

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 931 530**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/17 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2018** **PCT/EP2018/053406**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2018** **WO18146297**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2018** **E 18704551 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2022** **EP 3580330**

54 Título: **Método para generar progenitores de células T**

30 Prioridad:

13.02.2017 EP 17305161

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

30.12.2022

73 Titular/es:

ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
(25.0%)

3 avenue Victoria

75004 Paris, FR;

FONDATION IMAGINE - INSTITUT DES
MALADIES GÉNÉTIQUES (25.0%);

UNIVERSITÉ PARIS CITÉ (25.0%) y

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%)

72 Inventor/es:

ANDRE, ISABELLE;

CAVAZZANA, MARINA;

MA, KUIYING;

TCHEN, JOHN;

SOHEILI, TAYEBEH-SHABI y

DEVI MOIRANGTHEM, RANJITA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 931 530 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

Método para generar progenitores de células T

5 La invención se relaciona con el campo de la terapia celular, en particular del injerto de células madre hematopoyéticas, transformadas o no, y más particularmente de la reconstitución inmune después de dicho injerto.

10 El injerto de células progenitoras y madre hematopoyéticas/progenitoras (HSPC) se considera la mejor opción terapéutica para las inmunodeficiencias hereditarias más graves, para muchas hemopatías malignas, así como también para una serie de tumores sólidos.

15 Actualmente, en situaciones de aloinjerto con incompatibilidad HLA parcial, las inyecciones, a receptores previamente condicionados, de dosis crecientes de HSPC CD34+ seleccionadas permiten el trasplante de donante con una prevención efectiva de la enfermedad de injerto contra huésped (GVH). No obstante, la diferenciación de nuevos linfocitos T a partir de las células CD34+ inyectadas requiere un período mínimo de 4 meses y estos linfocitos T están en número suficiente para desempeñar un papel protector frente a las infecciones sólo unos meses después de su aparición.

20 Esta lentitud en la reconstitución inmune conduce a numerosas complicaciones infecciosas, especialmente virales, pero también a recaídas, que influyen en el pronóstico a largo plazo de los pacientes injertados.

25 Además, otros protocolos terapéuticos usan un enfoque de terapia génica, específicamente un autoinjerto de HSPC transducida, que ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de determinadas inmunodeficiencias hereditarias. La ventaja de esta estrategia sobre el alotrasplante de HSPC CD34+ es indiscutible en términos de supervivencia y morbilidad cuando no se dispone de un donante compatible con HLA. No obstante, la experiencia clínica ha demostrado que, para algunos pacientes con infecciones graves, la reconstitución del compartimiento de linfocitos T es lenta y nunca alcanza niveles normales de linfocitos T circulantes. La morbilidad y la mortalidad asociadas a este contexto particular son importantes.

30 Debido a la alta morbilidad asociada a este tipo de trasplante, el desarrollo de nuevas terapias para reducir el periodo de inmunodeficiencia tras el trasplante está plenamente justificado.

35 En particular, es importante acelerar la generación de linfocitos T mediante la administración de precursores ya involucrados en la ruta de diferenciación de linfocitos T (progenitores de células T).

40 Estos precursores de células T se obtienen a partir de la diferenciación de HSPC CD34+ y tienen en particular el marcador CD7+, que es un marcador de diferenciación en la vía de las células T. También pueden tener otros marcadores. Awong y otros, (Blood 2009; 114: 972-982 y Blood 2013; 122(26):4210-9) describieron los siguientes precursores de linfocitos T: progenitores tímicos tempranos (ETP), que tienen marcadores (CD34+ / CD45RA+ / CD7+), células precursoras en estadio proT1 (CD7++ / CD5-), células precursoras en estadio proT2 (CD7++ / CD5+), y células en la etapa preT (CD7++ / CD5+ CD1a+). Las HSPC adquieren estos marcadores de forma sucesiva al pasar de una etapa a otra, a lo largo de la vía de desarrollo de las células T. Se sabe además que, en humanos, el antígeno CD1a distingue el paso de un progenitor tímico muy inmaduro a un progenitor claramente involucrado en la vía T (Cavazzana-Calvo y otros, MEDECINE/SCIENCES 2006; 22: 151-9).

45 Un trasplante de precursores de células T, concomitante con el injerto de HSPC, permitiría la producción rápida de un compartimiento de linfocitos T maduros y funcionales y, por lo tanto, ayudaría a prevenir el riesgo de infecciones graves al permitir que el paciente se beneficie de cierta inmunidad antes de la reconstitución completa del sistema inmunitario.

50 Además, es importante poder usar células adultas en lugar de células de sangre de cordón umbilical, ya que es más fácil y económico obtener células adultas que células de sangre de cordón umbilical y dado que las células adultas se usan más comúnmente en aloinjertos.

55 Sin embargo, los datos publicados en la literatura, obtenidos en humanos y ratones, muestran diferencias intrínsecas entre las células hematopoyéticas fetales (incluida la sangre del cordón umbilical) y las células adultas. Estas diferencias se relacionan con la supervivencia, la capacidad de reparar el daño del ADN, la capacidad proliferativa y el potencial de diferenciación (ver, por ejemplo, Yuan y otros, (9 de marzo de 2012; 335 (6073): 1195-200), que indican que las células de la médula ósea adulta son menos efectivas que las células fetales en su potencial para generar una variedad de tipos de células: Lansdorp y otros, (J Exp Med 1 de septiembre de 1993; 178 (3): 787-91); Szilvassy y otros, (Blood, 1 de octubre de 2001, 98 (7): 2108-15), Frassoni y otros, (Blood, 1 de agosto de 2003, 102 (3): 1138-41), Liang y otros, 106 (4): 1479-87), Six y otros, (J Exp Med 2007 24 de diciembre, 204 (13): 3085-93)).

65 Reimann y otros, (Stem cells 2012; 30:1771-1780) describe que los progenitores de linfoides T humanos pueden generarse en un sistema de cultivo similar a delta-4 libre de células alimentadoras. Además, el documento WO 2016/055396 describe que es posible generar precursores de células T al cultivar células CD34+ en presencia

de un ligando inmovilizado de Notch (en particular, el dominio soluble del ligando similar a Delta, fusionado a una región Fc de una proteína IgG), y de un fragmento de una fibronectina, que contiene los dominios RGDS (SEQ ID NO: 3, Arginina - Glicina - Aspartato - Serina) y CS-1, así como también el dominio de unión a heparina (en particular en presencia de retronectina®). El ligando de Notch usado puede denominarse DL-4/Fc.

Cabe señalar que este documento describe que la presencia tanto del ligando inmovilizado de Notch como de la fibronectina permite aumentar la generación de progenitores de linfocitos T (células CD7+), lo que ya era una mejora en la técnica, pero que el porcentaje de células CD7+CD34- sigue siendo bastante bajo, como se muestra en la figura 3 del documento WO 2016/055396. Sin embargo, es interesante y particularmente importante aumentar este porcentaje, para poder administrar una mayor cantidad de precursor al paciente que lo necesite. Por otro lado, también es importante que las células permanezcan en una etapa temprana de diferenciación para poder proporcionar una inmunidad adecuada.

Se recuerda que las proteínas Notch son receptores transmembrana que regulan la respuesta celular a un gran número de señales ambientales. En mamíferos, se han descrito cuatro receptores Notch (Notch 1-4) y cinco ligandos (similar a delta-1, 3 y 4, Jagged1, Jagged2) (Weinmaster Curr Opinión Genet Dev 2000: 10: 363-369).

El ligando similar a delta 4 se puede designar como:

- (ii) ligando similar a delta-4 (correspondiente al nombre del gen DLL4)
- (iii) similar a delta-4 o ligando delta 4 (abreviatura DL-4).

En la presente solicitud, los ligandos Notch similar a delta-1 y similar a delta-4 pueden designarse respectivamente por DL1 y DL4 o por DL-1 y DL-4. Las secuencias de los ligandos DL-1 y DL-4 se especifican como SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente.

Ohishi y otros, (BLOOD, vol. 98, núm. 5, 2001, páginas 1402-1407) se relaciona con el efecto de la señalización de Notch en la diferenciación de monocitos en macrófagos y células dendríticas. Las células de monocitos usadas en los experimentos descritos en este documento fueron monocitos de sangre periférica purificados por selección negativa o monocitos obtenidos después de la diferenciación *in vitro* de las células madre CD34+. Las células usadas en este documento han entrado así en la ruta de diferenciación de monocitos/macrófagos/células dendríticas, han perdido el marcador CD34 (que es un marcador de células madre hematopoyéticas) y presentan el marcador CD14. Estas células se cultivan en presencia del dominio extracelular de delta-1 y GM-CSF, TNF-alfa (que se usa para inducir la diferenciación de células CD1a-CD14+ derivadas de células CD34+ en células dendríticas). Este documento no usa células CD34+ en presencia de un ligando de Notch y de TNF-alfa y no pertenece a la generación de precursores de células T (precursores de linfocitos T CD7+).

Shukla y otros, (NATURE METHODS, vol. 14, núm. 5, 2017, 531-538) y el documento WO 2017/173551 describen un método para generar células T progenitoras a partir de células madre y/o progenitoras que comprende exponer las células madre y/o progenitoras al ligando de Notch similar a delta-4 (DL4) y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1). Además, el documento US 2014/0369973 describe métodos para la expansión de células madre/progenitoras hematopoyéticas CD34+ en un medio de cultivo que comprende un agonista de Notch y un antagonista del receptor de hidrocarburo de arilo.

El método descrito en la presente solicitud permite la generación y el aumento (proliferación) del número de precursores de linfocitos T CD7+, a partir de células madre CD34+, sin usar un estroma celular (lo que no se puede prever fácilmente en un contexto clínico). Además, el método se adapta particularmente cuando se realiza con células CD34+ emitidas por donantes adultos.

