLL4, CD144, CD31, CD34, CD43¹⁰, CD45^{10/-}, CD235, CD7, Flk-1, APNLR. En aspectos particulares, la presencia de poblaciones positivas dobles CD34/CD7, CD235/CD7, DLL4/CD34, DLL4/CD31, DLL4/CD144 o CD34/CD43¹⁰ se usa para identificar progenitores linfoides. La expresión de CD144 en HPC se tinte conjuntamente con CD31, CD34 y DLL4. La expresión de CD7 en HPC se tinte conjuntamente con CD235, CD34 y CD43. Por lo tanto, las HPC que expresan conjuntamente CD144 y CD7 demuestran precursores de captura de potencial linfóide que expresan ligando Notch unido a membrana (DLL4) junto con marcadores hematoendoteliales y crean la firma fenotípica para progenitores linfoides emergentes capaces de generar linajes de hematopoyesis definitiva *in vitro*. En aspectos particulares, las HPC pueden clasificarse adicionalmente en células con potencial linfóide mejorado clasificando los marcadores de superficie que incluyen CD31, CD34, CD144, CD43, CD45, CD6, CD335, Flk-1 y DLL4. En algunos aspectos, las fracciones positivas de CD114/CD34, CD144/CD45, CD144/CD7 y CD144/CD34/CD45/CD7 de HPC se diferencian en células linfoides. En aspectos particulares, las fracciones positivas para CD144/CD7 de HPC se diferencian en células linfoides.

Las HPC se pueden cultivar en condiciones definidas sin alimentador para la diferenciación linfóide. Un medio de cultivo puede contener uno o más componentes de la matriz, tal como RetroNectin, fibronectina o un péptido RGD. Sin desear limitarse a ninguna teoría, un componente de la matriz puede proporcionar un soporte sólido para el crecimiento de células madre embrionarias. En ciertas realizaciones, un componente de la matriz se puede aplicar a una superficie de cultivo y ponerse en contacto con el medio de cultivo antes de sembrar las células en el medio. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en un medio definido (p. ej., un medio TeSR) en placas recubiertas con fibronectina o MATRIGEL^{MC} antes de separar mecánicamente las células en grupos o individualizar las células e inducir la diferenciación en células precursoras hematopoyéticas.

Se pueden usar varios componentes de la matriz para cultivar células pluripotentes que incluyen colágeno (p. ej., colágeno IV), laminina, vitronectina, MATRIGEL^{MC}, gelatina, polilisina, trombospondina (p. ej., TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4 y/o TSP-5), y/o PRONECTIN-F^{MC}. En determinadas realizaciones, puede evitarse el uso de solo MATRIGEL^{MC}, colágeno IV o laminina con células previamente cultivadas usando TeSR debido a los posibles efectos adversos sobre la viabilidad celular; no obstante, estas composiciones se pueden usar ventajosamente en combinación con otros componentes de la matriz. Las combinaciones de estos componentes de la matriz pueden proporcionar un beneficio adicional para promover el crecimiento celular y la viabilidad celular. En determinadas

realizaciones, se pueden usar 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de los componentes de la matriz anteriores para cultivar células, por ejemplo, antes de la diferenciación hematopoyética.

En algunas realizaciones, se puede usar ácido ascórbico para mejorar la diferenciación linfóide. Los medios definidos pueden complementarse con ácido ascórbico aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 1 mM, tal como 100 a 500 μ M, tal como aproximadamente 50 μ M a aproximadamente 100 μ M, tal como aproximadamente 95 μ M. El ácido ascórbico se puede seleccionar de varios ascorbatos, tal como el fosfato de magnesio del ácido ascórbico. En algunas realizaciones, la nicotinamida (p. ej., ácido nicotínico) puede usarse para potenciar la diferenciación linfóide, tal como a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM.

En algunos aspectos, las HPC se diferencian en células linfoides, tal como células T, alterando la actividad endógena de un ligando Notch mediante la administración de una sustancia que aumenta la producción del ligando Notch en un sujeto. El método también incluye cultivar las células en un medio, en el que el medio incluye una cantidad eficaz de un ligando Notch y una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-7, IL-15, SCF, Flt-3 e IL-3. En algunas realizaciones particulares, el medio puede incluir además IL-6. En algunas realizaciones, el ligando Notch es el ligando Notch delta4 (DLL4), tal como la quimera DLL4:Fc.

Se selecciona un ligando Notch que promueve y mantiene la diferenciación y proliferación de células del linaje de células T. Un ligando Notch puede ser de origen humano o puede derivarse de otras especies, incluidas especies de mamíferos tales como roedores, perros, gatos, cerdos, ovejas, vacas, cabras y primates. Ejemplos particulares de ligandos Notch incluyen la familia Delta. La familia Delta incluye Delta-1 (Genbank, acceso No. AF003522, *Homo sapiens*), Delta-3 (Genbank, acceso No. AF084576, *Rattus norvegicus*), tipo Delta 1 (Genbank, acceso No. NM-005618 y NP-005609, *Homo sapiens*; Genbank, acceso No. X80903, 148324, *M. musculus*), tipo Delta 3 (Genbank, acceso No. NM_053666, N_446118, *Rattus norvegicus*), Delta-4 (Genbank, acceso No. AF273454, BAB18580, *Mus musculus*; Genbank, acceso No. AF279305, AAF81912, *Homo sapiens*), y tipo Delta 4 (Genbank, acceso No. Q9NR61, AAF76427, AF253468, NM-019074, *Homo sapiens*; Genbank, acceso No. NM_019454, *Mus musculus*). Los ligandos Notch están disponibles comercialmente o pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante y purificarse en varios grados.

El método incluye además la etapa de mantener las células HPC en el cultivo descrito anteriormente durante un tiempo suficiente para producir células NK diferenciadas. En algunas realizaciones, las células NK diferenciadas emergen en los cultivos junto con las células T, sin embargo, las células NK pueden dejar de proliferar después de la semana 6. En general, la determinación de un aumento en el número de células NK y/o su estado de diferenciación es evaluado utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células cultivadas pueden controlarse mediante citometría de flujo para determinar el desarrollo de células NK tiñendo las células con anticuerpos anti-CD56 y anti-CD3. El anticuerpo anti-CD3, tal como OKT3, puede estar presente en una concentración de 0,5 a 2 μ g. Las células que son CD56⁺/CD3⁻ serían indicativas de células NK diferenciadas.

En aspectos particulares, la diferenciación linfóide a células T CD3⁺ o células NK CD56⁺CD3⁻ se realiza mediante cultivo hipóxico bidimensional en placas recubiertas con retronectina y DLL4. En aspectos particulares, una placa tratada con cultivo no tisular puede recubrirse con proteína quimera DLL4:Fc y RetroNectin (fragmento de fibronectina CH-296; Takara Shuzo, Japón) para su uso en la diferenciación linfóide de HPC. La diferenciación puede comprender un primer período de diferenciación de células T/NK seguido de un segundo período de expansión de células T o NK. El primer período de diferenciación puede ser de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, y el segundo período de expansión también puede ser de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas. Por lo tanto, el período completo de diferenciación y expansión linfóide puede ser de aproximadamente 2 a 4 semanas.

En algunas realizaciones, el proceso de diferenciación linfóide puede comprender el cocultivo con células diana específicas de antígeno, tales como células tumorales específicas de antígeno, para aumentar la actividad citotóxica de las células T y las células NK. En aspectos particulares, el período de expansión de la diferenciación linfóide puede comprender el cocultivo con células diana específicas de antígeno. Por ejemplo, las células T CD19-CAR o las células NK se pueden cultivar conjuntamente con células tumorales CD19⁺ (p. ej., células Daudi CD19⁺) durante el período de expansión, tal como durante una a tres semanas, particularmente dos semanas. En algunos aspectos, el período de expansión puede comprender además la adición de citocinas, tal como IL2, IL15 y/o IL21, particularmente IL2, para mejorar la expansión. La concentración de las citocinas puede optimizarse, tal como de 10 a 50 μ M.

C. Cultivo celular

En ciertas realizaciones, pueden usarse condiciones sustancialmente hipóxicas para promover la diferenciación de HPC en linajes mieloides o linfoides. En ciertas realizaciones, puede usarse un contenido de oxígeno atmosférico de menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 19 %, menos de aproximadamente 18 %, menos de aproximadamente 17 %, menos de aproximadamente 16 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 14 %, menos de aproximadamente 13 %, menos de aproximadamente 12 %, menos de aproximadamente 11 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 9 %, menos de

aproximadamente 8 %, menos de aproximadamente 7 %, menos de aproximadamente 6 %, menos de aproximadamente 5 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 2 % o aproximadamente 1 % para promover la diferenciación en células precursoras hematopoyéticas. En determinadas realizaciones, la atmósfera hipóxica comprende aproximadamente un 5 % de oxígeno gaseoso.

Como se describe en el presente documento, se pueden usar ventajosamente uno o más medios de cultivo definidos para promover la diferenciación de HPC en linajes mieloides y linfoides; en particular, la eliminación de productos animales tales como suero y capas alimentadoras de ratón pueden reducir los riesgos asociados con la exposición de células a productos animales y permitir la generación de células que podrían administrarse de manera más segura a un sujeto humano. Dado que el desarrollo tradicional de cultivos de células madre se ha basado en productos de suero y capas alimentadoras de ratón para diferenciar las células madre en una variedad de tipos de células, estos procedimientos tradicionales han limitado la escala en la que se puede realizar la diferenciación, mayor variabilidad biológica y contaminación potencial, y obstaculizaron gravemente el uso de células ES en terapias traslacionales en las que, de lo contrario, podrían resultar útiles.

Generalmente, las células de la presente divulgación se cultivan en un medio de cultivo, que es una solución tamponada rica en nutrientes capaz de sostener el crecimiento celular. Los medios de cultivo adecuados para aislar, expandir y diferenciar células madre pluripotentes en células precursoras hematopoyéticas y células hematopoyéticas de acuerdo con el método descrito en este documento incluyen, pero no se limitan a, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa, DMEM/F-15, RPMI 1640, medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) y SFM Opti-MEM (Invitrogen Inc.). El medio químicamente definido comprende un medio mínimo esencial tal como el medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) (Gibco), complementado con albúmina de suero humano, lipoproteína ExCyte humana, transferrina, insulina, vitaminas, aminoácidos esenciales y no esenciales, piruvato de sodio, glutamina y también es adecuado un mitógeno. Como se usa en el presente documento, un mitógeno se refiere a un agente que estimula la división de una célula. Un agente puede ser una sustancia química, generalmente alguna forma de proteína que alienta a una célula a comenzar la división celular, desencadenando la mitosis. En una realización, los medios libres de suero tales como los descritos en el documento serial No. 08/464.599 (consúltese la patente de los Estados Unidos No. 5.908.782) y el documento WO 96/39487, y el "medio completo" como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5.486.359 se contemplan para su uso con los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el medio de cultivo se complementa con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, suero autólogo humano, suero AB humano o plasma rico en plaquetas complementado con heparina (2 U/ml).

Las células inmunes pueden generarse cultivando células madre pluripotentes o células precursoras hematopoyéticas en un medio en condiciones que aumentan el nivel intracelular de factores suficientes para promover la diferenciación de las células en linajes mieloides o linfoides. El medio también puede contener uno o más agentes de diferenciación y maduración de células hematopoyéticas, tal como varios tipos de factores de crecimiento. Estos agentes pueden ayudar a inducir a las células a comprometerse con un fenotipo más maduro, o preferiblemente promover la supervivencia de las células maduras, o tener una combinación de ambos efectos. Los agentes de diferenciación y maduración pueden incluir factores de crecimiento solubles (hormonas peptídicas, citocinas, complejos ligando-receptor y otros compuestos) que son capaces de promover el crecimiento de células del linaje de células hematopoyéticas. Los ejemplos no limitantes de dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento hematopoyéticos o endoteliales tales como factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), ligando de FLT-3 (FLT3L), interleucina 3 (IL-3), interleucina 6 (IL-6), interleucina 9 (IL-9) o factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), o isoformas o variantes de los mismos.

IV. Usos de las células inmunitarias específicas de antígeno

Las células efectoras inmunitarias específicas de antígeno proporcionadas por métodos y composiciones de ciertos aspectos pueden usarse en una variedad de aplicaciones. Estos incluyen, pero no se limitan a, trasplante o implantación de las células *in vivo*; detección de compuestos citotóxicos, carcinógenos, crecimiento de mutágenos/factores reguladores, compuestos farmacéuticos, etc., *in vitro*; dilucidar el mecanismo de las enfermedades y lesiones hematológicas; estudiar el mecanismo por el cual operan los fármacos y/o los factores de crecimiento; diagnosticar y controlar el cáncer en un paciente; terapia génica; y la producción de productos biológicamente activos, por nombrar sólo algunos.

A. Detección del compuesto de prueba

Las células inmunitarias de esta divulgación se pueden usar para detectar factores (tales como disolventes, fármacos de molécula pequeña, péptidos y polinucleótidos) o condiciones ambientales (tales como condiciones de cultivo o manipulación) que afectan las características de las células linfoides proporcionadas en el presente documento.

Las aplicaciones particulares de detección de esta divulgación se relacionan con el ensayo de compuestos farmacéuticos en la investigación de fármacos. En general, se remite al lector al libro de texto estándar *In vitro*

Methods in Pharmaceutical Research, Academic Press, 1997, y la patente de los Estados Unidos No. 5.030.015. En ciertos aspectos, las células mieloides y linfoides desempeñan el papel de células de prueba para ensayos estándar de detección y toxicidad de fármacos, como se ha realizado previamente en células hematopoyéticas y precursores en cultivo a corto plazo. La evaluación de la actividad de los compuestos farmacéuticos candidatos generalmente implica combinar las células hematopoyéticas o los precursores proporcionados en ciertos aspectos con el compuesto candidato, determinando cualquier cambio en la morfología, fenotipo marcador o actividad metabólica de las células que sea atribuible al compuesto (en comparación con células no tratadas o células tratadas con un compuesto inerte), y luego correlacionar el efecto del compuesto con el cambio observado. La detección se puede realizar porque el compuesto está diseñado para tener un efecto farmacológico sobre las células hematopoyéticas o los precursores, o porque un compuesto diseñado para tener efectos en otros lugares puede tener efectos no deseados sobre las células hematopoyéticas o los precursores. Se pueden probar dos o más fármacos en combinación (combinándose con las células de forma simultánea o secuencial) para detectar posibles efectos de interacción fármaco-fármaco.