Además, las células obtenidas a través del proceso descrito en la presente descripción albergan el marcador Bcl11b, que es un factor transcripcional importante que se activa únicamente durante el compromiso de las células T (Kueh y otros, 2016, Nat Immunol. 2016 agosto; 17 (8): 956-65. doi: 10.1038/ni.3514).

Los inventores también han demostrado una ausencia de reordenamiento de los *loci* de los receptores de células T (ya sea TCRbeta, TCRgamma o TCRdelta) en los progenitores obtenidos a través del proceso descrito en la presente descripción.

Además, se mostró una disminución en los marcadores de apoptosis, para los precursores obtenidos en la presente descripción, en comparación con el proceso descrito en el documento WO 2016/055396.

La invención se refiere a un método *in vitro* para generar progenitores de células T que tienen el fenotipo CD7+CD34-, que comprende la etapa de cultivar células CD34+ en un medio que comprende TNF-alfa y, opcionalmente, un antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en particular StemRegenin 1 (SR1), en la presencia de un ligando de Notch inmovilizado. En una modalidad, el ligando de Notch se inmoviliza en la superficie interna de un recipiente de cultivo o en la superficie de las perlas presentes en el medio de cultivo.

En una modalidad, el TNF-alfa está presente, en el medio de cultivo, desde el día 0 del cultivo, preferentemente a una concentración mayor o igual a 3 ng/ml, y opcionalmente en donde está presente el antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en el medio de cultivo, desde el día 0 de cultivo, preferentemente a una concentración mayor o igual a 10 ng/ml.

En una modalidad, las células CD34+ se han aislado de un donante adulto.

En una modalidad, las células se cultivan en presencia de TNF-alfa y opcionalmente SR1 durante a lo máximo 10 días, preferentemente entre 3 y 7 días.

En una modalidad, el ligando de Notch es la proteína similar a delta-4.

En una modalidad, el ligando de Notch es el dominio soluble del ligando similar a delta-4, fusionado con una región Fc de una proteína IgG, preferentemente una proteína IgG2.

En una modalidad, las células también se exponen a un fragmento de fibronectina, en donde dicho fragmento comprende los patrones RGDS y CS-1, así como también un dominio de unión a heparina, preferentemente en donde el fragmento de fibronectina es retronectina®. En una modalidad, el fragmento de fibronectina se inmoviliza en la superficie interna del recipiente de cultivo o en perlas.

En una modalidad, el medio de cultivo también contiene un vector destinado a la transfección o transducción de las células CD34+, durante al menos algún tiempo de exposición de las células CD34+ al ligando de Notch. En una modalidad, el vector destinado a la transfección o transducción de las células CD34+ es un transgén que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR).

La invención se refiere además a un método para obtener progenitores de células T que tienen el fenotipo CD7+CD34-, que comprende las etapas de

- a. realizar el método *in vitro* como se describió anteriormente, y
- b. purificar los progenitores de células T generados, y
- c. opcionalmente acondicionar los progenitores de células T en una bolsa para inyectar a un paciente.

La invención se refiere además a un método *in vitro* para obtener progenitores de células T transformadas que tienen el fenotipo CD7+CD34-, que comprende las etapas de

- a. cultivar células CD34+ en un medio que comprende TNF-alfa y en presencia de un ligando de Notch inmovilizado, y
- b. exponer las células a un vector destinado a la transfección o transducción de células CD34+.

La invención se refiere además a un método *in vitro* para obtener progenitores de células T modificadas que tienen el fenotipo CD7+CD34-, que comprende las etapas de

- a. cultivar células CD34+ en un medio que comprende TNF-alfa y en presencia de un ligando de Notch inmovilizado y
- b. exponer las células a un vector o secuencias de ácido nucleico que contengan el elemento apropiado para la edición de genes.

La invención se refiere además a un kit para realizar el método de acuerdo con la invención que comprende

- (i) un medio de recubrimiento que contiene un ligando de Notch y, opcionalmente, un fragmento de fibronectina
- (ii) un medio adaptado para cultivar células CD34+ y células T
- (iii) un medio de expansión de progenitores que contiene TNF-alfa, un antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, y preferentemente tres o cuatro citocinas seleccionadas del grupo que consiste en SCF, TPO, Flt3L e IL-7.

En resumen, el proceso descrito en la presente descripción hace posible obtener un número de precursores de células T lo suficientemente alto como para ser usado de manera eficiente por un adulto que recibe un trasplante de células madre.

Este método también se puede usar para obtener precursores de células T transformadas (transducidas) para terapia génica, cuando se usa un vector que contiene un gen de interés en algún momento durante el proceso descrito en la presente descripción.

Las células obtenidas mediante el proceso descrito en la presente descripción pueden obtenerse para células CD34+ adultas y pueden usarse para injertos alogénicos o autoinjertos, incluso cuando se usan células de sangre del cordón umbilical para dichos injertos.

Cabe señalar que el método, aunque es muy eficaz para células CD34+ adultas, también puede usarse con células CD34+ de sangre de cordón umbilical.

5 En un aspecto particular de la descripción, el método descrito en la presente descripción acelera la generación de células T *in vivo* después de la inyección de progenitores de células T producidos a partir de HSPC en un sistema de cultivo *in vitro*, que combina una proteína de fusión inmovilizada derivada del ligando de Notch, delta-4, retronectina@ y una combinación de citocinas.

10 Este sistema permite, en 7 días, la generación de progenitores de células T que son fenotípica y molecularmente similares a los precursores de células T tímicas humanas. Además, estos progenitores de células T pueden dar lugar a células T humanas maduras y diversas en ratones NSG, con una cinética más rápida en comparación con HSPC.

15 Los resultados informados en la presente descripción se obtuvieron tanto de sangre de cordón umbilical (CB) como de HSPC de adultos (sangre periférica movilizada, mPB de donantes adultos).

Los inventores han demostrado que la cantidad de precursores de células T puede mejorarse a partir de células CD34+ exponiendo dichas células CD34+ a un ligando de Notch en presencia del TNF-alfa soluble (Factor de necrosis tumoral alfa, Uniprot P01375, RefSeq NP_000585, SEQ ID NO: 8). Dicha exposición se realiza en condiciones adecuadas para generar células T progenitoras. Opcionalmente, las células también se exponen a un fragmento de fibronectina que contiene un motivo RDGS y/o un motivo CS-1 y, opcionalmente, un dominio de unión a heparina. Preferentemente, dicho fragmento de fibronectina contiene un motivo RDGS, un motivo CS-1 y un dominio de unión a heparina.

25 El TNF-alfa se produce principalmente como una proteína transmembrana tipo II de 233 aminoácidos de longitud dispuesta en homotrímeros estables. La forma secretada de TNF-alfa humano adquiere una forma de pirámide triangular y pesa alrededor de 17 kDa.

30 Como se describe en el documento WO 2016/055396, es posible realizar el método descrito en la presente descripción, mediante el uso de un péptido RGDS y/o un péptido CS-1 en lugar del fragmento de fibronectina. Se prefiere un uso combinado de los péptidos RGDS y CS-1, en particular fusionados en la misma proteína. Por tanto, los péptidos RGDS y/o CS-1 pueden estar presentes como tales en el medio de cultivo o dentro de un polipéptido o proteína presente en el medio de cultivo. Cuando el medio de cultivo solo contiene el péptido RGDS y/o CS-1 como tal, uno puede relacionarse con estos como péptidos "libres" en el medio de cultivo si dichos péptidos no están inmovilizados en la superficie interna del recipiente de cultivo. De hecho, el o los péptidos pueden estar en solución o inmovilizados en la superficie interna del recipiente en el que las células CD34+ están expuestas al ligando de Notch inmovilizado.

40 Sin embargo, como se indicó anteriormente, se prefiere usar un fragmento de fibronectina, que contiene los patrones RGDS y CS-1, así como también un dominio de unión a heparina. El fragmento de fibronectina puede estar libre en solución o inmovilizado en la superficie interna del recipiente de cultivo.

45 El proceso se realiza *in vitro*, en un recipiente, tal como una placa de cultivo celular (placa de Petri, matriz de 24 pocillos o similar), preferentemente con el ligando de Notch inmovilizado en su superficie interna. El ligando de Notch puede, sin embargo, estar inmovilizado sobre cualquier otro soporte presente en el medio de cultivo, tal como por ejemplo sobre la superficie de perlas (en particular, micropérlas). La inmovilización del ligando de Notch está destinada esencialmente a estabilizar el ligando para permitir la activación del receptor Notch de las células CD34+.

50 Por "progenitor de células T", se pretende designar cualquier célula implicada en la vía de diferenciación a la vía linfóide T a partir de una HSPC CD34+. Esta célula es caracterizada porque expresa el marcador CD7, que se sabe que es uno de los marcadores más precoces durante la linfopoyesis de las células T. En dependencia del estado de diferenciación en la vía linfóide T, puede expresar o no el marcador CD34 (pérdida de CD34 durante la diferenciación). Dicho progenitor de células T también puede expresar o no el marcador CD5.

55 Entre los "progenitores de células T" se encuentran aquellas células que se pueden encontrar en el timo posnatal, es decir, progenitor tímico temprano (ETP) (CD34+/CD45RA+/CD7+), células proT1 (CD34+CD45RA+CD7++CD5-CD1a-), células proT2 (CD34+CD45RA+CD7++CD5+CD1a-) y células preT (CD34-CD7++/CD5+CD1a+). Los loci del receptor de células T (TCR) se reorganizan de forma muy ordenada (TCRδ-TCRγ-TCRβ-TCRα). Para tener en cuenta, los primeros reordenamientos funcionales de TCR ocurren en la etapa de células preT CD34-CD7++/CD5+CD1a+ (Dik y otros, J Exp Med 2005;201:1715-1723). Los progenitores de células T se conocen bien en el estado de la técnica. Son citadas en particular por Reimann y otros, (STEM CELLS 2012;30:1771-1780.) y por Awong y otros, (2009, op. cit.).

65 El término "péptido RGDS" pretende designar cualquier péptido o proteína que contenga el patrón RGDS, de modo que pueda unirse a la integrina VLA-5. Dicho péptido o proteína se puede ensayar en cuanto a su capacidad para unirse a la integrina VLA-5 mediante métodos conocidos y notificados en la técnica. El péptido RGDS se une a la

integrina VLA-5 (Antígeno muy tardío-5), que es un dímero compuesto por CD49e (alfa5) y CD29 (beta1).

Los dominios de unión a heparina se conocen en la técnica y están presentes en numerosas proteínas que se unen a heparina. Su secuencia es generalmente XBBXBX o XBBBXXBX (B = aminoácido básico; X = aminoácido hidropático; Cardin y Weintraub, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1989;9:21-32, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5).

La presencia de dicho dominio de unión a heparina es particularmente favorable cuando las células CD34+ se exponen a un vector viral (especialmente retroviral) para transducirlas y obtener progenitores de células T que expresen un transgén.

Un péptido CS-1 o patrón CS-1 es un péptido de 25 aminoácidos (DELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPST, SEQ ID NO: 6), descrito por Wayner y otros, 1989, *J. Cell Biol.* 109: 1321). Este patrón CS-1 se une al receptor VLA-4 (Antígeno muy tardío-4). Este antígeno es una integrina dímera, compuesta por CD49d (alfa 4) y CD29 (beta 1).

En una modalidad particular, el fragmento de fibronectina está presente en el medio de cultivo o inmovilizado en la pared interior (en particular la parte inferior) del recipiente. La fibronectina es una proteína, que en su forma natural es un gran dímero en forma de V de 100 nm de largo y 460 kDa. Los dos monómeros están conectados por dos puentes disulfuro en su extremo C. Por "fibronectina" o "fragmento de fibronectina" se entiende la proteína fibronectina natural (es decir, cualquier isoforma producida por corte y empalme alternativo), sino también un monómero de esta proteína, o un fragmento de esta proteína (pero que contiene el péptido RGDS, así como también el sitio de unión del péptido CS-1 y la heparina).

Una fibronectina que es particularmente adecuada para llevar a cabo el proceso descrito en la presente descripción es retronectina®. Esta proteína corresponde a un fragmento de una fibronectina humana (fragmento CH-296, Kimizuka y otros, *J Biochem.*, 110 de agosto de 1991 (2): 284-91, Chono y otros, *J Biochem* 2001 septiembre 130 (3): 331-4) y contiene los tres dominios funcionales que se prefieren para la implementación del método (el dominio C de unión celular que contiene el péptido RGDS, el dominio de unión a heparina y la secuencia CS-1). Esta proteína es comercializada en particular por la empresa Takara Bio Inc. (Shiga, Japón).

En una modalidad particular, el fragmento de fibronectina está inmovilizado (es decir, unido a un soporte sólido y no está presente libre en solución (aunque es posible que ciertos elementos se encuentren en solución)). Este soporte sólido es preferentemente la pared inferior del recipiente en el que se lleva a cabo el proceso. Sin embargo, también es posible prever la unión del fragmento de fibronectina a perlas, tales como perlas poliméricas o magnéticas (con un diámetro generalmente comprendido entre 1 y 5 µm). La unión de la proteína o el péptido a estas perlas puede o no ser covalente. Los métodos para unir una proteína o un péptido a las perlas son conocidos en la técnica. También es posible introducir el fragmento de fibronectina en un medio semisólido, tal como agar o gel.

Cuando el fragmento de fibronectina está inmovilizado sobre el soporte (en particular, la pared inferior del recipiente en el que se realiza el proceso), esta inmovilización puede ser también covalente o no. En una modalidad preferida, esta inmovilización se lleva a cabo de forma no covalente permitiendo que el fragmento de fibronectina sea absorbido sobre el vidrio o plástico que constituye la pared inferior del recipiente.

En una modalidad particular, como se ha visto anteriormente, la diferenciación de las células CD34+ en progenitores de células T se lleva a cabo junto con la transducción o transfección (incluida la nucleofección™, un sistema de electroporación específico desarrollado por Lonza) de las células CD34+ por medio de un vector (tal como un vector viral o un fragmento de ácido nucleico como un plásmido o secuencias de ADN o ARN plasmídico) para introducir un gen de interés (o un sistema para la edición de genes) en estas células. Esto significa que las células expuestas al ligando de Notch y al fragmento de fibronectina, con TNF-alfa, también están expuestas a un sobrenadante viral durante al menos parte de su tiempo de exposición al ligando de Notch y al fragmento de fibronectina, con TNF-alfa.

Las enseñanzas del documento WO 2016/055396 con respecto a las condiciones operativas para realizar la transducción celular son expresamente aplicables al presente método y, por lo tanto, se consideran enumeradas expresamente en esta solicitud.

Se puede citar, en particular:

(iv) exposición de las células al ligando de Notch, fragmento de fibronectina y TNF-alfa, durante algún tiempo (preferentemente más de 4 horas, con mayor preferencia más de 6 horas, o más de 8 horas o 10 horas, pero menos de 36 horas, con mayor preferencia menos de 30 horas o menos de 24 horas) con citocinas apropiadas conocidas en la técnica y descritas en el documento WO 2016/055396, y adición del sobrenadante viral durante una duración apropiada (preferentemente más de 4 horas, con mayor preferencia más de 6 horas, 8 horas o 10 horas, y preferentemente menos de 30 horas, con mayor preferencia menos de 24 horas, con mayor preferencia alrededor de 16 horas).

(v) segunda transducción si se requiere como se enseña en el documento WO 2016/055396.

(vi) uso de este protocolo para injertos de células madre hematopoyéticas autólogas en protocolos de terapia génica, para que el transgén agregue una proteína que está ausente o deficiente en el paciente para brindar un

beneficio terapéutico.

(vii) transgenes que se pueden usar: inmunodeficiencias correctoras de genes (en particular inmunodeficiencias combinadas graves SCID o no, CID), VIH, adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X, hemoglobinopatías, en particular β -talasemia o enfermedad de células falciformes. También se puede usar, como transgén, un gen que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR), es decir, una proteína de la superficie celular que reconoce una proteína de la superficie celular que se expresa específicamente en las células cancerosas para desencadenar una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas a través de las células CAR-T modificadas.

(viii) uso preferido de un sobrenadante viral para permitir la inserción del transgén dentro del genoma celular, mediante el uso en particular de lentivirus conocidos y descritos en la técnica.

(ix) introducción del vector viral en el medio de cultivo celular tras la preactivación de las células CD34+ entre 4 y 36 horas, preferentemente entre 6 y 24 horas.

(x) exposición de las células al vector viral entre 4 y 30 horas, preferentemente entre 12 y 24 horas, con mayor preferencia alrededor de 16 horas, y eliminación del vector viral (recolección y lavado de las células, y resuspensión de estas células en presencia del ligando de Notch, el fragmento de fibronectina y el TNF-alfa).

Como se indicó anteriormente, en otra modalidad, las células CD34+ se exponen a un sistema que permite realizar la edición de genes. Dichos sistemas ahora son ampliamente conocidos y descritos en la técnica y se basan esencialmente en la reparación de doble ruptura de ácidos nucleicos. Tal sistema de edición del genoma puede usar una nucleasa seleccionada del grupo que consiste en meganucleasas, nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas basadas en efectores similares a activadores de transcripción (TALEN) y nucleasas CRISPR-Cas. El hecho de que las células CD34+ proliferen durante la exposición a los elementos como se mencionó anteriormente y, por tanto, en presencia de TNF-alfa, hace posible usar estos sistemas de edición de genes que requieren la proliferación de células.

En una modalidad particular, el ligando de Notch es la proteína similar a delta-1 (SEQ ID NO: 1) o un fragmento de la misma (dominio soluble).

En otra modalidad preferida, el ligando de Notch es la proteína similar a delta-4 (SEQ ID NO: 2).

En una modalidad particular, dicho ligando de Notch es una proteína de fusión que comprende el dominio soluble de un ligando de Notch natural fusionado a una región Fc de una proteína IgG. Como se sabe en la técnica, el dominio soluble de un ligando de Notch representa la porción extracelular de dicho ligando. Varnum-Finney y otros, (J Cell Sci., diciembre de 2000; 113 Pt 23:4313-8) describieron una proteína de fusión de la parte soluble de DL-1 con una porción Fc de IgG1. Reimann y otros, (*op cit*) describieron una proteína de fusión de la parte soluble de DL-4 (aminoácidos 1-526) con el fragmento Fc de una inmunoglobulina IgG2b. Por lo tanto, se prefiere que la proteína IgG sea una IgG2. En una modalidad preferida, la secuencia del ligando de Notch usado en el método descrito en la presente descripción es SEQ ID NO: 7. Un producto comercialmente disponible (Sino Biologicals) que comprende el dominio extracelular (Met 1-Pro 524) de DLL4 humano (número de acceso de DLL4 de longitud completa NP_061947.1) fusionado con la región Fc de IgG 1 humana en el extremo C-terminal es un DL4 la proteína también es adecuado para usar en la presente descripción.

El medio de cultivo usado en el contexto del método descrito en la presente descripción es cualquier medio adaptado para cultivar células CD34+ y células T. Se pueden mencionar en particular α -MEM, DMEM, RPMI 1640, IMDM, BME, McCoy's 5A, StemSpan™, en particular medio SFII (StemCell Technologies) o medio de Fischer. El medio StemSpan™ SFII contiene, en particular, MDM de Iscove, albúmina de suero bovino, insulina humana recombinante, transferrina humana (saturada de hierro), 2-mercaptoetanol.

Un medio de cultivo adecuado y preferido para llevar a cabo el proceso descrito en la presente descripción es el medio X-VIVO™ (Lonza, Basilea, Suiza). Este medio fue usado en particular por Jonuleit y otros, (Eur J Immunol, 1997, 27, 12, 3135-42) y Luft y otros, (J Immunol, 1998, 161, 4, 1947-53).