B. Terapia celular adoptiva

Se describen además métodos para inmunoterapia que comprenden administrar una cantidad eficaz de las células inmunitarias descritas en el presente documento. Una enfermedad o trastorno médico puede tratarse mediante la transferencia de una población de células inmunitarias que provoca una respuesta inmunitaria. El cáncer o la infección pueden tratarse mediante la transferencia de una población de células inmunitarias que provoca una respuesta inmunitaria. En el presente documento se proporcionan métodos para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una terapia celular específica de antígeno. Los presentes métodos pueden aplicarse para el tratamiento de trastornos inmunitarios, cánceres sólidos, cánceres hematológicos e infecciones virales.

Los tumores para los que son útiles los presentes métodos de tratamiento incluyen cualquier tipo de célula maligna, como las que se encuentran en un tumor sólido o un tumor hematológico. Los ejemplos de tumores sólidos pueden incluir, pero no se limitan a, un tumor de un órgano seleccionado del grupo que consiste en páncreas, colon, ciego, estómago, cerebro, cabeza, cuello, ovario, riñón, laringe, sarcoma, pulmón, vejiga, melanoma, próstata y mama. Los ejemplos de tumores hematológicos incluyen tumores de la médula ósea, tumores malignos de células T o B, leucemias, linfomas, blastomas, mielomas y similares. Otros ejemplos de cánceres que pueden tratarse utilizando los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón (incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el adenocarcinoma de pulmón y el carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer gástrico o de estómago (incluido el cáncer gastrointestinal y el cáncer del estroma gastrointestinal), cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, varios tipos de cáncer de cabeza y cuello y melanoma.

El cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a estos: neoplasma, maligno; carcinoma; carcinoma, no diferenciado; carcinoma de células fusiformes y gigantes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfopitelial; carcinoma de células basales; pilomatrix carcinoma; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma quístico adenoide; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma branquilo-alveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma de la corteza suprarrenal; carcinoma endometrioide; carcinoma de apéndices cutáneos; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma de conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamario; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecomoma, maligno; tumor de células de la granulosa, maligno; androblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma, maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma lentigo, maligno; melanomas lentiginosos acrales; melanomas nodulares; melanoma maligno en nevus pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario; rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoides, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; estruma ovárico, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendoteloma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno;

linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes del hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma, maligno; enfermedad de Hodgkin; de Hodgkin; paragranuloma; linfoma, maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; linfoma de células B; linfoma no Hodgkin (NHL) de bajo grado/folicular; NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células pequeñas no escindidas de alto grado; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; macroglobulinemia de Waldenstrom; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mielóide; leucemia basófila; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mielóide; leucemia de células pilosas; leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia mielóide aguda (ALM); y leucemia mieloblástica crónica.

Para determinar la idoneidad de las células proporcionadas en el presente documento para aplicaciones terapéuticas, las células pueden probarse primero en un modelo animal adecuado. En un nivel, se evalúa la capacidad de las células para sobrevivir y mantener su fenotipo *in vivo*. Las células proporcionadas en este documento se administran a animales inmunodeficientes (tales como ratones NOG, o animales inmunodeficientes químicamente o por irradiación) en un sitio susceptible de observación adicional, tal como debajo de la cápsula renal, en el bazo, en un lóbulo hepático o en la médula ósea. Los tejidos se recolectan después de un período de unos pocos días a varias semanas o más, y se evalúan para determinar si los tipos de células iniciales, como los eritrocitos, todavía están presentes. Esto se puede realizar proporcionando a las células administradas un marcador detectable (como proteína fluorescente verde o β -galactosidasa); o midiendo un marcador constitutivo específico para las células humanas administradas. Cuando las células proporcionadas en este documento se analicen en un modelo de roedor, la presencia y el fenotipo de las células administradas se pueden evaluar mediante inmunohistoquímica o ELISA utilizando anticuerpos específicos para humanos, o mediante análisis de RT-PCR utilizando cebadores y condiciones de hibridación que hacen que la amplificación sea específica para secuencias de polinucleótidos humanos. Los marcadores adecuados para evaluar la expresión génica a nivel de ARNm o proteína se proporcionan en otra parte de esta divulgación.

Las células inmunitarias proporcionadas por los métodos de la presente divulgación pueden probarse en varios modelos animales para determinar su capacidad para tratar trastornos y lesiones hematológicas. Por ejemplo, un modelo de ratón con anemia de células falciformes o el ratón con eliminación de Rag-2 deficiente en células T/B pueden ser modelos animales particularmente útiles para probar las células mieloides y linfoides divulgadas en el presente documento.

Las células inmunes proporcionadas en ciertos aspectos de la presente divulgación que demuestran características funcionales deseables o eficacia en modelos animales, también pueden ser adecuadas para la administración directa a sujetos humanos que las necesiten. Para fines de homeostasia, las células pueden administrarse en cualquier sitio que tenga acceso adecuado a la circulación. Las células hematopoyéticas o sus precursores también pueden administrarse en un sitio de lesión o enfermedad.

Las células proporcionadas en ciertos aspectos de esta presente divulgación se pueden usar para la terapia de cualquier sujeto que lo necesite. Las condiciones humanas que pueden ser apropiadas para dicha terapia incluyen las diversas anemias y hemoglobinopatías, así como enfermedades caracterizadas por un número reducido de células hematopoyéticas (como, por ejemplo, síndrome mielodisplásico, mielofibrosis, neutropenia, agranulocitosis, trombostenia de Glanzmann, trombocitopenia y síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Para la terapia humana, la dosis es generalmente entre aproximadamente 10^9 y 10^{12} células, y típicamente entre aproximadamente 5×10^9 y 5×10^{10} células, haciendo ajustes para el peso corporal del sujeto, naturaleza y gravedad de la afección, y la capacidad replicativa de las células administradas. La responsabilidad última de determinar el modo de tratamiento y la dosis adecuada recae en el médico tratante.

Se pueden administrar cantidades terapéuticamente eficaces de células inmunitarias por varias vías, incluida la administración parenteral, por ejemplo, inyección o infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal o intraarticular.

La cantidad terapéuticamente eficaz de células inmunitarias para usar en la terapia celular adoptiva es aquella cantidad que logra un efecto deseado en un sujeto que se está tratando. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad de células inmunitarias necesarias para inhibir el avance o provocar la regresión de una enfermedad autoinmune o aloinmune, o que sea capaz de aliviar los síntomas causados por una enfermedad autoinmune, como el dolor y la inflamación. Puede ser la cantidad necesaria para aliviar los síntomas asociados a la inflamación, como dolor,

edema y temperatura elevada. También puede ser la cantidad necesaria para disminuir o prevenir el rechazo de un órgano trasplantado.

La población de células inmunitarias se puede administrar en regímenes de tratamiento consistentes con la enfermedad, por ejemplo, una dosis única o pocas dosis durante uno o varios días para mejorar un estado de enfermedad o dosis periódicas durante un tiempo prolongado para inhibir la progresión de la enfermedad y prevenir la reaparición de la enfermedad. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y deberá decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. La cantidad terapéuticamente eficaz de células inmunitarias dependerá del sujeto que se trate, la gravedad y el tipo de afección y la forma de administración. Las dosis que podrían usarse en el tratamiento de sujetos humanos pueden variar de al menos $3,8 \times 10^4$, al menos $3,8 \times 10^5$, al menos $3,8 \times 10^6$, al menos $3,8 \times 10^7$, al menos $3,8 \times 10^8$, al menos $3,8 \times 10^9$ o al menos $3,8 \times 10^{10}$ células inmunitarias/m². La dosis utilizada en el tratamiento de sujetos humanos puede oscilar entre aproximadamente $3,8 \times 10^9$ a aproximadamente $3,8 \times 10^{10}$ células inmunitarias/m². Una cantidad terapéuticamente eficaz de células inmunitarias puede, por ejemplo variar desde aproximadamente 5×10^6 células por kg de peso corporal hasta aproximadamente $7,5 \times 10^8$ células por kg de peso corporal, tal como aproximadamente 2×10^7 células a aproximadamente 5×10^8 células por kg de peso corporal, o de aproximadamente 5×10^7 células a aproximadamente 2×10^8 células por kg de peso corporal. La cantidad exacta de células inmunitarias la determina fácilmente un experto en la técnica en función de la edad, el peso, el sexo y el estado fisiológico del sujeto. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba en modelos animales o *in vitro*.

Las células inmunitarias pueden administrarse en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos para el tratamiento del trastorno inmunomediado (no reivindicado). Las terapias combinadas pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos, agentes antivirales y agentes antifúngicos), agentes antitumorales (por ejemplo, fluorouracilo, metotrexato, paclitaxel, fludarabina, etopósido, doxorubicina o vincristina), agentes inmunodepresores (por ejemplo, fludarabina, etopósido, doxorubicina o vincristina), agentes inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina o glucocorticoides, tales como dexametasona o prednisona), agentes antiinflamatorios (por ejemplo, glucocorticoides tales como hidrocortisona, dexametasona o prednisona), o agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como ácido acetilsalicílico, ibuprofeno o naproxeno sódico), citocinas (por ejemplo, interleucina 10 o factor beta de crecimiento transformante), hormonas (por ejemplo, estrógeno) o una vacuna. Además, agentes inmunosupresores o tolerogénicos que incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de calcineurina (p. ej., ciclosporina y tacrolimus); inhibidores de mTOR (p. ej., rapamicina); micofenolato de mofetilo, anticuerpos (p. ej., que reconocen CD3, CD4, CD40, CD154, CD45, IVIG o células B); agentes quimioterapéuticos (p. ej., metotrexato, treosulfano, busulfano); irradiación; o pueden administrarse quimiocinas, interleucinas o sus inhibidores (por ejemplo, BAFF, IL-2, anti-IL-2R, IL-4, inhibidores de la quinasa JAK). Dichos agentes farmacéuticos adicionales pueden administrarse antes, durante o después de la administración de las células inmunitarias, según el efecto deseado. Esta administración de las células y el agente puede ser por la misma vía o por vías diferentes, y en el mismo sitio o en un sitio diferente.

C. Composiciones Farmacéuticas

También se proporcionan en este documento composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden células inmunitarias (p. ej., células T o células NK) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La administración puede ser autóloga o no autóloga. Por ejemplo, las células T y/o las células NK y las composiciones que comprenden las mismas pueden obtenerse de un sujeto y administrarse al mismo sujeto o a un sujeto compatible diferente. Las células inmunitarias de la presente divulgación pueden administrarse mediante inyección localizada, incluida la administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica de la presente divulgación, generalmente se formulará en una forma inyectable de dosificación unitaria (por ejemplo, solución, suspensión, emulsión).

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas que se describen en el presente documento se pueden preparar mezclando los ingredientes activos (tal como un anticuerpo o un polipéptido) que tienen el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, decimosegunda edición, 2012), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Ejemplos de vehículos

farmacéuticamente aceptables en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas de hialuronidasa activa neutra soluble (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertos ejemplos de sHASEGP y métodos de uso, incluida rHuPH20, se describen en las publicaciones de patentes de los Estados Unidos Nos. 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

V. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, pueden considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y seguir obteniendo un resultado parecido o similar.

Ejemplo 1 - Derivación de células T/NK derivadas de PSC que expresan CAR anti-CD19

Para generar células madre pluripotentes que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR), se usaron dos métodos separados. En un método, las PSC sin transgén se derivaron de células T usando vectores retrovirales para producir células 1C (documento US20160257939) o vectores episomales para producir células E11. En el segundo método, las PSC se transfectaron con un vector de expresión PiggyBac que codifica los genes de programación hematopoyética ETV2/ERG, GATA2 y HOXA9 (ESC H1 modificadas con genes de programación hematopoyética ETV2-GATA2-HOXA9 (EGH) inducibles por DOX introducidos) para producir células A16. Las PSC de ambos métodos se modificaron genéticamente para expresar constitutivamente un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti CD 19 humano de segunda generación compuesto por el dominio scFv de unión a CD19 humano derivado del mAb FMC63, el dominio coestimulador de CD28 y el dominio de señalización de CD3ζ.

Las PSC no modificadas y modificadas con CAR se diferenciaron en progenitores T/NK CD34⁺ mediante diferenciación dirigida por citocinas (1C, E11) o programación inducida por EGH (A16) (Figs. 1A-B). Los progenitores CD34⁺ aislados se diferenciaron aún más en células T CD3⁺ (1C, E11) y NK CD3⁺CD56⁺ (A16) utilizando un cultivo hipóxico de 4 semanas en placas recubiertas con DLL4/retronectina en SFEM StemSpan (Stem Cell Technologies) complementado con fosfato de magnesio de ácido ascórbico (0,25 mM), nicotinamida (2 mM) y citocinas (SCF, TPO, FLT3L, IL7, IL2). En cultivos T/NK paralelos, se añadieron células Daudi tratadas con mitomicina C (línea de células linfoblastoides B CD19⁺ negativas para HLA de clase I deficientes en microglobulina β2) durante las últimas 2 semanas de diferenciación como fuente de activación de CAR específica para antígeno (CD19). Las células T/NK generadas se designaron como sigue: células T derivadas de 1C o E11 - T, CAR-T, CAR-T/Ag (cocultivo de Daudi); células NK derivadas de A16 - NK, CAR-NK, CAR-NK/Ag (cocultivo de Daudi).

La expresión de CAR a lo largo de las etapas de diferenciación se evaluó mediante citometría de flujo usando tinción con proteína L. Las células T CD3⁺ se tiñeron conjuntamente con mAb anti CD3 humana de ratón de cadena lambda (clon SP34-2). Después de la diferenciación a células T/NK, la expresión de CAR se silenció significativamente, sin embargo, las células T y NK positivas para CAR podrían expandirse selectivamente después del cultivo de activación con antígeno específico de CAR (Ag; cocultivo con células Daudi CD19⁺).

La función citotóxica de las células T (1C) y NK (A16) derivadas de PSC se evaluó mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro* usando células diana Daudi y Raji CD19⁺ que expresan luciferasa. Las dianas se incubaron con efectores T/NK durante 24 horas en una proporción de 1:1 y la actividad de luciferasa se cuantificó en lisados de cultivo mediante el sistema de ensayo de luciferasa Steady-Glo (Promega). El porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante la fórmula: $(1-(ET/T)) \times 100$, en la que ET - cultivo de efectores + dianas, T - únicamente dianas.

Mientras que las células T/NK no modificadas carecían de cualquier actividad detectable, tanto las células T (1C) como las NK (A16) que expresan CAR mostraron citotoxicidad frente a las dianas CD19⁺. La actividad citotóxica dependiente de CAR mejoró significativamente después de 2 semanas de cocultivo de T/NK con células diana CD19⁺ (Daudi) (variante CAR/Ag) (Fig. 3A).

El potencial citolítico de las células CAR-T se confirmó mediante el recuento de células diana en tiempo real utilizando el sistema de análisis de células vivas Incucyte S3 (Essen Bioscience). Se incubaron células diana Raji CD19⁺ que expresan GFP con células T derivadas de PSC (TiPSC E11) no modificadas y transfectadas con CAR en una proporción de 1:1. Se realizaron imágenes de lapso de tiempo y recuento de células Raji GFP⁺ durante 9 horas. Se detectó una disminución significativa de células Raji viables (GFP⁺) en cultivo con células CAR-T solamente (Fig. 3B).

Las células CAR-T que se generaron mediante la diferenciación de T/NK de 2 semanas seguida de 1 semana de cultivos de expansión de células T inducidas por anti-CD3 a partir de HPC CD34⁺ derivadas de PSC (TiPSC E11) se incubaron 24 horas con células de mastocitoma P815 de ratón transfectadas con antígeno CD19 humano (P815

CD19⁺) y P815 no transfectadas para evaluar la producción de citocinas inducidas por CAR y constitutivas, respectivamente. Las citocinas se midieron en los sobrenadantes de cultivo usando el ensayo de citocinas multiplex de citometría de flujo LEGEND Plex (BioLegend) (Fig. 4). Las células CAR-T demostraron una producción específica inducida por CAR de IFN γ , TNF α , IL2, IL13 y GM-CSF. Las propiedades citotóxicas de las células T CAR derivadas de PSC también se revelaron mediante la secreción constitutiva de Granzima B.

Para probar la eficacia de las células CAR-T *in vivo*, se inyectaron por vía intraperitoneal (ip) ratones NSG de 8 semanas de edad con 5×10^4 células Raji que expresan luciferasa. Al día siguiente (día 1), se inyectaron (ip) células T (derivadas de 1C) y NK (derivadas de A16) a una dosis de 10^7 /ratón. Las inyecciones de T/NK se repitieron los días 3 y 5. Durante las inyecciones de T/NK (días 1-5), a todos los ratones se les inyectó (ip) adicionalmente la combinación de citocinas IL2 e IL15 (ambas a razón de 500 ng/ratón). La progresión tumoral en ratones se controló mediante formación de imágenes bioluminiscentes *in vivo* cada 2 semanas (Fig. 5A). Los ratones anestesiados inyectados (ip) con 150 mg/kg de luciferina InVivo-Glo (Promega) se analizaron dentro de los 15 minutos posteriores a la inyección de luciferina utilizando el generador de imágenes *in vivo* Pearl Trilogy (LiCor). Las curvas de supervivencia en los diferentes grupos de ratones tratados con células T (1C) o NK (A16) derivadas de PSC se muestran en la Fig. 5B.

Los tumores detectados a las 2 semanas se suprimieron significativamente, y la supervivencia promedio de los ratones se prolongó aproximadamente 2 veces con un curso de tratamiento (3 inyecciones con intervalos de 2 días) con células T o NK derivadas de PSC que expresan CAR. El potencial oncolítico *in vivo* se puede mejorar significativamente mediante el cocultivo previo de células T o NK derivadas de PSC que expresan CAR con células tumorales positivas para antígeno *in vitro*.

Ejemplo 2 - Métodos de diferenciación dirigida

Diferenciación de PCS en progenitores linfohematopoyéticos CD34⁺: Las PSC derivadas de células T del Ejemplo 1 (TiPSC 1C y E11 derivadas de células T de sangre periférica mediante reprogramación episomal y retroviral, respectivamente) se diferenciaron en progenitores hematopoyéticos CD34⁺ a través de cultivos de agregados en suspensión. Las PSC se mantuvieron en condiciones sin alimentador en placas de 6 pocillos recubiertas con Matrigel^{MC} o vitronectina en medio Essential 8 (E8). Los agregados se elaboraron a partir de PSC subconfluentes (confluencia <80 %) a una densidad de 0,5 millones de células por ml en medio E8 complementado con CHIR99021 2 μ M (inhibidor de GSK-3) y blebistatina 5 μ M (inhibidor de miosina-II). La formación de agregados se llevó a cabo durante un cultivo de 6 horas en matraces de unión ultrabaja (ULA) con agitación continua en la plataforma basculante a 15-20 rpm (incluidas todas las etapas de cultivo posteriores).

El cultivo con agregados celulares preformados se transfirió gradualmente a medio de diferenciación hematopoyética sin suero (HDM: 50 % de IMDM, 50 % de medio F12 de Ham, 100 μ g/ml de alcohol polivinílico, 100 μ g/ml de albúmina de suero humana recombinante, complemento de aminoácidos no esenciales 1x (Invitrogen), complemento de lípidos químicamente definidos 0,1x (Invitrogen), 2-fosfato de magnesio de ácido ascórbico 125 μ M, ácido linoleico 0,25 μ M, complementos de oligoelementos A (0,3 x), B (0,2 x) y C (0,1x) (Corning), cloruro de sodio 5 mM, monotioglicerol 100 μ M, etanolamina 20 μ M, 100 ng/ml heparina y 10 ng/ml de IGF1) complementado con CHIR99021 2 μ M, 50 ng/ml de VEGF y 50 ng/ml FGF2 mediante adiciones de volúmenes iguales de medio a las 6 y 24 horas. El día 2, los agregados celulares se asentaron por sedimentación durante 15 minutos, se aspiró el medio y los cultivos se transfirieron a HDM complementado con citocinas inductoras de mesodermo hematopoyético - 25 ng/ml de BMP4, 50 ng/ml de VEGF y 50 ng/ml de FGF2. Los cultivos continuaron durante 3 días con un cambio completo del medio cada día.

Para apoyar la diferenciación y expansión de los progenitores CD34⁺ hematopoyéticos, los agregados celulares se transfirieron adicionalmente a HDM complementado con citocinas de apoyo hematopoyético - 50 ng/ml de SCF, 50 ng/ml de TPO, 20 ng/ml de FLT3L y 20 ng/ml de IL-3. Los cultivos continuaron durante 3-5 días con un cambio completo del medio todos los días. Para mejorar el proceso de transición hematopoyética, se pueden agregar los siguientes componentes potenciadores: IL11 (5-20 ng/ml), 8Br-cAMP (100-300 μ M) y/o VEGF (20-50 ng/ml).

Las HPC identificadas en suspensión como células individuales flotantes o pequeños grupos se recolectaron después de un proceso de diferenciación de 2+3+3-5 días (total 8-10 días). Las HPC se aislaron por filtración de todo el cultivo de diferenciación a través de filtros de células de 70 μ m y 30 μ m (Corning). Las HPC recogidas del filtrado por centrifugación se lavaron una vez en HDM y se resuspendieron en TCDM (medio de diferenciación de células T). Para enriquecer las HPC con potencial T/NK, el aislamiento de la fracción HPC CD34⁺ se puede realizar mediante la clasificación de células activadas por imán (MACS) utilizando microesferas CD34 directas (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las HPC se sembraron en placa en cultivos de diferenciación de T/NK o se criopreservaron para su uso posterior dentro del lapso de una hora desde el aislamiento.

Cultivos de diferenciación de T/NK: Para la diferenciación de T/NK, se recubrieron placas de plástico no tratadas con cultivo tisular con proteína química hDLL4-Fc con ligando Notch y retronectina diluida en PBS (a razón de 0,5 μ g/cm² cada una). Antes de sembrar las células, se aspiró la solución de recubrimiento, se lavaron las placas una vez con PBS y se llenaron con 0,25 ml/cm² de medio de diferenciación de células T (TCDM) que consiste en SFEM

StemSpan (Stem Cell Technologies), GlutaMax (1/100), fosfato de magnesio de ácido ascórbico (250 μ M), nicotinamida (2 mM) y citocinas SCF, TPO, FLT3L e IL7 (a razón de 50 ng/ml cada una). Las HPC derivadas de PSC se sembraron en placas a una densidad de 5000 células/cm² y se cultivaron en una incubadora de CO₂ hipóxica (5 % de O₂) durante 2 semanas con la adición de un volumen de cultivo de TCDM igual el día 3 e intercambiando la mitad del volumen de cultivo cada segundo día. Las células diferenciadas totales se recogieron mediante una resuspensión suave y la recogida de las células no adherentes seguida de la recogida de las células unidas de forma suelta mediante un tratamiento de 5-10 min con PBS-EDTA (0,5 mM). Para continuar el proceso de diferenciación y mejorar el rendimiento de las células T/NK, el cultivo de diferenciación de células T puede repetirse volviendo a sembrar las células recolectadas en placas de DLL4/retronectina recién preparadas a una densidad de 10000 células/cm², hasta obtener el rendimiento deseado de células T/células NK. La eficacia de la diferenciación de T/NK también se puede mejorar mediante la adición de los siguientes componentes potenciadores en TCDM: CHIR99021 (1-3 μ M), IL2 (2-10 ng/ml), IL12 (10-50 ng/ml).

Cultivos de expansión de células T: para la expansión de células T, las placas no tratadas con cultivos de tejidos se recubrieron con mAb anti-CD3 (clon OKT3), hDLL4-Fc y retronectina diluida en PBS (a razón de 0,5 μ g/cm² cada una). Antes de sembrar las células, se aspiró la solución de recubrimiento, se lavaron las placas una vez con PBS y se llenaron con 0,25 ml/cm² de medio de expansión de células T (TCM) que consiste en SFEM StemSpan (Stem Cell Technologies), Glutamax (1/100), fosfato de magnesio de ácido ascórbico (250 μ M), nicotinamida (2 mM) y citocinas SCF, TPO, FLT3L, IL7 (a razón de 50 ng/ml cada una) e IL2, IL15 (a razón de 10 ng/ml cada una). También podría añadirse IL21 (5-20 ng/ml) para mejorar la expansión. Las células recolectadas de cultivos de diferenciación de T/NK se sembraron en placas a una densidad de 10000 células/cm² y se cultivaron en una incubadora de CO₂ hipóxica (5% de O₂) hasta 2 semanas con la adición de un volumen de cultivo igual de TCM el día 3 y el intercambio de la mitad del volumen de cultivo cada segundo día. Las células T expandidas se recogieron mediante resuspensión suave y recolectaron de las células no adherentes.

Ejemplo 3 - Caracterización del método de diferenciación dirigida

Las PSC primero se diferenciaron en HPC CD34⁺ en cultivo de agregados de células en suspensión a través de etapas sucesivas de cebado de diferenciación inducida con WNT, inducción de mesodermo y diferenciación de HPC durante 8-10 días (Fig. 1B). La fracción de HPC se aisló por filtración. No se realizó clasificación de MAC de HPC CD34⁺, aunque se puede realizar opcionalmente utilizando perlas paramagnéticas directas de CD34 (Miltenyi Biotec). A continuación, las HPC se transfirieron a placas recubiertas con retronectina DLL4-Fc⁺ humana para la diferenciación de T/NK durante 2-4 semanas. Las células T podrían expandirse adicionalmente durante 1-2 semanas en cultivo en placas recubiertas con mAb anti-CD3 (clon OKT3).

Las células CD34⁺ derivadas de PSC (1C TiPSC) después de 2 semanas en condiciones de diferenciación de T/NK desarrollaron una población de células linfoides típica definida por parámetros bajos de FSC/SSC (Fig. 1D, diagrama de puntos a la izquierda). Esta población linfoide contenía principalmente células T CD3⁺ y células NK CD56⁺CD3⁻ (Fig. 1D, diagrama de puntos en la mitad). La población de células T incluía células positivas sencillas y dobles CD4⁺ y CD8⁺, así como una proporción significativa de células negativas dobles (Fig. 1D, gráfico de puntos a la derecha).

Los rendimientos de cada tipo de célula respectivo se calcularon como una relación entre el número de células absoluto de las que salen con respecto a las que entran en cada etapa de la derivación celular. Por ejemplo, un rendimiento de HPC CD34⁺ de 1,5 indica que en promedio, 1,5 (salida) de las HPC CD34⁺ pueden derivarse de 1 PSC (entrada). Por consiguiente, el rendimiento de 102 células T indica que 102 células T (salida) pueden derivarse de 1 HPC CD34⁺ (entrada) (Fig. 1E).

Las células T derivadas de PSC (1C TiPSC) (CD3⁺) se diferenciaron y expandieron durante 4 semanas y expresaron TCR α/β (no γ/δ o TCR NKT V α 24 invariable) y marcadores típicos de células T CD5, CD27, y CD7 (Fig. 1F). También expresaron marcadores citotóxicos asociados a T/NK (CD161, CD94) y de activación (CD69).

Los anticuerpos anti-CD3 inmovilizados (iCD3) fueron mínimamente necesarios y suficientes para lograr la expansión de las células T derivadas de PSC (Fig. 1G, gráfico de barras). La estimulación soluble con mAb CD3 y CD28 (sCD3, sCD28) no fue eficaz ni sola ni en combinación (sCD3+sCD28), o cuando se añadieron a iCD3 (iCD3+sCD28). Las células T que proliferaban en los cultivos de expansión adquirieron una morfología característica de linfoblastos de forma irregular (Fig. 1G, fotografía). En contraste con la población de células de entrada relativamente heterogénea, las células recolectadas de la expansión de células T de 2 semanas eran esencialmente células T CD3⁺ puras, que también expresaban CD56 y adquirían la expresión de CD8 (Fig. 1G, diagramas de puntos de citometría de flujo). Por lo tanto, el método de diferenciación dirigida produjo eficientemente células T.

Todos los métodos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Si bien las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a los métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente pueden sustituir a los agentes descritos en el presente documento mientras que se lograrían

resultados iguales o similares. Todos estos sustitutos y modificaciones similares son evidentes para los expertos en la técnica.