Preferentemente, se usa un medio basal (es decir, que es un medio que permite el crecimiento de las células sin necesidad de añadir suplementos), en el que, sin embargo, se añadiría preferentemente suero, y/o factores de crecimiento y citocinas.

Por lo tanto, se añade preferentemente al medio de cultivo basal suero bovino fetal (FBS) o suero bovino fetal (FCS), suero humano autólogo o suero AB humano. Preferentemente, este medio se complementa con al menos un 15 % de suero fetal, con mayor preferencia al menos un 20 %. El FBS es particularmente adecuado para la implementación del proceso. En particular, se prefiere usar FBS definido. El FBS definido es un suero de alta calidad que ha sido analizado y filtrado para evitar la presencia de partículas virales. Muchos proveedores lo venden como tal, como el HyClone™ suero bovino fetal definido (FBS) de Thermo Scientific™.

Además de TNF-alfa, el medio de cultivo también se complementa preferentemente con citocinas y factores de crecimiento. Estas citocinas y factores de crecimiento se seleccionan especialmente del grupo que consiste en SCF (factor de células madre), trombopoyetina (TPO, también llamada factor de crecimiento y desarrollo de

megacariocitos, MGDF), ligando-Flt3 (que es un factor de crecimiento hematopoyético), interleucina 3 (IL-3), interleucina 7 (IL-7) y SCF (factor de células madre). En una modalidad particular, el medio de cultivo contiene al menos tres, preferentemente al menos cuatro de estas citocinas o factores de crecimiento, además del TNF-alfa.

5 En una modalidad preferida, y en particular para la generación de precursores de células T que no se transducen con un vector viral, se agregan al menos o exactamente tres citocinas. Preferentemente, estas tres citocinas son interleucina-7 (IL-7), SCF (factor de células madre) y ligando Flt-3 (factor de crecimiento hematopoyético).

10 En otra modalidad preferida, cuatro citocinas, es decir, se añaden las tres citocinas mencionadas anteriormente y TPO (trombopoyetina).

En otra modalidad particular, y en particular para la generación de precursores de células T transducidos con un vector viral, la naturaleza de las citocinas y factores de crecimiento puede variar durante la implementación del método.

15 Por lo tanto, IL-3, IL-7, SCF, TPO y Flt3-L pueden usarse en el medio en la etapa de preactivación de las células antes de la adición del vector viral, y luego el medio se complementa solo con IL-7, SCF, TPO y Flt3-L después de eliminar el vector.

20 Las mezclas de citocinas y factores de crecimiento antes mencionadas son suficientes para inducir la diferenciación de células CD34+ en precursores de células T y, generalmente, el medio de cultivo no contiene ninguna otra citocina o factor de crecimiento, excepto TNF-alfa, que, como se describió en los ejemplos, hace posible aumentar el número de precursores de células T.

25 En el proceso previsto en la presente descripción, la duración total de la exposición de las células CD34+ en presencia del ligando de Notch, de la proteína o péptido que presenta el motivo RGDS y del TNF-alfa, se realiza generalmente durante un tiempo preferentemente superior a 3 días y menos de 10 días.

30 Esta exposición puede variar en dependencia de si las células se transducen. Así, un tiempo de exposición de tres días puede ser suficiente para las células madre adultas no transducidas, mientras que generalmente será más largo para las células madre infantiles (alrededor de 7 días) o cuando se realiza la transducción.

35 Las células CD34+ se obtienen de una punción de médula ósea, de sangre de cordón umbilical o de sangre periférica de donantes adultos, que se han movilizado particularmente con G-CSF o cualquier otro agente movilizador conocido en la técnica. Los métodos para clasificar las células CD34+ son conocidos en la técnica. En particular, pueden usarse para este propósito perlas magnéticas que tienen un anticuerpo que reconoce CD34 en su superficie.

40 Preferentemente, el recipiente de cultivo celular se prepara inmovilizando el ligando de Notch y el fragmento de fibronectina en la superficie interna (preferentemente la inferior) antes de exponer las células CD34+. La retronectina@ u otra fibronectina se adhieren de forma natural al plástico de la caja de cultivo celular (placa de Petri o caja de 24 pocillos, u otra). De manera similar, si se usa el ligando de Notch como proteína de fusión con el fragmento Fc de una inmunoglobulina, este fragmento Fc también se adhiere a los plásticos. Por lo tanto, es suficiente dejar el recipiente en presencia de estos compuestos durante algunas horas para obtener el recubrimiento adecuado. Un método para recubrir dicho recipiente de cultivo con el ligando de Notch y el fragmento de fibronectina se describe en detalle en el documento WO 2016/055396 y puede aplicarse para implementar el método como se describe en la presente descripción.

50 Se recuerda que, de acuerdo con el documento WO 2016/055396, alrededor del 75 % de DL-4 se adherirá a la superficie del envase cuando se usen 5 µg/ml, siendo la dosis óptima mayor o igual a 1,25 µg/ml y preferentemente entre 2,5 y 5 µg/ml.

55 En cuanto al fragmento de fibronectina, se adapta particularmente a una concentración de 25 µg/ml (especialmente cuando se usa retronectina@), aunque se pueden usar otras concentraciones (superiores o inferiores).

En la implementación del proceso descrito en la presente descripción, se agregan células CD34+ a una concentración comprendida entre 10^6 y 10^7 células/ml, en particular alrededor de 2×10^6 células CD34+/ml en el recipiente de cultivo.

60 En dependencia de si se van a transducir las células y de las células CD34+ se puede usar una placa de entre 2 a 10 cm^2 (es decir, una placa de 24 a 6 pocillos). Cuando se usa una placa de 24 pocillos, se añaden entre 10^4 y 10^6 células CD34+ en cada pozo, preferentemente de 2×10^4 a 4×10^5 células CD34+ por pocillo. Cuando se usa una placa de 6 pocillos, se añadirán entre 8×10^4 y 2×10^6 células por pocillo.

65 La cantidad de células a añadir es adaptada por el experto en la técnica, de acuerdo con el recipiente usado.

Las células se colocan en el pocillo, en el medio basal seleccionado, suplementado con TNF-alfa, y preferentemente suplementado con factores de crecimiento y citocinas, como se ha indicado anteriormente.

Las concentraciones de citocinas o factores de crecimiento están entre 2 y 300 ng/ml. Preferentemente, la concentración es superior a 40 ng/l e inferior a 300 ng/ml o 200 ng/l, con mayor preferencia alrededor de 100 ng/ml.

Sin embargo, cuando se desea generar progenitores de células T transducidas, y cuando las células se preactivan antes de exponerlas al vector viral, se pueden usar concentraciones más altas (alrededor de 300-400 ng/ml). En esta modalidad, SCF y Flt3-L pueden usarse en concentraciones en el intervalo de 300 ng/ml, TPO e IL-7 en el intervalo de 100 ng/ml e IL-3 en aproximadamente 40 ng/ml.

El TNF-alfa se usa preferentemente a una concentración igual o superior a 5 ng/ml. De hecho, como se demuestra en los ejemplos, esta baja concentración es suficiente para obtener la proliferación de los precursores de células T, sin modificar la vía de diferenciación.

Sin embargo, también se pueden usar concentraciones más altas. En particular, la concentración de TNF-alfa puede ser tan alta como 300 ng/ml o 200 ng/ml. Una concentración apropiada es alrededor de 100 ng/ml. Sin embargo, también son adecuadas otras concentraciones tales como 10 ng/ml, 20 ng/ml o 50 ng/ml.

Por lo tanto, la invención se refiere a un método *in vitro* para generar precursores de células T que comprende la etapa de cultivar células CD34+ en un medio adecuado que comprende TNF-alfa y en presencia de un ligando de Notch inmovilizado, y opcionalmente el fragmento de fibronectina como se describe anteriormente.

La descripción se refiere también a un método *in vitro* para expandir precursores de células T que comprende la etapa de cultivar células CD34+ en un medio adecuado que comprende TNF-alfa y en presencia de un ligando de Notch inmovilizado, y opcionalmente el fragmento de fibronectina como se describe anteriormente.

La expansión de los precursores de células T pretende significar que hay más precursores de células T que cuando no se usa el TNF-alfa, y/o que hay más precursores de células T que el número de células CD34+ introducidas en el recipiente.

En particular, los precursores de células T obtenidos por los métodos anteriores son precursores de CD34-/CD7+/CD5-.

Generalmente, las células tampoco albergan el marcador CD1a.

En una modalidad preferida, los precursores de células T obtenidos por los métodos anteriores son precursores CD34-/CD7+/CD1a-.

Esto significa que la población de precursores de células T obtenida por el presente método expresa el marcador CD7, y que más del 80 % de las células que expresan este marcador tienen el fenotipo anterior (no expresan

- CD34 y CD1a, o
- CD34 y CD5, o
- CD34 y CD1a y CD5),

como se analizó por citometría de flujo. Este fenotipo se obtiene generalmente después de 7 días de cultivo.

Como se indica, las células CD34+ no son preferentemente células de sangre del cordón umbilical. Sin embargo, el método también se puede usar y es aplicable a las células CD34+ de la sangre del cordón umbilical, y también conduce a mejores resultados.

El método es particularmente interesante cuando se implementa con células CD34+ que han sido aisladas de un paciente adulto. Dicho paciente puede ser un donante sano, o un donante con una enfermedad, y particularmente para los que se corregirán las células por transducción viral.

Las células pueden cultivarse durante más de 3 días, y preferentemente durante al menos 5 días, con mayor preferencia durante al menos o exactamente 6 días, con la máxima preferencia durante al menos o exactamente 7 días, aunque la duración del cultivo puede durar más.