Referencias

Las siguientes referencias pueden proporcionar ejemplos de procedimientos u otros detalles complementarios a los expuestos en el presente documento.

- Akkina et al., J. Virol., 70: 2581-2585, 1996.
- 10 Alexander et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5092-5096, 1988.
- Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., MA, 1996.
- Biswas et al., Annals NY Acad. Sci., 590: 582-583, 1990.
- Biswas, et al., J. Clin. Microbiol., 29: 2228-2233, 1991.
- 15 Blomer et al., J. Virol., 71(9): 6641-6649, 1997.
- Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8): 2745-2752, 1987.
- Chen et al., Nature Methods 8: 424-429, 2011.
- Chothia et al., EMBO J. 7: 3745, 1988.
- Doulatov et al., Cell Stem Cell. 10:120-36, 2012.
- 20 Ercolani et al., J. Biol. Chem., 263: 15335-15341, 1988.
- Evans, et al., En: Cancer Principles and Practice of Oncology, Devita et al. (Eds.), Lippincot-Raven, NY, 1054-1087, 1997.
- Fechheimer et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8463-8467, 1987.
- Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3348-3352, 1979.
- 25 Frisan et al., Epstein-Barr Virus Protocols, Parte III, 125-127, 2001.
- Furie y Furie, Cell 53: 505-518, 1988.
- Graham y Van Der Eb, Virology, 52: 456-467, 1973.
- Publicación Internacional No. WO 2007/069666.
- Publicación Internacional No. PCT/US2016/057893.
- 30 Publicación Internacional No. PCT/US2016/057899.
- Publicación Internacional No. WO 94/09699.
- Publicación Internacional No. WO 95/06128.
- Publicación Internacional No. WO 96/39487.
- Jores et al., PNAS U.S.A. 87: 9138, 1990.
- 35 Kaeppler et al., Plant Cell Reports 9: 415-418, 1990.
- Kaneda et al., Science, 243: 375-378, 1989.
- Karin et al. Cell, 36: 371-379, 1989.
- Kato et al, J. Biol. Chem., 266: 3361-3364, 1991.
- Kim et al., J. Virol., 66: 3879-3882, 1992.
- 40 Knust et al, EMBO J. 761-766, 1987.
- Ladi et al., Nature Immunology, 7: 338 - 343, 2006.
- Langle-Rouault et al., J. Virol., 72(7): 6181-6185, 1998.
- Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27: 55, 2003.
- Levitskaya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23): 12616-12621, 1997.
- 45 Linnemann, C. et al. Nat Med 21, 81-85, 2015.
- Ludwig et al., Nat. Biotechnol., 24(2): 185-187, 2006 b.
- Ludwig et al., Nat. Methods, 3(8): 637-46, 2006 a.
- Macejak y Sarnow, Nature, 353: 90-94, 1991.
- Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- 50 Mann et al., Cell, 33: 153-159, 1983.
- Nabel et al., Science, 244(4910): 1342-1344, 1989.
- Naldini et al., Science, 272(5259): 263-267, 1996.
- Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15(9): 871-875.
- Ng, Nuc. Acid Res., 17: 601-615, 1989.
- 55 Nicola, et al., Blood, 54: 614-627, 1979.
- Nicolas y Rubenstein, En: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Lab. Press, 2001.
- Rodriguez y Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.
- Nicolau y Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721: 185-190, 1982.
- Nicolau et al., Methods Enzymol., 149: 157-176, 1987.
- 60 Notta et al., Science, 218-221, 2011.
- Paskind et al., Virology, 67: 242-248, 1975.
- Publicación de patente No. EP1507865.
- Pelletier y Sonenberg, Nature, 334(6180): 320-325, 1988.
- Potrykus et al., Mol. Gen. Genet., 199(2): 169-177, 1985.
- 65 Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 7161-7165, 1984.
- Quitsche et al., J. Biol. Chem., 264: 9539-9545, 1989.

- Remington's Pharmaceutical Sciences vigesimosegunda edición, 2012.
 Reubinoff et al., Nat. Biotechnol., 18: 399-404, 2000.
 Richards et al., Cell, 37: 263-272, 1984.
 Rippe, et al., Mol. Cell Biol., 10: 689-695, 1990.
 5 Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra Ed. Cold Spring Harbor 1997.
 Suzuki et al, EMBO J. 6: 1891-1897, 1987.
 Takahashi et al., Cell, 131: 861-872, 2007.
 Temin, En: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
 Thomson y Marshall, Curr. Top. Dev. Biol., 38: 133-165, 1998.
 10 Thomson y Odorico, J. Trends. Biotechnol., 18: 53-57, 2000.
 Thomson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 7844-7848, 1995.
 Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6: 716-718, 1986.
 Solicitud de patente de los Estados Unidos No. 08/464.599 (consúltase la patente de Estados Unidos No. 5.908.782)
 Solicitud de patente de los Estados Unidos No. 12/715.136 (consúltase la patente de Estados Unidos No. 8.372.642)
 15 Solicitud de patente de los Estados Unidos No. 61/088.054
 Patente de los Estados Unidos No. 4.683.202
 Patente de los Estados Unidos No. 5.030.015
 Patente de los Estados Unidos No. 5.302.523
 Patente de los Estados Unidos No. 5.322.783
 20 Patente de los Estados Unidos No. 5.384.253
 Patente de los Estados Unidos No. 5.464.765
 Patente de los Estados Unidos No. 5.486.359
 Patente de los Estados Unidos No. 5.538.877
 Patente de los Estados Unidos No. 5.538.880
 25 Patente de los Estados Unidos No. 5.550.318
 Patente de los Estados Unidos No. 5.556.954
 Patente de los Estados Unidos No. 5.563.055
 Patente de los Estados Unidos No. 5.580.859
 Patente de los Estados Unidos No. 5.589.466
 30 Patente de los Estados Unidos No. 5.591.616
 Patente de los Estados Unidos No. 5.610.042
 Patente de los Estados Unidos No. 5.656.610
 Patente de los Estados Unidos No. 5.702.932
 Patente de los Estados Unidos No. 5.736.524
 35 Patente de los Estados Unidos No. 5.780.448
 Patente de los Estados Unidos No. 5.789.215
 Patente de los Estados Unidos No. 5.843.780
 Patente de los Estados Unidos No. 5.843.780
 Patente de los Estados Unidos No. 5.928.906
 40 Patente de los Estados Unidos No. 5.945.100
 Patente de los Estados Unidos No. 5.981.274
 Patente de los Estados Unidos No. 5.994.136
 Patente de los Estados Unidos No. 5.994.624
 Patente de los Estados Unidos No. 6.013.516
 45 Patente de los Estados Unidos No. 6.200.806
 Patente de los Estados Unidos No. 6.225.042
 Patente de los Estados Unidos No. 6.355.479
 Patente de los Estados Unidos No. 6.362.001
 Patente de los Estados Unidos No. 6.544.518
 50 Patente de los Estados Unidos No. 6.790.662
 Patente de los Estados Unidos No. 7.029.913
 Patente de los Estados Unidos No. 8.058.065
 Patente de los Estados Unidos No. 8.129.187
 Patente de los Estados Unidos No. 8.268.620
 55 Patente de los Estados Unidos No. 8.268.620
 Patente de los Estados Unidos No. 8.372.642
 Patente de los Estados Unidos No. 8.741.648
 Publicación de la patente de los Estados Unidos No. 20020055144
 Publicación de la patente de los Estados Unidos No. 20050260186
 60 Publicación de la patente de los Estados Unidos No. 20060104968
 Publicación de la patente de los Estados Unidos No. 20090148425
 Publicación de la patente de los Estados Unidos No. 20090246875
 Publicación de la patente de los Estados Unidos No. 2010/0210014
 Publicación de la patente de los Estados Unidos No. 20120276636
 65 Publicación de la patente de los Estados Unidos No. 2014/0315304
 Publicación de la patente de los Estados Unidos No. 20160257939

- Wilson et al., Nature Reviews Immunology, 9: 91-105, 2009.
Wilson et al., Science, 244: 1344-1346, 1989.
Wong et al., Gene, 10: 87-94, 1980.
Wynn, Nature Immunology, 6: 1069 - 1070, 2005.
5 Xu et al., Nat. Biotechnol., 19: 971-974, 2001.
Yamanaka et al., Cell, 131(5): 861-72, 2007.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno que comprende:

- (a) modificar células madre pluripotentes (PSC) para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), produciendo así CAR-PSC;
 (b) diferenciar las CAR-PSC en células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ (HPC);
 (c) diferenciar adicionalmente las HPC CD34⁺ en células T y/o células NK; y
 (d) expandir las células T y/o las células NK, en el que la expansión comprende el cocultivo con células diana específicas de antígeno, produciendo así células T y/o células NK efectoras específicas de antígeno,

en el que la etapa (b) comprende realizar una diferenciación dirigida que comprende

- (ba) generar cuerpos embrioides (EB) en presencia de blebistatina, un inhibidor de GSK-3, FGF2 y VEGF;
 (bb) poner en contacto los EB con BMP-4, VEGF y FGF2 para inducir la inducción del mesodermo; y
 (bc) diferenciar los EB en presencia del ligando de Flt-3, IL3, SCF y TPO, produciendo así HPC.

2. El método de la reivindicación 1, en el que las PSC de la etapa (a) son células madre pluripotentes inducidas (iPSC) o células madre embrionarias (ESC), preferiblemente en el que las iPSC se reprograman a partir de células T.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la diferenciación de la etapa (bc) está esencialmente libre de BMP4, preferiblemente en el que la diferenciación de la etapa (bc) está libre de BMP4; o en el que la diferenciación de la etapa (bc) comprende además la presencia de IL-11, cAMP y/o VEGF, preferiblemente en el que la diferenciación de la etapa (bc) comprende además la presencia de IL-11, cAMP y VEGF.

4. El método de la reivindicación 1, en el que el inhibidor de GSK-3 es CHIR99021.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que las PSC no tienen transgén, preferiblemente en el que las PSC son humanas.

6. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las células T son células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T citotóxicas, células T reguladoras, células T asesinas naturales, células T no modificadas, células T de memoria, o células T gamma delta.

7. El método de la reivindicación 1, en el que las PSC de la etapa (a) se modifican adicionalmente para expresar ERG/ETV2, GATA2 y HOXA9 bajo el control de un solo promotor inducible, que comprende preferiblemente además la modificación de las PSC para expresar HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 y HOXA4.

8. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende cultivar las células bajo condiciones definidas sin alimentador.

9. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende además la selección de células que expresan CD34 y CD43 antes de diferenciarse en células T específicas de antígeno y/o células NK,

preferiblemente en el que la selección comprende realizar la clasificación de células activadas magnéticamente (MACS); o

preferiblemente en el que las células que expresan CD34 y CD43 comprenden al menos el 35 por ciento de la población total de células; o

preferiblemente en el que las células que expresan CD34 y CD43 comprenden al menos el 65 por ciento de la población total de células.

10. El método de la reivindicación 1, en el que al menos 5 por ciento de las HPC expresan el CAR; o

en el que al menos 10 por ciento de las HPC expresan el CAR; o
 en el que al menos 15 por ciento de las HPC expresan el CAR.

11. El método de la reivindicación 1, en el que la diferenciación de la etapa (c) comprende cultivar las HPC en una superficie recubierta de retronectina y Notch DLL-4 en presencia de ácido ascórbico y nicotinamida bajo condiciones hipóxicas,

preferiblemente en el que el cultivo comprende además SCF, ligando de FLT-3, TPO e IL7, más preferiblemente en el que el cultivo comprende además un inhibidor de GSK-3, IL-2 y/o IL-12; o más preferiblemente en el que el cultivo comprende además un inhibidor de GSK-3, IL-2 e IL-12; o

preferiblemente en el que al menos 1,5 por ciento de las HPC CD34⁺ diferenciadas son células T CD3⁺CAR⁺; o
 preferiblemente en el que al menos 2 por ciento de las HPC CD34⁺ diferenciadas son células NK CD3⁺CAR⁺; o

preferiblemente en el que al menos 10 por ciento de las HPC CD34⁺ expandidas son células NK CD3⁺CAR⁺.

12. El método de la reivindicación 1, en el que la expansión de la etapa (d) comprende además el cultivo de células T específicas de antígeno en presencia de anticuerpo anti-CD3, IL-2 e IL-15, preferiblemente en el que al menos el 2 por ciento de las HPC CD34⁺ expandidas son células T CD3⁺CAR⁺; o

en el que la expansión de la etapa (d) comprende además el cultivo de células T específicas de antígeno en presencia de anticuerpo anti-CD3, IL-2, IL-15 e IL-21; o

en el que la expansión de la etapa (d) comprende además cultivar las células T específicas de antígeno en presencia de anticuerpo anti-CD3, ligando de FLT3, IL-7, IL-2, IL-15 y/o IL-21; o

en el que la expansión de la etapa (d) comprende además uno o dos componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en SCF y TPO.

13. El método de la reivindicación 1, en el que el CAR y las células diana específicas de antígeno se dirigen al mismo antígeno, preferiblemente en el que el antígeno es CD19; o

en el que las células diana específicas de antígeno son células tumorales; o

en el que las células diana específicas de antígeno son humanas;

preferiblemente en el que las células diana específicas de antígeno son negativas para HLA clase I, más preferiblemente en el que al menos el 5 por ciento de las células T efectoras específicas de antígeno muestran actividad citotóxica contra las células diana o en el que al menos 40 por ciento de las células NK efectoras específicas de antígeno muestran actividad citotóxica contra las células diana.

14. El método de la reivindicación 1, en el que el CAR está codificado por ADN integrado en el genoma de las PSC; o

en el que el CAR comprende un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno, preferiblemente en el que los dominios de señalización intracelular comprenden CD3 ζ y CD28 o en el que la región de unión a antígeno es un F(ab')₂, Fab', Fab, Fv o scFv.

15. El método de la reivindicación 1, en el que las PSC son homocigotas para HLA,

preferiblemente en el que las PSC homocigotas para HLA son homocigotas para uno o más de los alelos de loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP o HLA-DQ; o

preferiblemente en el que las PSC homocigotas para HLA son homocigotas para dos de los alelos de loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP o HLA-DQ, más preferiblemente en el que las PSC homocigotas para HLA son homocigotas para HLA-A y HLA-B; o

preferiblemente en el que las PSC homocigotas para HLA son homocigotas para HLA-A, HLA-B y HLA-C.

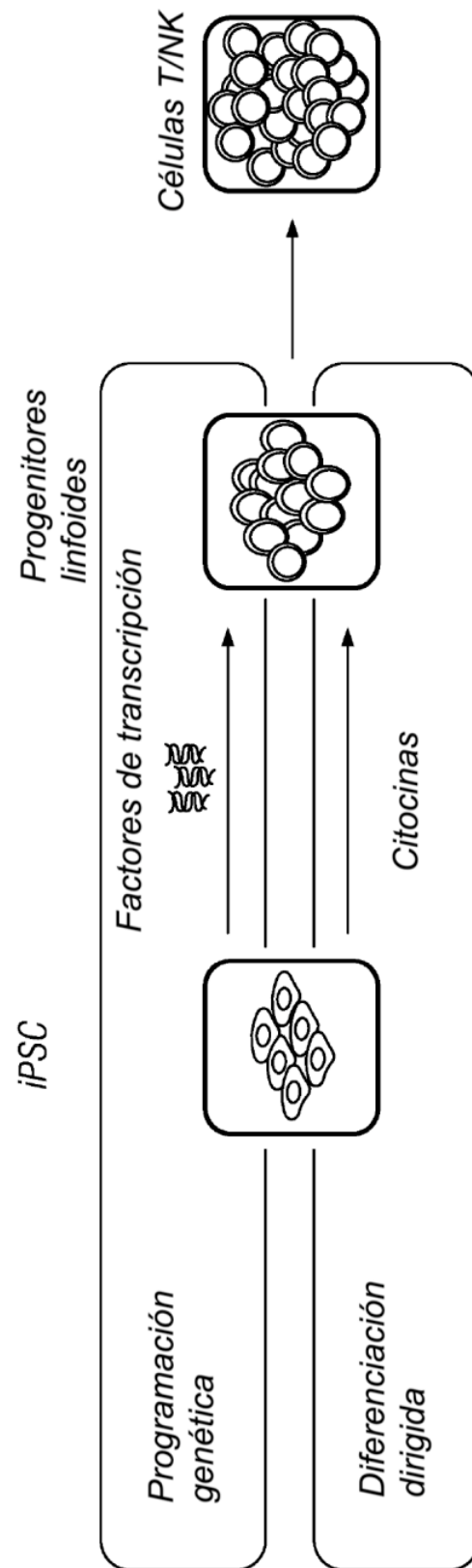


FIG. 1A

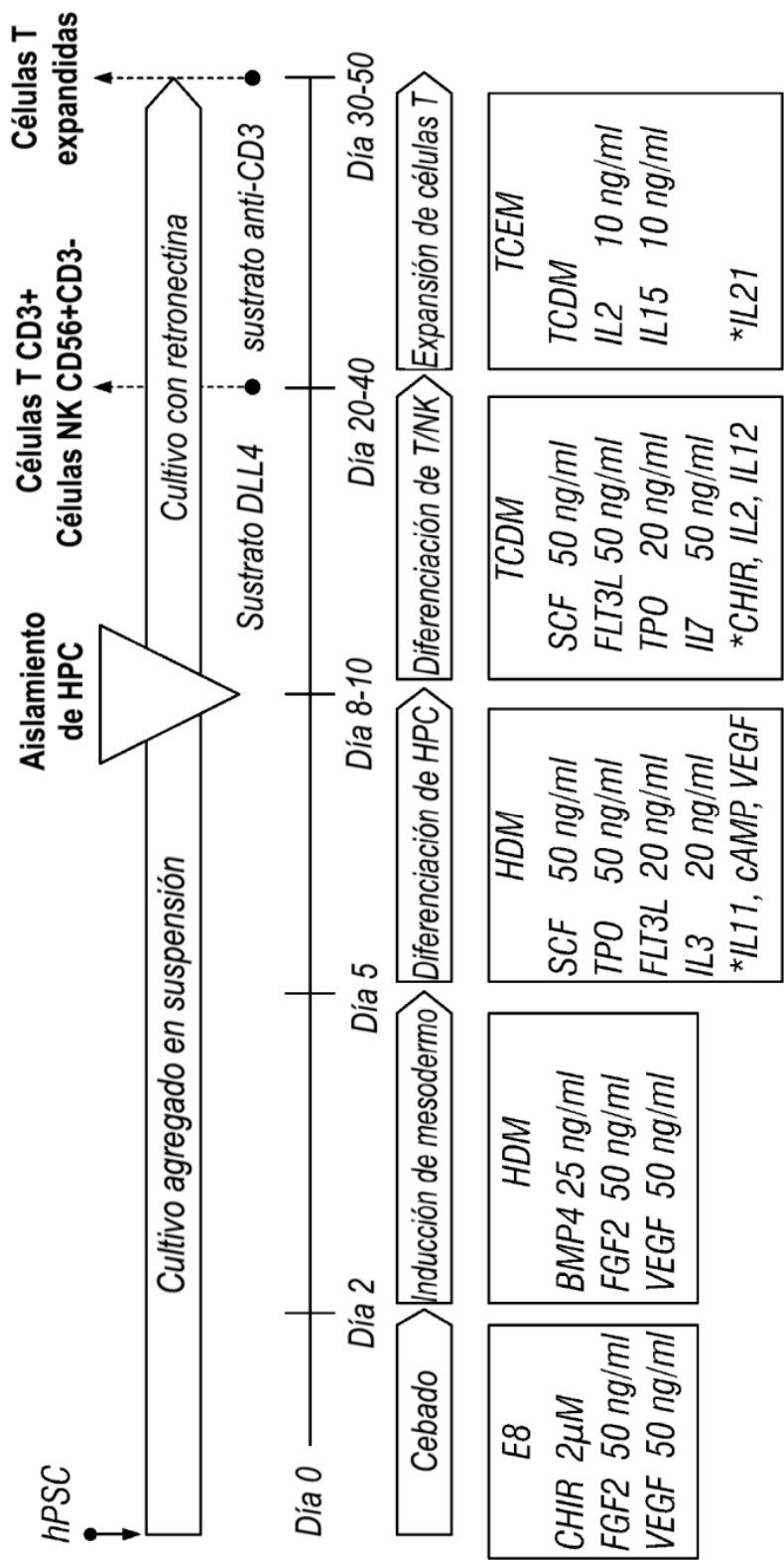


FIG. 1B

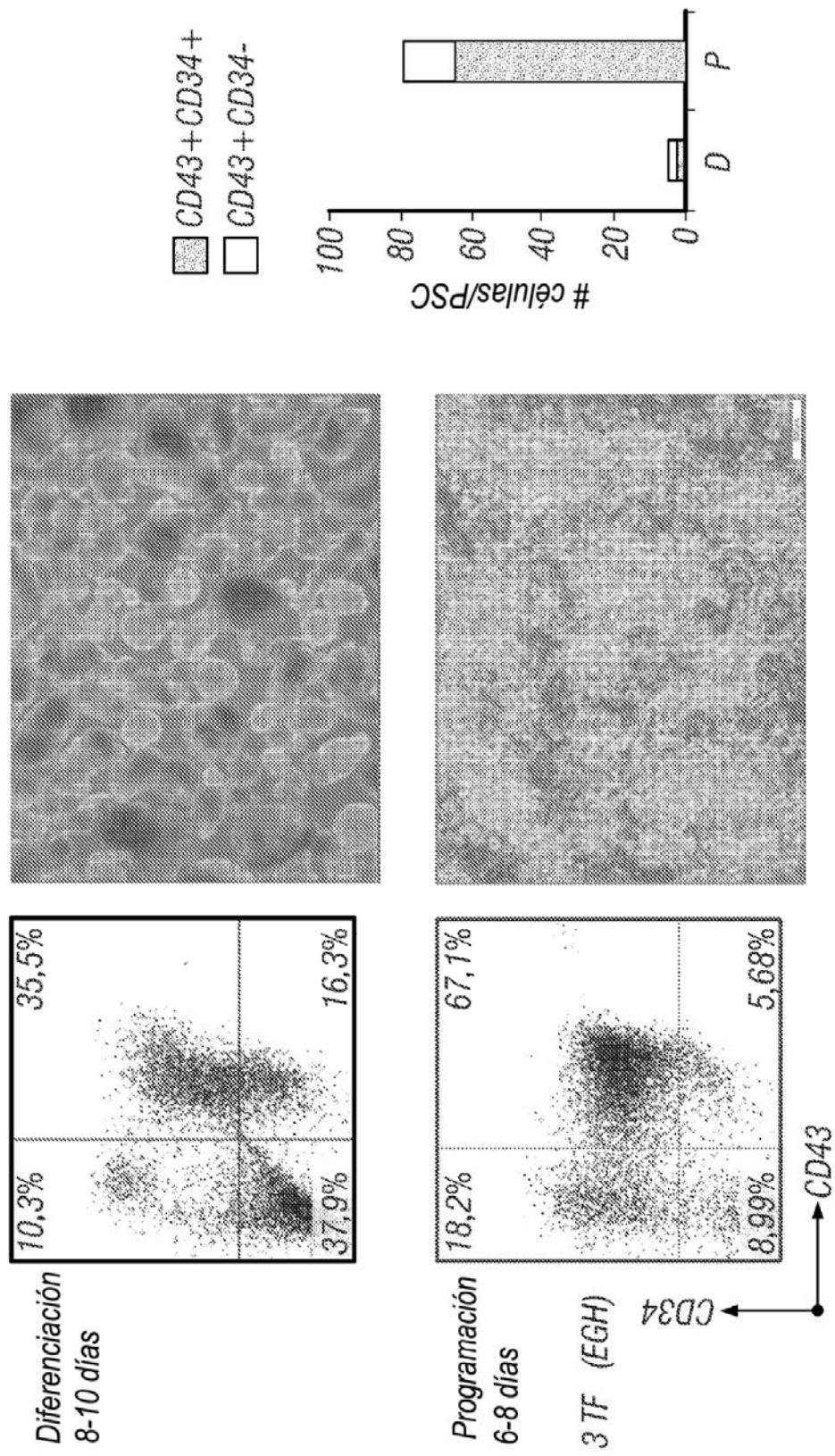


FIG. 1C

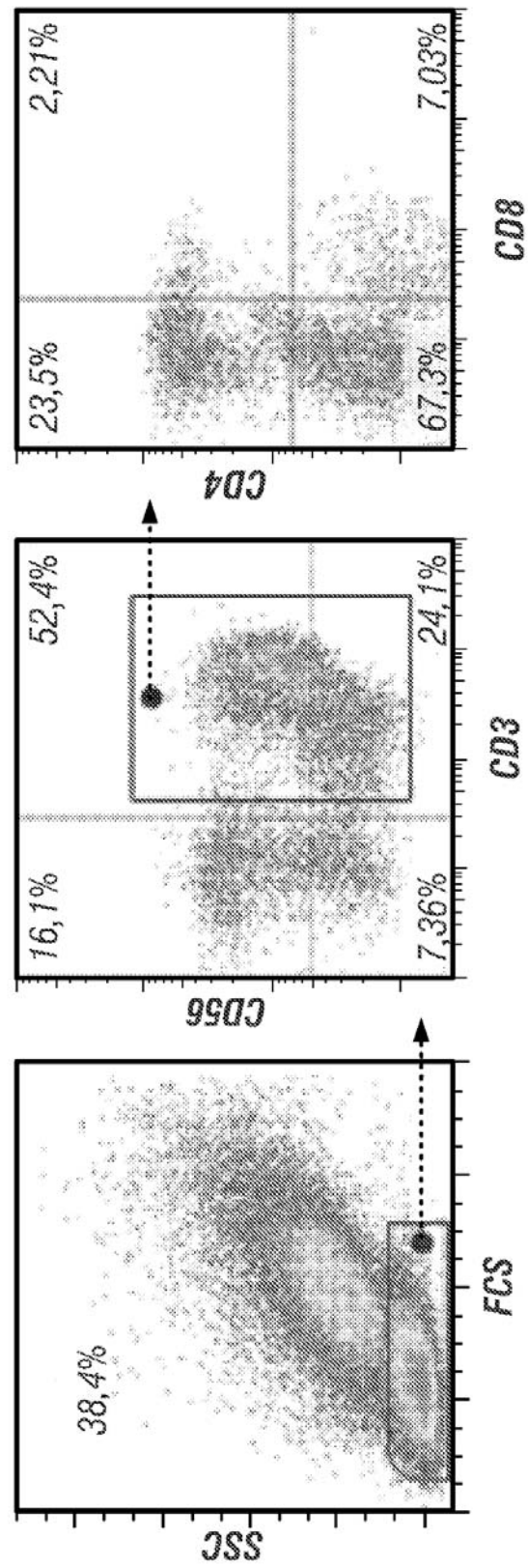


FIG. 1D

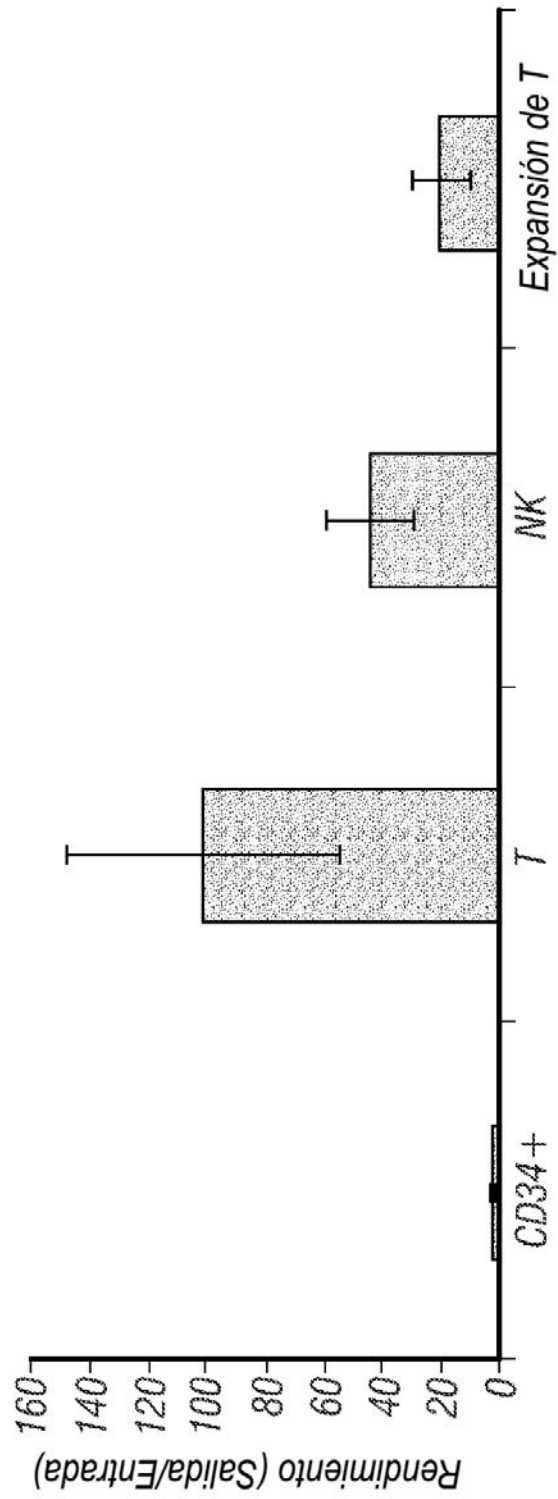


FIG. 1E