En el método descrito en la presente descripción, el TNF-alfa se agrega preferentemente al medio de cultivo desde el día 0 (es decir, al inicio del cultivo de células CD34+) y deberá permanecer presente, en el medio de cultivo, durante al menos tres días, y preferentemente durante todo el tiempo que las células estén en cultivo (es decir, preferentemente unos 7 días).

Al realizar el método descrito en la presente descripción, es posible agregar además StemRegenin 1 (SR1, 4-(2-(2-

(Benzo[b]tiofen-3-il)-9-isopropil-9H-purin-6-ilamino)etil)fenol, CAS 1227633-49-10) en el medio de cultivo que ya contiene el TNF-alfa.

5 La invención también se relaciona con un método para obtener progenitores de células T, que comprende las etapas de

- a. realizar el método descrito anteriormente y
- b. purificar los progenitores de células T generados obtenidos de esta manera.

10 La purificación puede realizarse lavando las células y resuspendiéndolas en un medio basal.

Este método también puede comprender la etapa de acondicionar los progenitores de células T en una bolsa para inyectar a un paciente.

15 En este caso, se prefiere que estas células se reacondicionen en una solución salina que contenga un 5 % de HSA, tal como 5 % de alburnorm™ 50 g/l (Octopharma, Lingolsheim, Francia).

Estas células también pueden congelarse de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

20 La descripción también se refiere a una bolsa para inyección intravenosa, que contiene una población de progenitores de células T (susceptibles de obtenerse o como se obtienen mediante un método tal como se describió anteriormente), entre los cuales la proporción de células CD7+ en esta población es superior al 80 %, con mayor preferencia superior al 85%.

25 La descripción también se refiere a una bolsa para inyección intravenosa, que contiene una población de progenitores de células T CD7+ (susceptibles de obtenerse u obtenidas mediante un método como se describió anteriormente), donde la proporción de células CD34- y CD5- (células que son CD7+ y tanto CD34- como CD5-) en esta población es superior al 80 %, con mayor preferencia superior al 85 %.

30 La descripción también se refiere a una bolsa para inyección intravenosa, que contiene una población de progenitores de células T CD7+ (susceptibles de obtenerse u obtenidas mediante un método como se describió anteriormente), donde la proporción de células CD34- (células que son CD7+ y CD34-) en esta población es superior al 50 %, con mayor preferencia superior al 60 %. Además, al menos el 80 %, y con mayor preferencia al menos el 85 % de las células de esta población son células CD1a-.

35 La invención también se refiere a un método *in vitro* para obtener progenitores de células T transformadas, que comprende las etapas de

- a. cultivar células CD34+ en un medio adecuado que comprende TNF-alfa y en presencia de un ligando de Notch inmovilizado
- b. exponer las células a un vector destinado a la transfección o transducción de células CD34+.

Como se describió anteriormente, y después de las etapas de lavar y cultivar nuevamente las células, se obtienen progenitores de células T transformadas (que expresan un transgén, integrado dentro de su genoma).

45 La invención también se refiere a un método *in vitro* para obtener progenitores de células T modificadas, que comprende las etapas de

- a. cultivar las células CD34+ en un medio que comprende TNF-alfa y en presencia de un ligando de Notch inmovilizado
- b. exponer las células a un vector o una secuencia de ácido nucleico que contiene el elemento apropiado para la edición de genes al menos durante algún tiempo durante el cultivo celular.

55 De ese modo, se obtienen progenitores de células T modificados por edición de genes, después de posibles etapas de lavado y cultivo.

La descripción también se refiere a progenitores de células T, en particular como se obtienen mediante el método descrito en la presente descripción, para su uso en un paciente inmunodeprimido, en particular para permitir la reconstitución inmunológica en este paciente y/u obtener una protección inmunológica contra infecciones en dicho paciente, durante un período de algunos meses (al menos dos meses, preferentemente al menos seis meses).

60 En un aspecto particular de la descripción, el paciente es un paciente inmunodeprimido. Las razones de la deficiencia pueden ser múltiples: inmunodeficiencia hereditaria, quimioterapia para la leucemia, acondicionamiento, injerto que contiene solo células madre, tratamiento posterior al injerto para la profilaxis de GVH (enfermedad de injerto contra huésped), edad del paciente y complicaciones tal como infecciones.

65

En particular, el paciente puede estar inmunodeprimido debido al agotamiento de sus células inmunitarias después de la terapia antes del trasplante de células madre hematopoyéticas. En este aspecto de la descripción, el injerto puede ser un aloinjerto (en este caso, los progenitores de células T se derivan preferentemente de un donante parcialmente compatible con HLA), o un autoinjerto (en cuyo caso, los progenitores de células T se han transformado preferentemente por un vector para expresar un gen y/o una proteína que permita corregir un defecto genético en dicho paciente).

Los progenitores de células T son preferentemente una población de células CD7+ (es decir, una población en la que al menos el 75 %, con mayor preferencia al menos el 80 % de las células de la población expresan el marcador CD7). Esta población también es parte de la invención. En particular, es susceptible de obtenerse mediante un método descrito en la presente descripción. En una modalidad específica, se obtiene mediante un método descrito en la presente descripción.

Más específicamente, los progenitores de células T son preferentemente una población de células CD7+ (es decir, una población en la que al menos el 75 %, con mayor preferencia al menos el 80 % de las células de la población expresan el marcador CD7) donde la proporción de células CD34- y CD5- (células que son CD7+ y tanto CD34- como CD5-) en esta población es superior al 80 %, con mayor preferencia superior al 85 %. Esta población también es parte de la descripción. En particular, es susceptible de obtenerse mediante un método descrito en la presente descripción. En una modalidad específica, se obtiene mediante un método descrito en la presente descripción.

En otro aspecto de la descripción, los progenitores de células T son preferentemente una población de células CD7+ (es decir, una población en la que al menos el 75 %, con mayor preferencia al menos el 80 % de las células de la población expresan el marcador CD7). En esta población, más del 50 %, con mayor preferencia más del 60 % de las células no expresan el marcador CD34. En esta población al menos el 80 %, con mayor preferencia al menos el 85 % de las células no expresan el marcador CD1a. La proporción de células CD7+ CD1a- en esta población es preferentemente de al menos el 80 %. Esta población también es parte de la descripción. En particular, es susceptible de obtenerse mediante un método descrito en la presente descripción. En un aspecto específico de la descripción, se obtiene mediante un método descrito en la presente descripción.

Para determinar si una célula es positiva o no a un marcador de superficie (CD7, CD34, CD5 o CD1a), se usará cualquier método conocido en la técnica, y en particular la citometría de flujo, después de que las células hayan sido marcadas con anticuerpos fluorescentes dirigidos contra el antígeno de superficie. El principio es que se emitirá una señal, para cada célula de la población, con una intensidad determinada, y las células se considerarán positivas para el antígeno si la señal es superior a un umbral determinado.

Para CD34: se usa una población de control que consiste en una población de HPSC (tal como una aislada de la sangre del cordón umbilical o de la sangre periférica movilizada) para determinar los umbrales apropiados. En esta población de células, las células son CD34+ CD7- CD5- o CD34+ CD7- CD1a-. Con este control, es posible determinar el umbral de cada antígeno que se usará para determinar si las células de otra población son positivas o no para estos antígenos.

La población de control generalmente contendrá alrededor del 90 % de células madre hematopoyéticas CD34+ CD7- CD5- o CD34+ CD7- CD1a-. El umbral es el nivel de intensidad de la señal por el cual las células de la población pueden clasificarse en una proporción de 90/10.

Para CD7 (resp. CD5 o CD1a): se usa una población de control, obtenida por aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por cualquier técnica conocida en la técnica, y en particular una técnica de gradiente de densidad tal como Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences). Las células positivas para CD7 (resp. CD5 o CD1a) se aíslan mediante el uso de cualquier técnica conocida en la técnica, tal como MACS® (Magnetic Cell Isolation and Cell Separation, Miltenyi Biotec) que usa perlas magnéticas con anticuerpo anti-CD7 (resp. anti-CD5 o anti-CD1a). En esta población, las células serán esencialmente CD7+ (resp. CD5+ o CD1a+), se cree que la proporción rondaría el 90/10.

Los umbrales para evaluar si una célula es positiva a un antígeno de superficie se determinan a partir de la población control para este antígeno, y sería aquella intensidad para la que más del 90 % de las células de la población control tienen una intensidad de señal superior.

En consecuencia, se considera que una célula es positiva para un antígeno si la señal de intensidad para este antígeno es superior al umbral determinado anteriormente, y negativa para el antígeno si la señal de intensidad para este antígeno es inferior al umbral determinado anteriormente.

El hecho de que la gran mayoría de los progenitores de células T en la población no expresen el marcador CD1a puede resultar favorable, ya que las células que expresan este marcador CD1a pueden no ser muy eficientes para llegar al timo y, por lo tanto, pueden ser tan eficientes como las células CD1a- para la repoblación *in vivo*. Dado que el potencial de reconstitución de las células CD1a+ es incierto, es preferible reducir la cantidad de tales células en la población.

La descripción también se refiere a un método para tratar a un paciente inmunodeprimido, en particular con el fin de permitir una reconstitución inmune, al menos temporalmente, en este paciente, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente progenitores de células T, como se describió anteriormente.

Este método también puede incluir la etapa de obtener dichos progenitores mediante la exposición de células CD34+ a un ligando de Notch en presencia de TNF-alfa (como se describió anteriormente) y preferentemente a una proteína o péptido que tiene el motivo RGDS y/o el motivo CS 1, en particular, un fragmento de fibronectina como se describió anteriormente, en las condiciones mencionadas anteriormente.

En particular, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva, es decir del orden de 1 a 5×10^6 de progenitores por kg, lo que permite proporcionar al paciente células capaces de desempeñar un papel protector con respecto a las infecciones durante algunos meses (del orden de unos 6 meses).