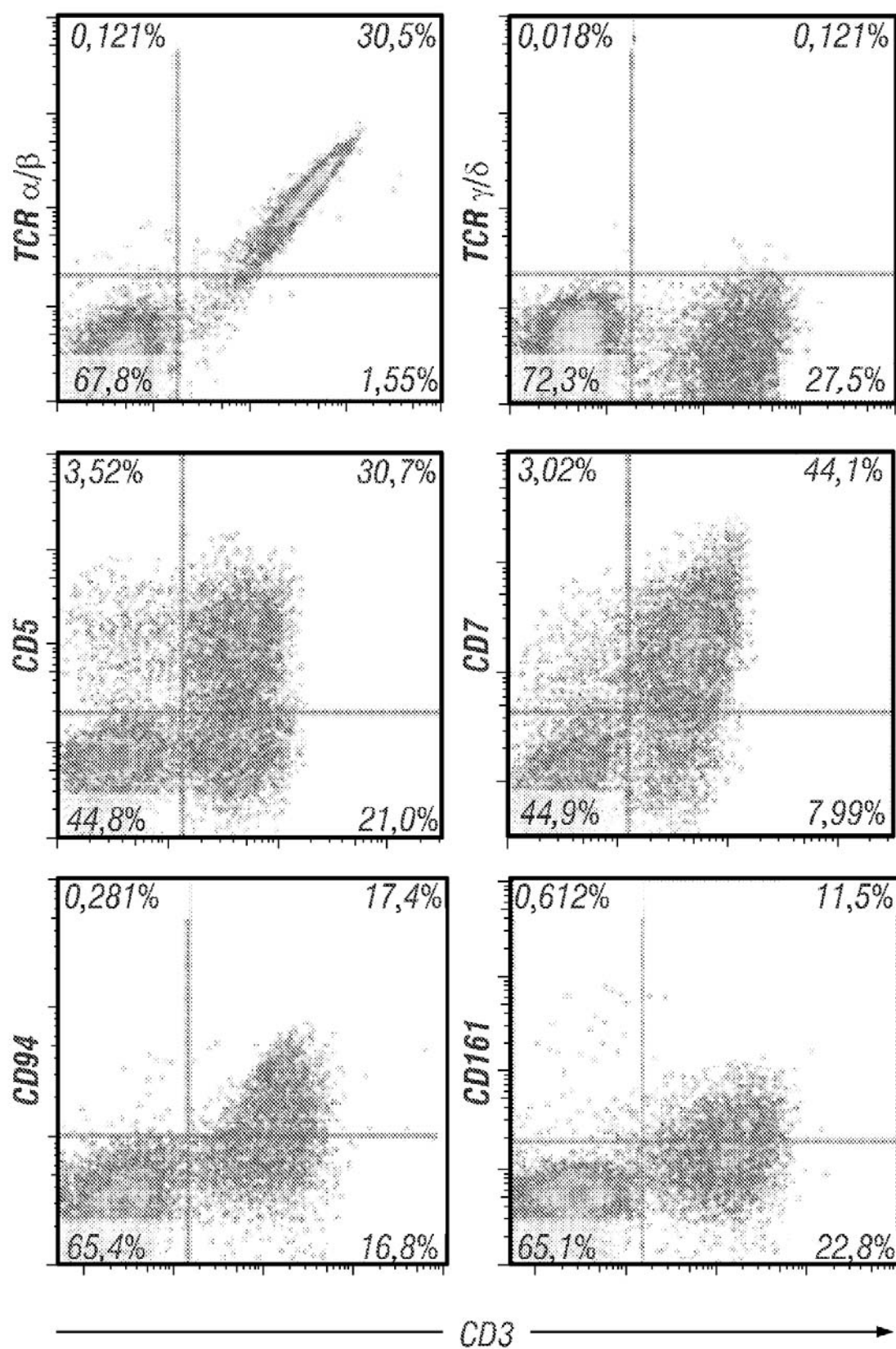


FIG. 1F

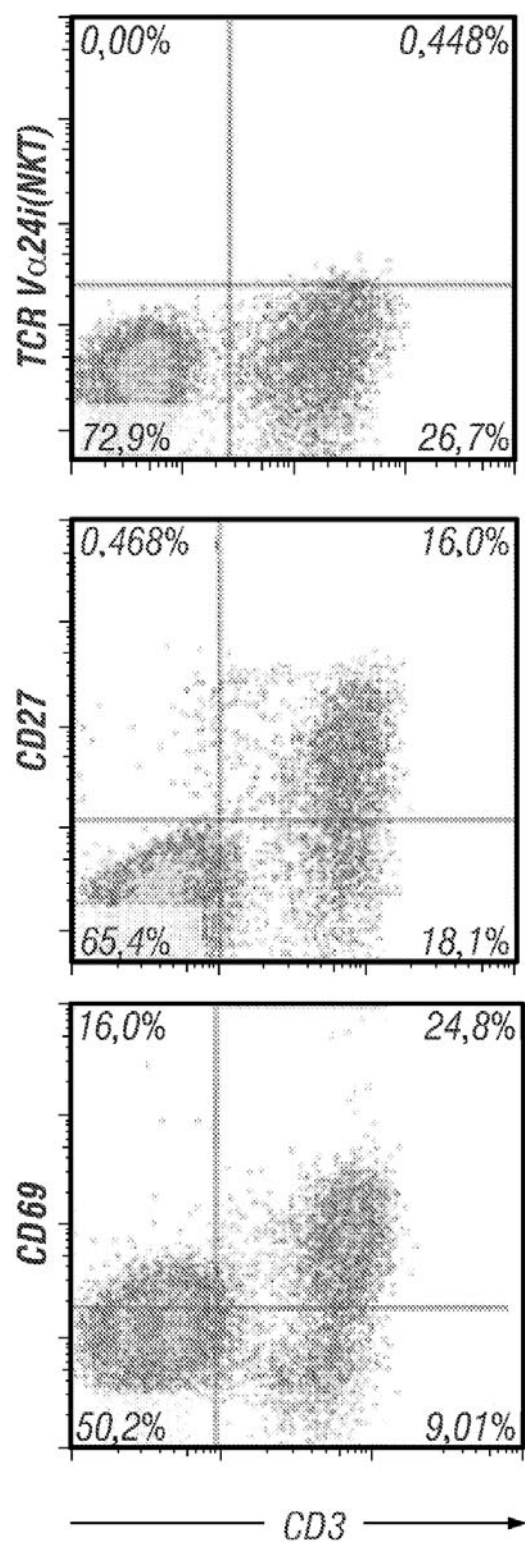


FIG. 1F
(Continuación)

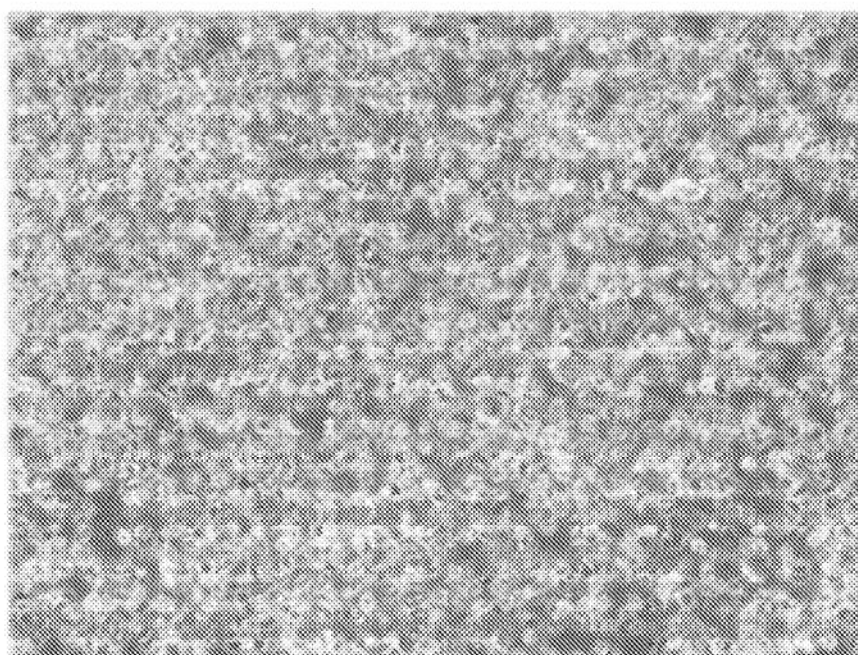
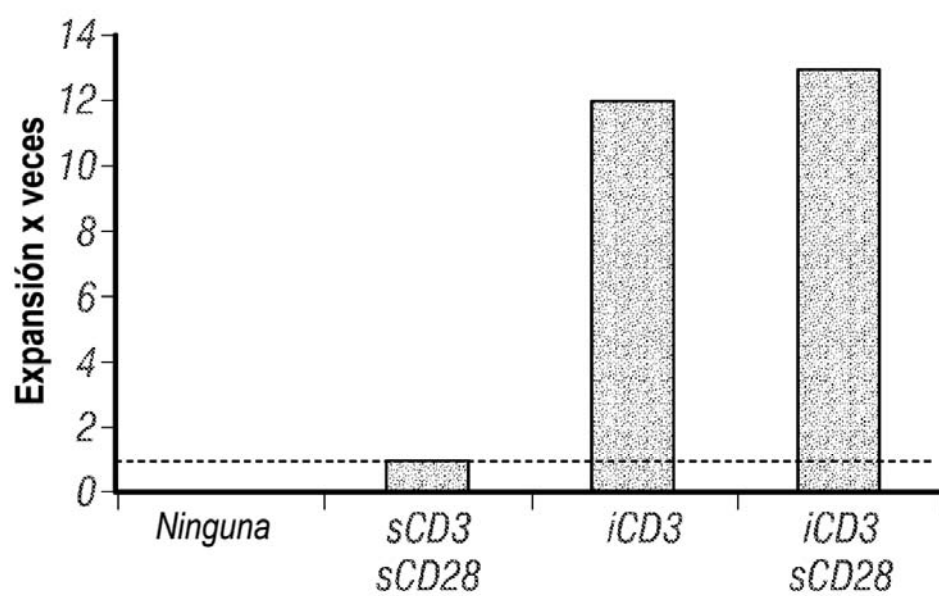


FIG. 1G

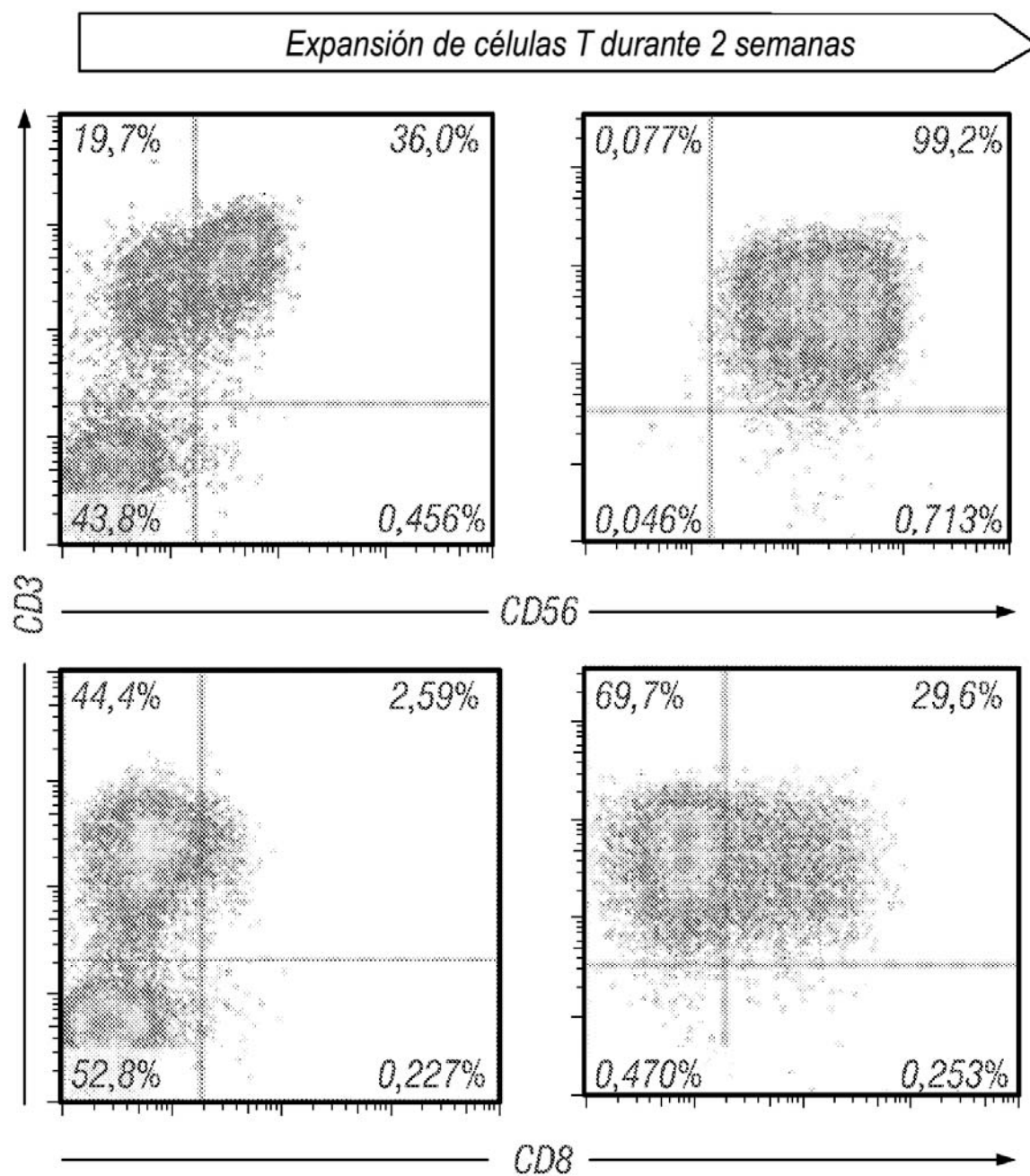


FIG. 1G
(Continuación)