Preferentemente, esta administración de progenitores de células T se realiza justo antes, justo después o concomitantemente con un trasplante de células madre hematopoyéticas en dicho paciente. Como se ha visto anteriormente, las células inyectadas pueden ser transformadas por un vector destinado a permitir la corrección de un defecto genético en dicho paciente.

En otro aspecto de la descripción, los progenitores de células T se inyectan a un paciente que no necesita un trasplante de células madre hematopoyéticas. De hecho, es posible usar los progenitores de células T transformados o transducidos para tratar algunas inmunodeficiencias, en las que solo se ven afectadas las células T, pacientes con HIV o cáncer (mediante el uso de los progenitores modificados para dar lugar a células CAR-T), sin necesidad de realizar quimioterapia que deprime el sistema inmunitario.

Cabe señalar que las enseñanzas de la invención, como se describe con TNF-alfa, también son aplicables con el derivado de purina StemRegenin 1 (SR1, descrito en Boitano y otros, Science. 10 de septiembre de 2010; 329(5997): 1345-8). Por lo tanto, SR1 puede sustituirse por TNF-alfa (es decir, usado en lugar de TNF-alfa) para obtener progenitores de células T a partir de células CD34+, con un comienzo de diferenciación y expansión de las células (aumento del número de células). La concentración de SR1 está preferentemente en el intervalo de 750 nM (30 ng/ml), también una concentración más alta como 1500 nM o 2500 nM (100 ng/ml), o incluso 5000 nM (200 ng/ml) o más baja como 500 nM (20 ng/ml) también se puede considerar. Cuando se usa solo, pero particularmente en combinación con TNF-alfa, pueden usarse concentraciones mucho más bajas, tan bajas como 3 ng/ml o 10 ng/ml. Las concentraciones adecuadas también incluyen 30 ng/ml o 100 ng/ml. En consecuencia, cualquier concentración superior a 3 ng/ml, o superior a 10 ng/ml es adecuada para aumentar la diferenciación de las células CD34+ a progenitores de células T.

SR1 es un ligando (antagonista) del receptor de arilhidrocarburo/dioxina (AhR). Pueden usarse otros antagonistas de AhR solos o en combinación con TNF-alfa para promover la diferenciación de células CD34+ en el linaje progenitor de células T. Se pueden citar el resveratrol, el omeprazol, la luteolina, la alfa-naftoflavona, la mexiletina, el tranilast, la 6,2',4'-trimetoxiflavona, CH 223191 (1-metil-N-[2-metil-4-[2-(2-metilfenil)diazenil]fenil-1H-pirazol-5-carboxamida, CAS 301326-22-7). Un experto en la técnica debe determinar la cantidad de antagonista de AhR caso por caso, teniendo en cuenta la IC50 del antagonista (SR1 tiene una IC50 de 127 nM, mientras que CH 223191 tiene una IC50 de 30 nM) y el hecho de que algunos productos pueden tener una actividad agonista hacia el AhR cuando se usan en altas concentraciones (tal como la alfa-naftoflavona) o dependiendo del contexto celular (tal como el omeprazol). En vista de la diferencia en IC50 entre SR1 y CH 223191, se prevé que una concentración efectiva de CH 223191 estaría más abajo de la concentración efectiva de SR1, descrita en la presente descripción.

En consecuencia, la descripción también se refiere a

- (i) un método *in vitro* para generar precursores de células T, que comprende la etapa de cultivar células CD34+ en un medio que comprende un antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en particular StemRegenin 1 (SR1) y en presencia de un ligando de Notch inmovilizado.
- (ii) el método *in vitro* como el anterior, en donde el medio de cultivo contiene además TNF-alfa.
- (iii) el método *in vitro* como el anterior, en donde el antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en particular SR1, está presente en el medio de cultivo desde el día 0 del cultivo.
- (iv) el método *in vitro* de cualquiera de los anteriores, en donde las células CD34+ se han aislado de un donante adulto o de la sangre del cordón umbilical.
- (v) el método *in vitro* de cualquiera de los anteriores, en donde las células se cultivan en presencia de un antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en particular SR1, durante un máximo de 10 días.
- (vi) el método *in vitro* de cualquiera de los anteriores, en donde las células se cultivan en presencia del antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en particular SR1, entre 3 y 7 días.
- (vii) el método *in vitro* de cualquiera de los anteriores, en donde se añade al medio de cultivo el antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en particular SR1, a una concentración entre 1 ng/ml y 300 ng/ml y preferentemente mayor o igual a 1 ng/ml, o mayor o igual a 3 ng/ml, o mayor o igual a 10 ng/ml, y preferentemente inferior a 200 ng/ml, o 150 ng/ml y generalmente entre 3 ng/ml y 100 ng/ml.

(viii) el método *in vitro* de cualquiera de los anteriores, en donde el ligando de Notch es el dominio soluble del ligando similar a delta-4, fusionado con una región Fc de una proteína IgG, preferentemente una proteína IgG2.

(ix) el método *in vitro* de cualquiera de los anteriores, en donde las células también se exponen a un fragmento de fibronectina, en donde dicho fragmento comprende los patrones RGDS y CS-1, así como también un dominio de unión a heparina, preferentemente inmovilizado en la superficie interna del recipiente de cultivo.

(x) el método *in vitro* anterior, en donde el fragmento de fibronectina es retronectina®, como se describió anteriormente.

(xi) el método *in vitro* de cualquiera de los anteriores, en donde el medio de cultivo también contiene un vector destinado a la transfección o transducción de las células CD34+, durante al menos algún tiempo de exposición de las células CD34+ al ligando de Notch.

(xii) el método *in vitro* de cualquiera de los anteriores, en donde el medio de cultivo contiene al menos tres, y preferentemente las cuatro, citocinas o factores de crecimiento elegidos del grupo que consiste en interleucina 7 (IL-7), SCF (factor de células madre), trombopoyetina (TPO), y ligando Flt3 (FLT3L).

(xiii) un método (*in vitro*) para la obtención de progenitores de células T, que comprende las etapas de

a. realizar el método de acuerdo con cualquiera de los anteriores y

b. purificar los progenitores de células T generados

c. opcionalmente, acondicionar los progenitores de células T en una bolsa para inyectar a un paciente.

(xiv) un método *in vitro* método para obtener progenitores de células T transformadas, que comprende las etapas de

a. cultivar células CD34+ en un medio que comprende un antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en particular SR1, y en presencia de un ligando de Notch inmovilizado

b. exponer las células a un vector destinado a la transfección o transducción de células CD34+.

(xv) un método *in vitro* para obtener progenitores de células T modificadas, que comprende las etapas de

a. cultivar células CD34+ en un medio que comprende un antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en particular SR1, y en presencia de un ligando de Notch inmovilizado

b. exponer las células a un vector o secuencias de ácido nucleico que contengan el elemento apropiado para la edición de genes.

La descripción también se refiere a un kit para realizar cualquier método como se indicó anteriormente, que comprende:

(i) un medio de recubrimiento que contiene un ligando de Notch (en particular, el dominio soluble del ligando similar a Delta, fusionado con una región Fc de una proteína IgG, en particular una proteína IgG2), y opcionalmente un fragmento de fibronectina

(ii) un medio adaptado para cultivar (y/o expandir) células CD34+ y células T tales como medios α -MEM, DMEM, RPMI 1640, IMDM, BME, McCoy's 5A, StemSpan™ SFII (Tecnologías StemCell), medio X-VIVO™ o medio de Fischer

(iii) un medio de expansión de progenitores que contiene TNF-alfa y preferentemente tres citocinas, en particular seleccionadas de SCF, TPO, Flt3L e IL-7. Se prefiere cuando el medio de expansión de progenitores contiene TNF-alfa y las cuatro citocinas SCF, TPO, Flt3L e IL-7.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un kit que comprende los mismos elementos (i) y (ii) que los indicados anteriormente, y un medio de expansión de progenitores (iii) que contiene un antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en particular SR1, y preferentemente tres citocinas, en particular seleccionadas de SCF, TPO, Flt3L e IL-7. Se prefiere cuando el medio de expansión de progenitores contiene SR1 y las cuatro citocinas SCF, TPO, Flt3L e IL-7.

En otra modalidad, el medio de expansión de progenitores (iii) contiene TNF-alfa y un antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en particular SR1, y preferentemente tres citocinas, en particular seleccionadas de SCF, TPO, Flt3L e IL-7. Se prefiere cuando el medio de expansión de progenitores contiene TNF-alfa, SR1 y las cuatro citocinas SCF, TPO, Flt3L e IL-7.

Dicho kit está particularmente adaptado y diseñado para realizar los métodos descritos en la presente descripción.

El medio de recubrimiento (i) se usa primero para recubrir las paredes de un recipiente de cultivo.

A continuación, el medio (ii) se usa para cultivar células CD34+ (ya sea obtenidas de sangre de cordón umbilical o de sangre periférica movilizada, en particular de un adulto). Tal medio se usa generalmente y preferentemente a una concentración 1X (es decir, puede usarse sin diluir).

El medio (iii) generalmente se presenta como una dilución de 10x (es decir, tiene que ser diluido en un medio (ii) para su uso. El medio reconstituido de los medios (ii) y (iii) se usa luego para promover la diferenciación de las células CD34+ a progenitores de células T, en el linaje de células T, como se describe anteriormente.

La descripción también se refiere a un método para aumentar el número de células T en un sujeto que lo necesita, el método que comprende administrar al sujeto un número efectivo de células T progenitoras obtenidas mediante un

método descrito en la presente descripción.

La descripción también se refiere a las células T progenitoras obtenidas mediante cualquier método descrito en la presente descripción para su uso en el tratamiento de un sujeto que necesita un mayor número de células T.

En particular, el sujeto es un ser humano.

En particular, las células T progenitoras administradas son autólogas. En otro aspecto de la descripción, las células T progenitoras administradas son alogénicas.