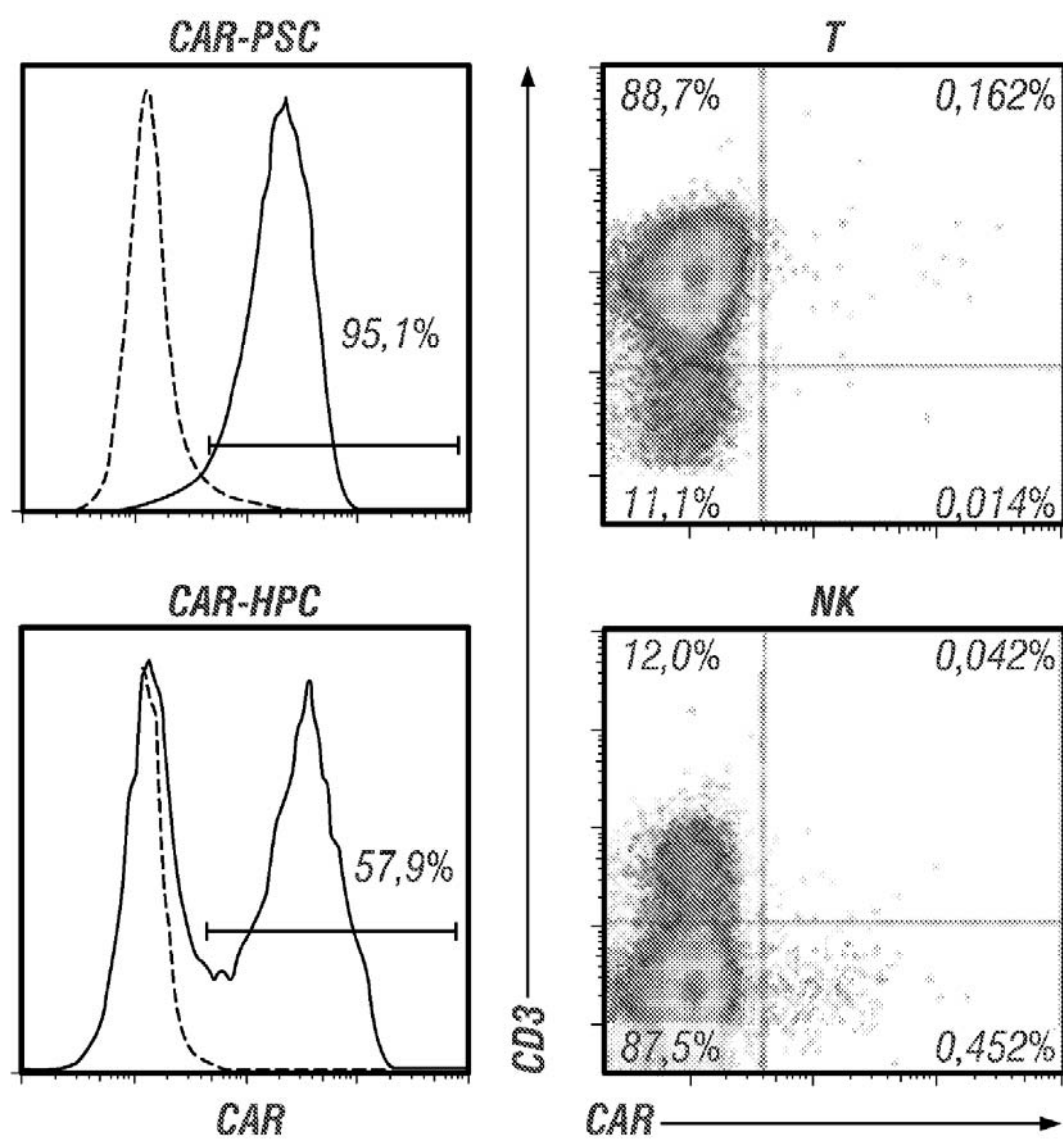


FIG. 2

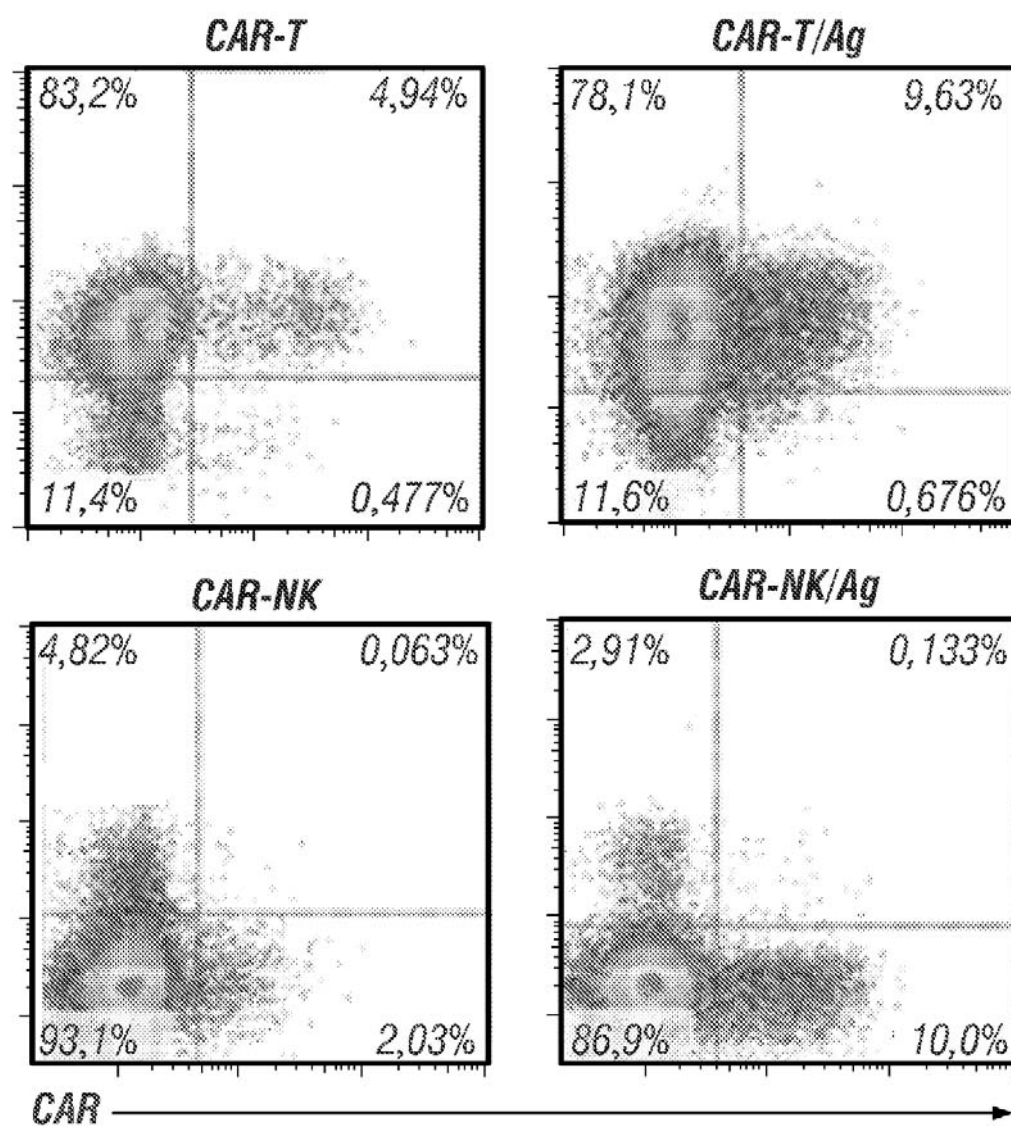


FIG. 2
(Continuación)