En particular, el sujeto que necesita el número incrementado de células T tiene una condición médica que causa o da como resultado linfopenia, en particular cáncer, infección por HIV, timentomía parcial, enfermedad autoinmune y/o trasplante de órganos.

Descripción de las figuras:

Figura 1: Número total de células nucleadas obtenido a partir de 20 000 células CD34+ de sangre de cordón umbilical (CB, figura 1.A) o sangre periférica movilizada (mPB, figura 1.B), después de 3 días (barras negras) y 7 días (barras negras y grises acumulativas) de cultura. NC: no complementado; SR1: adición de StemRegenin 1 (750 nM); TNF-alfa: adición de TNF-alfa (100 ng/ml); (a), (b), (c): número de células observadas cuando se añaden los complementos de 0-3 días de cultivo (a), 0-7 días de cultivo (b) o 4-7 días de cultivo (c).

Figura 2: Número de precursores de células T CD7+ obtenidos en el día 7 a partir de 20 000 células CD34+ de sangre de cordón umbilical (CB, figura 2.A) o sangre periférica movilizada (mPB, figura 2.B). Barras negras: células CD34+CD7+; barras grises: células CD34-CD7+. (a), (b), (c): número de células observadas cuando se añaden los complementos de 0-3 días de cultivo (a), 0-7 días de cultivo (b) o 4-7 días de cultivo (c).

Figura 3: La expresión de Bcl11b se analizó en células vivas después de 7 días de cultivo obtenidas a partir de células CD34+ de sangre de cordón (CB) o sangre periférica movilizada (mPB) cultivadas en presencia (barras grises) o ausencia (barras negras) de TNF-alfa.

Figura 4: Efecto combinado de TNF-alfa y el ligando DL4 de Notch sobre el número de células CD7+ obtenidas el día 7 a partir de células de sangre de cordón umbilical CD34+ (CB, barras negras, izquierda) o sangre periférica movilizada (mPB, barras grises, derecha). (+/- significa presencia o ausencia de DL4 o TNF-alfa).

Figura 5: Frecuencia de células mieloides al día 7 obtenidas a partir de células CD34+ de sangre de cordón umbilical (CB) o sangre periférica movilizada (mPB) en presencia (barras grises) o no (barras negras) de TNF-alfa (Media \pm SEM).

Figura 6: Número total de células CD7+ obtenido del día 3 al día 7 en un ensayo de respuesta a la dosis de TNF-alfa, comenzando con células CD34+ de sangre de cordón umbilical (CB, figura 6.A) o sangre periférica movilizada (mPB, figura 6.B).

Figura 7: Proporción de células CD34-CD7+ (barras grises) frente a células CD34+CD7+ (barras negras) en un ensayo de respuesta a la dosis de TNF-alfa que comienza con células CD34+ de sangre de cordón umbilical (CB, figura 7.A) o sangre periférica movilizada (mPB, figura 7.B).

Figura 8: Proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular. A. CB: células diferenciadas de sangre de cordón umbilical; B. células diferenciadas de células de sangre periférica movilizadas. NC: no complementado; TNF-alfa: cultivado en presencia de TNF-alfa (20 ng/ml); SR1: cultivos en presencia de SR1 (30 ng/ml).

Figura 9: porcentaje (A) y número total (B) de células CD5+CD7+ cultivadas a partir de células CD34+ de sangre de cordón umbilical en presencia de TNF-alfa y/o SR1 a varias concentraciones, después de 7 días de cultivo.

Ejemplos:

Ejemplo 1 - Material y métodos

Células humanas

Las muestras de sangre del cordón umbilical no aptas para el almacenamiento se usaron con fines de investigación, previo consentimiento informado de la madre del niño. Se recogieron muestras de sangre periférica movilizada (mPB) de donantes sanos después de la movilización de G-CSF. Las muestras se enriquecieron directamente en células CD34+. El consentimiento informado fue otorgado por cada donante (Departamento de Bioterapia, Hospital Necker, París).

Exposición de células progenitoras CD34+ al ligando DL-4 de Notch

Se cultivaron células CD34+ de CB humano o muestras de sangre periférica movilizada en placas de 24 pocillos o placas de 6 pocillos que habían sido recubiertas con fibronectina humana recombinante (RetroNectina®, Clontech/Takara) y DL-4 (5 μ g/ml, PX'Therapeutics, Grenoble, Francia). El recubrimiento se realizó durante 2 h a 37 °C, los pocillos recubiertos con DL-4 se bloquearon luego con albúmina de suero bovino al 2 % (BSA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 minutos a 37 °C y se lavaron con PBS. Los cultivos se iniciaron a

- una concentración de 2×10^4 células/pocillo o 1×10^5 células/pocillo (para placas de 24 y 6 pocillos respectivamente) en medio α -MEM (Gibco, life Technology), suplementado con NaHCO_3 (7,5 %) (Gibco, life Technology) y suero fetal bovino definido al 20 % (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, Francia) y las citocinas humanas recombinantes interleucina-7 (IL-7), ligando Flt3 (Flt-3), factor de células madre (SCF) y trombopoyetina (TPO) (todas a 100 ng/ml y todos adquiridos de PeproTech Inc, Rocky Hill, NJ) con o sin $\text{TNF-}\alpha$ (R&D Systems, EE. UU.). Después de 3 días de cultivo, la mitad de las células se reemplazó por medio nuevo. Las células cultivadas se analizaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) después de 3 y 7 días de cultivo en DL-4 respectivamente para excluir las células mieloides CD34-/CD7- de los análisis posteriores.
- 5 Ensayo de diferenciación *in vitro* de células T en células OP9/DL1
- El potencial linfóide T de las células CB CD34+ nativas y los progenitores de células T inducidos por $\text{TNF-}\alpha$ generados por la exposición a DL-4 se evaluó en cocultivos OP9/DL-1, como se describió previamente (Six y otros, Blood Cells Mol Dis. 2011 15 de junio; 47 (1): 72-8 y Seis J Exp Med. 2007 24 de diciembre; 204 (13): 3085-93).
- 15 Reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas en tiempo real mediante el uso de la matriz RT2 Profiler
- Las células CD7+ se clasificaron en Atrial después de 7 días de cultivo. El ARN total de las fracciones de células clasificadas del día 3 y el día 7 se aisló con el Rneasy Micro Kit (Qiagen, Courtaboeuf, Francia). Las matrices de PCR de RT2 Profiler se realizaron siguiendo el protocolo detallado en el Manual de matrices de PCR de RT2 Profiler (SA Biosciences, Frederick MD).
- 20 Análisis de citometría de flujo y clasificación de células
- 25 Los anticuerpos monoclonales contra CD34 (AC136), CD3 (BW264/56), CD45 (5B1) humano se adquirieron de Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Alemania), y CD4 (SK4), CD7 (M-T701), CD25 (M-A251), 7-aminoactinomicina D (7AAD) eran de BD Biosciences (San José, CA). El CD8 antihumano (RPAT8) era de Sony Biotechnology (San José, EE. UU.). El anticuerpo Ctip2 antihumano (Bcl11b) era de Abcam (Cambridge, Reino Unido).
- 30 Las células humanas se tiñeron y analizaron mediante el uso de un analizador Gallios (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania). Las células de los receptores xenogénicos se analizaron en un aparato MACSQuant® (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania). Los datos se analizaron mediante el uso del software FlowJo (Treestar, Ashland, OR) después de seleccionar células 7AAD negativas viables. Los subconjuntos de células se clasificaron en un sistema ARIA II.
- 35 Ensayos de proliferación celular
- Para los ensayos de proliferación celular, las células CD34+ de CB y mPB se marcaron mediante el uso de CellTrace™ Kit CFSE (Life Technologies, Carlsbad, CA) previo al cultivo con DL-4 y $\text{TNF-}\alpha$ (Life Technologies). La intensidad de tinción de las células se midió antes del cultivo cada día desde el día 3 hasta el día 7. Las células positivas para CFSE se analizaron en un citómetro Gallios (Beckman Coulter).
- 40 Ensayos de ciclo celular
- 45 Para el análisis del ciclo celular, las células se tiñeron con Hoechst33342 (tecnología Life) y Ki67-PC5 (BD Bioscience) después de fijarse con el reactivo fijador del kit PerFix-nc (Beckman Coulter) a temperatura ambiente durante 15 minutos y se agregó el reactivo permeabilizante. Los datos se analizaron mediante el uso del software FlowJo (versión 10.2, Treestar, Ashland, OR) después de seleccionar células 7AAD negativas viables.
- 50 Transferencia adoptiva de progenitores de células T generados *in vitro* derivados de HSPC adultas en neonatos NSG
- Todos los experimentos y procedimientos con animales se realizaron de conformidad con las normas del Ministerio de Agricultura francés sobre experimentos con animales. La inyección de los progenitores de células T humanas generados *in vitro* en ratones NSG ha sido aprobado por el Ministerio de Educación Superior e Investigación (APAFIS 2101-2015090411495178v4).
- 55 Los ratones NSG (NOD-Scid(IL2Rg^{nu/nu})) (obtenidos del Laboratorio Jackson, Bar Harbor, ME, <http://www.jax.org>) se mantuvieron en una instalación libre de patógenos. La progenie derivada de mPB CD34+ HSPC en cultivos DL-4 de 7 días con o sin $\text{TNF-}\alpha$ (3×10^5 o 1×10^6) se inyectó por vía intrahepática en neonatos NSG (0-4 días de edad). A los ratones de control se les inyectó 3×10^5 células mPB CD34+ no cultivadas o 100 μl de PBS.
- 60 Los niveles promedio de injerto de ratones NSG se determinaron de 4 a 12 semanas después del trasplante. El análisis de citometría de flujo se realizó en células recién recolectadas de fémur, timo, sangre periférica y bazo. Las células se trataron con tampón de lisis de glóbulos rojos 1x (Biolegend, EE. UU.) y se lavaron antes de tefirlas con anticuerpos.
- 65

Análisis de la diversidad de receptores de células T

El análisis de reordenamiento del gen TCR se realizó por duplicado y en los dos subconjuntos purificados independientemente (se muestra el promedio).