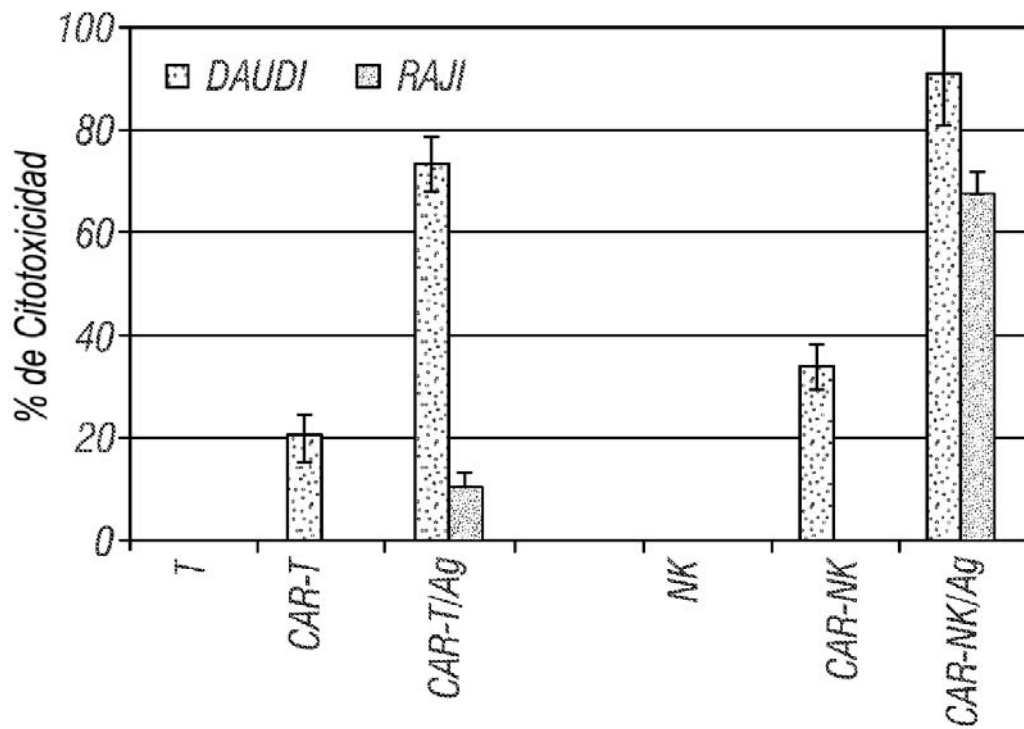


FIG. 3A

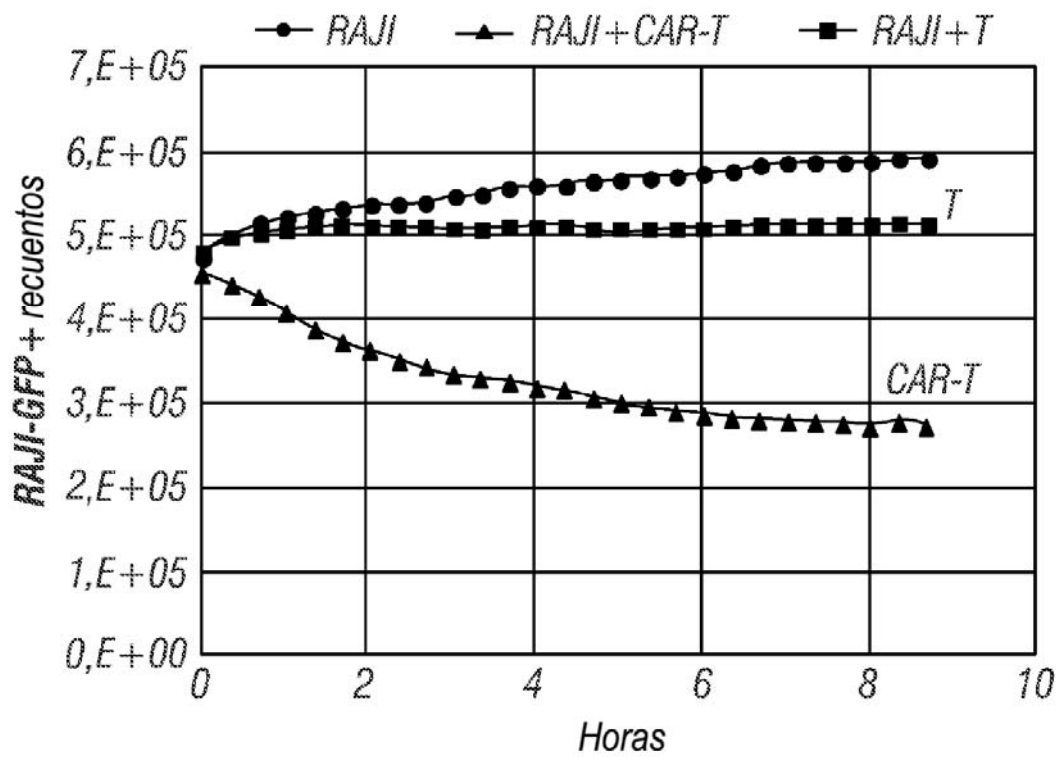


FIG. 3B

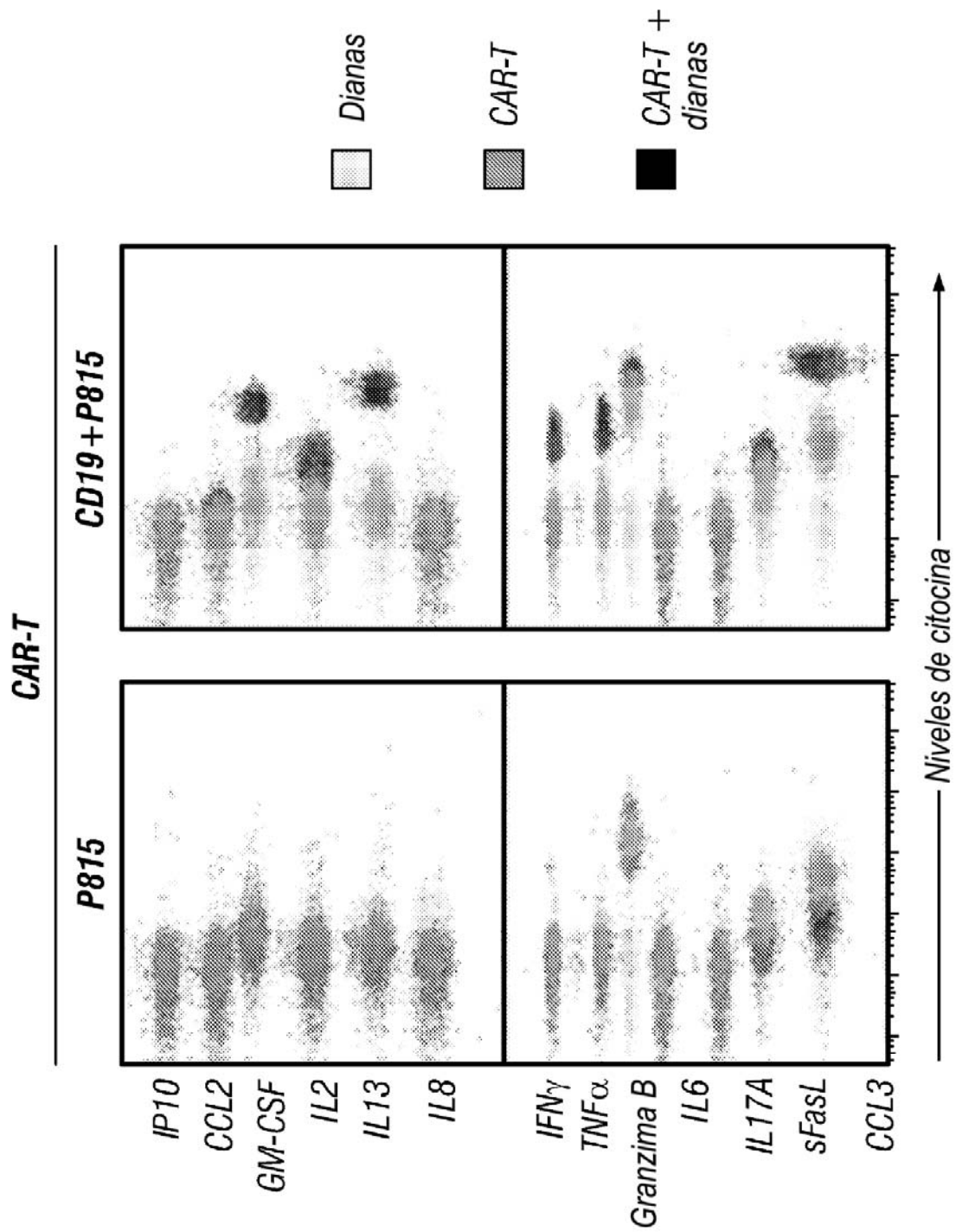


FIG. 4

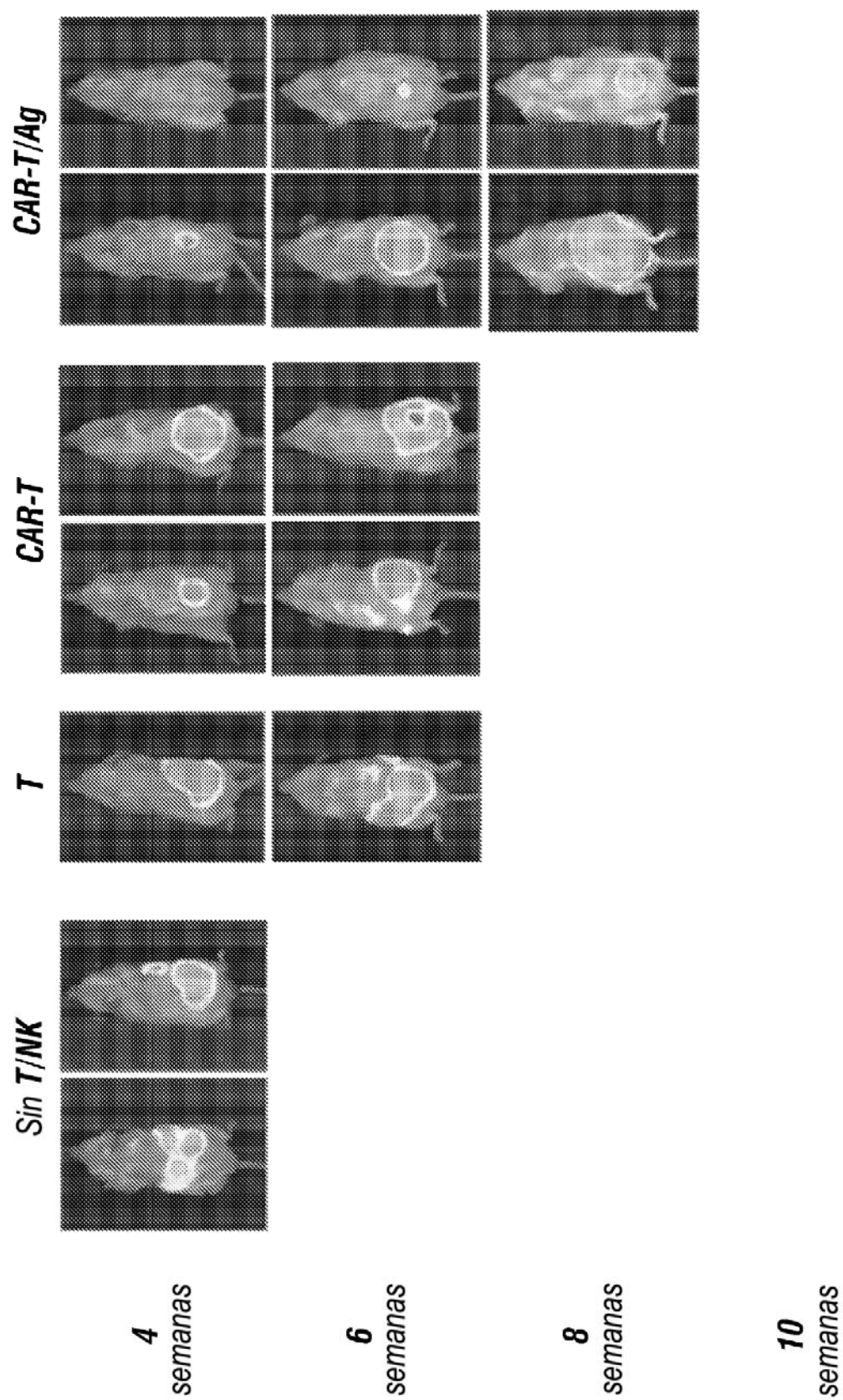


FIG. 5A

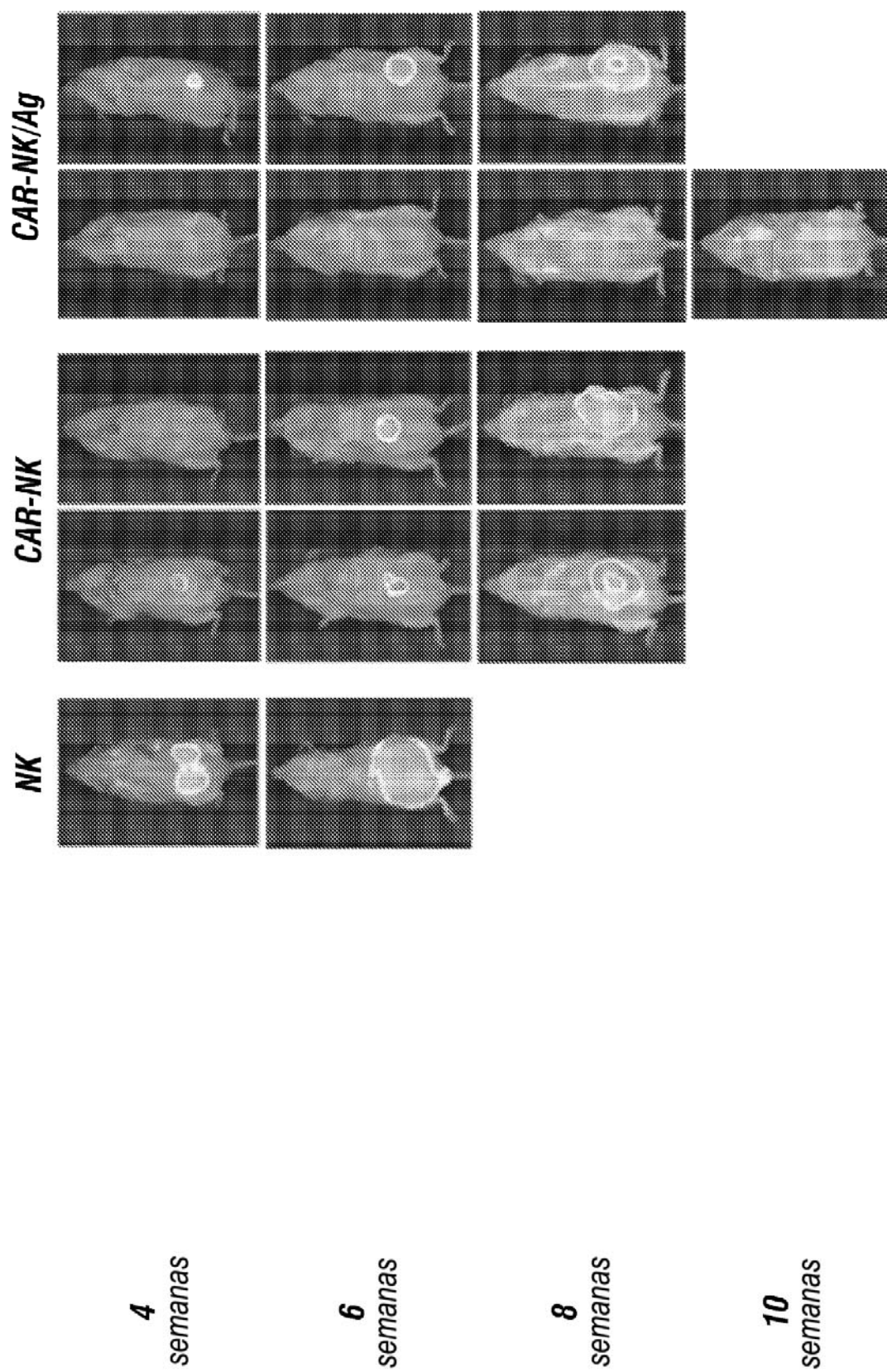


FIG. 5A
(Continuación)

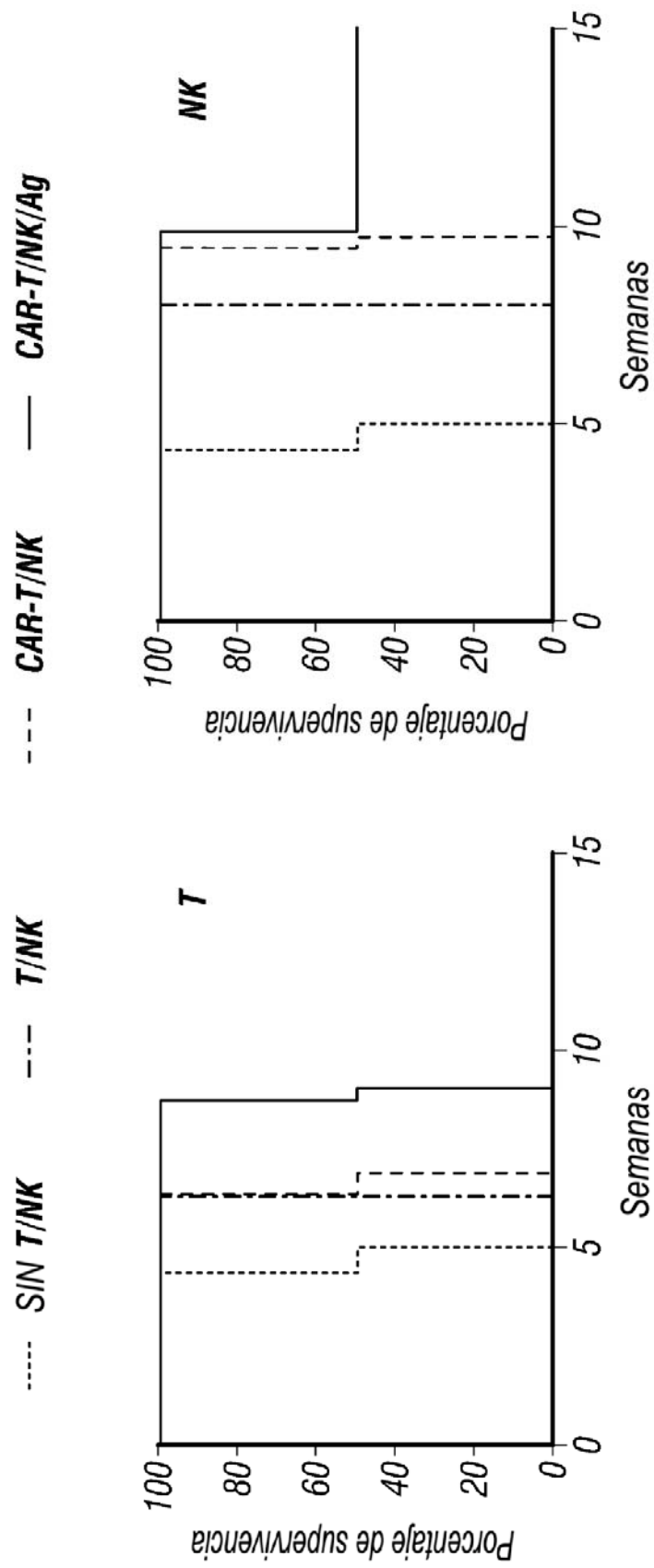


FIG. 5B