La cuantificación de TCR- δ (D δ 2-D δ 3, D δ 2-J δ 1 y D δ 3-J δ 1) se realizó con los conjuntos de cebadores y sondas enumerados.

Se usaron los siguientes para los reordenamientos D δ 2-D δ 3:

D δ 2, 5'-CAAGGAAAGGGAAAAAGGAAGAA-3' (SEQ ID N° 9);
D δ 3, 5'-TTGCCCTGCAGTTTTGTAC-3' (SEQ ID N° 10);
y sonda D'3, 5'-ATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCT-3' (SEQ ID N° 11).

Se usaron los siguientes cebadores y sonda para los reordenamientos D δ 2-J δ 1:

D δ 2, 5'-AGCGGGTGGTGATGGCAAAGT-3' (SEQ ID N° 12);
J δ 1, 5'-TTAGATGGAGGATGCCTTAACCTTA-3' (SEQ ID N° 13);
y sonda J δ 1, 5'-CCCGTGTGACTGTGGAACCAAGTAAGTAACTC-3' (SEQ ID N° 14)

Se usaron los siguientes para los reordenamientos de D δ 3-1 δ 1:

D δ 3, 5'-GACTTGGAGAAAACATCTGGTTCTG-3' (SEQ ID N° 15);
Cebador J δ 1 y sonda J δ 1.

El análisis de los reordenamientos de TCR por PCR fluorescente multiplex se realizó mediante la separación de productos de PCR de soporte único marcados con fluorocromo en un polímero de secuenciación capilar y se detectó mediante escaneo láser automatizado.

Ensayos de apoptosis

Las células se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en tampón de unión a una concentración de 1 millón de células/ml. Después de añadir 5 ul de anexina V-PE (BD Bioscience) y 2 ul de 7AAD, las células se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. Subsecuentemente, las células se lavaron con 500 ul de tampón de unión y se resuspendieron en 100 ul de tampón de unión para analizarlas dentro de 1 hora.

Ejemplo 2: Mejora en la expansión y diferenciación de precursores de células T

Cuando las células CD34+ se cultivan con DL-4, la figura 1 muestra que la adición de TNF-alfa al medio de cultivo celular permite multiplicar por 10 el número total de células recuperadas en el día 7 en comparación con el cultivo sin TNF-alfa, ya sea al comenzar con células CD34+ provenientes de sangre de cordón umbilical (figura 1.A) o de PB (figura 1.B).

La figura 2 muestra que la adición de TNF-alfa al medio de cultivo celular permite multiplicar de 20 a 40 veces el número de células CD7+, ya sea partiendo de células CD34+ extraídas de sangre de cordón umbilical (figura 2.A) o de PB (figura 2.B). La mejora es especialmente alta para la población de células CD34-CD7+.

Ejemplo 3: Análisis de los marcadores de superficie de los progenitores de células T

Los marcadores de superficie presentes en la superficie de las células obtenidas después de 7 días de cultivo se determinaron por citometría de flujo.

	Sangre de cordón				mPB			
	CD34+ CD7+	CD34- CD7+	CD34+ CD7-	CD34- CD7-	CD34+ CD7+	CD34- CD7+	CD34+ CD7-	CD34- CD7-
-TNF α	29,5	38,9	15,4	16,3	15,1	11,3	32,9	40,7
+TNF α	0,39	95,6	0,76	3,22	0,68	90,1	2,75	6,49

	Sangre de cordón				mPB			
	CD5+ CD7+	CD5- CD7+	CD5+ CD7-	CD5- CD7-	CD5+ CD7+	CD5- CD7+	CD5+ CD7-	CD5- CD7-
-TNF α	1,56	66,8	5,10 ⁻³	31,6	0,069	26,4	0,027	73,5
+TNF α	0,66	95,4	0,012	3,97	3,01	87,7	0,24	9,00

Estas tablas muestran que la adición de TNF-alfa conduce a un aumento en la proporción de células CD7+, sin aumentar realmente la proporción de células CD5+.

Después de 7 días de cultivo, las HSPC se diferencian en precursores de células T CD34-CD7+CD5-.

Los marcadores de superficie presentes en la superficie de las células obtenidas después de 10 días de cultivo también se determinaron por citometría de flujo.

No se encontró expresión de CD1a (datos no mostrados).

Se estudió la cinética de modificación de los marcadores de superficie y se encontró que la presencia de TNF-alfa en el medio de cultivo aumenta la proporción de CD7+ desde el día 4 hasta el día 7 (datos no mostrados).

Ejemplo 4: reordenamiento de los receptores de células T

Los precursores de células T DL-4 no muestran ningún signo de reordenamiento de TCR con o sin TNF-alfa o SR1 después de 7 días de cultivo (datos no mostrados).

Se realizó un análisis específico de reordenamiento:

Resultados de los reordenamientos TCRdelta

Detección de reordenamientos D δ 2-D δ 3 en CB-NC y CB-SR1. No se detectaron otros reordenamientos de TCRdelta. Los resultados estuvieron de acuerdo con la cuantificación RQ-PCR

Resultados de los reordenamientos TCRgamma

No se detectaron reordenamientos de TCRgamma.

Resultados de los reordenamientos de TCRbeta

No se detectaron reordenamientos de TCRbeta.

Ejemplo 5: Compromiso-T de los precursores de células T inducidos con TNF α

Bcl11b es un factor transcripcional importante que se activa únicamente durante el compromiso de las células T y es absolutamente necesario para la diferenciación de las células T.

La tinción intracelular en precursores de células T cultivadas con TNF-alfa mostró una expresión positiva de Bcl11b tanto para las células CD34+ emitidas a partir de la sangre del cordón umbilical como para mPB. La figura 3 muestra que el TNF-alfa aumenta la proporción de células totales que expresan el factor de transcripción Bcl11b. Cuando se cultivó con TNF-alfa, aumentó la proporción de células que expresan Bcl11b.

Ejemplo 6: Diferenciación sobre otros linajes

Se evaluó la presencia de otros marcadores de superficie celular (CD14 y CD33) específicos de otros linajes.

La figura 5 muestra que el cultivo en presencia de TNF-alfa hizo que dichas células no fueran detectables, mientras que su proporción es inferior al 22 % cuando las células CD34+ se cultivan sin TNF-alfa.

Ejemplo 7: El TNF-alfa reduce la apoptosis de las células

Se estudiaron marcadores de apoptosis (7AAD y anexina 5).

Células apoptóticas 7AAD+/- anexinaV+ (%)	CB	mPB
-TNF α	1,66	10,56
+TNF α	0,28	0,96

Esta tabla muestra que el cultivo en presencia de TNF-alfa reduce la presencia de los marcadores de apoptosis. Esto es particularmente evidente para mPB.

Ejemplo 8: Ensayo de respuesta a la dosis de TNF-alfa

Se usaron varias dosis de TNF-alfa.

La figura 6 muestra que el TNF-alfa puede aumentar el número de células CD7+ durante el cultivo, cuando la concentración es superior a 10 ng/ml, ya sea para células CB (figura 6.A) o células mPB (figura 6.B).

La cinética de la respuesta a la dosis mostró que TNF-alfa aumenta la diferenciación de células T después de solo 4 días de cultivo en DL-4. No hubo diferencia entre la concentración de 10, 50 y 100 ng/ml (no mostrado).

Para determinar el umbral de concentración efectiva, se realizó un análisis de concentraciones más bajas (0,01-10 ng/ml).

Se encontró que el efecto de TNF-alfa sobre CB y mPB sobre la diferenciación de células T (porcentaje de células CD34-CD7+) depende de la concentración a baja concentración (Figura 7). El número total de precursores de células T CD7+ no fue diferente de 5 ng/ml a 100 ng/ml.

Ejemplo 9: Análisis de proliferación durante el cultivo

Se encontró que TNF-alfa aumenta la proliferación de precursores de células T CD34+CD7+ desde el día 3 en cultivo DL-4, en comparación con condiciones de cultivo sin TNF-alfa (datos no mostrados).

Ejemplo 10: sinergia entre TNF-alfa y el ligando de Notch

La figura 4 muestra que sin DL-4, tanto CB como mPB no lograron diferenciarse en precursores de células T CD7+. Incluso la complementación del medio con TNF-alfa no pudo rescatarlo.

Cuando están presentes tanto el TNF-alfa como el ligando de Notch, el efecto observado es muy elevado. Por lo tanto, parece que existe una sinergia entre estos dos compuestos y que el efecto de TNF-alfa en la diferenciación de células T es probablemente dependiente de Notch.

Ejemplo 11: La adición de TNF-alfa aumenta la proliferación de progenitores CD7+

Después de 7 días de cultivo en presencia de TNF-alfa, se clasificaron los subconjuntos CD34+CD7-, CD34+CD7+ y CD34-CD7+, se tiñeron con CFSE (carboxifluoresceína succinimidil éster) y se siguió la dilución de CFSE (marcador sustituto de la proliferación celular) del día 8 al 10.

Solo las células CD34+CD7+ y CD34-CD7+ muestran una mayor proliferación cuando se cultivan con TNF-alfa (datos no mostrados).

Ejemplo 12: Análisis del ciclo celular

Se realizó el análisis del ciclo celular. Se observó que se liberaron más células de la fase G0 en presencia de TNF-alfa tanto en progenitores CD7+ derivados de CB como de mPB (Figura 8).

Ejemplo 13: Combinación de SR1 y TNFa

SR1 acelera la diferenciación de células T como lo demuestra la presencia de células CD5+ CD7+ en el día 7. El número de células CD5+CD7+ aumenta por la presencia tanto de TNF-alfa como de SR1 (Figura 9).

Ejemplo 14: datos in vivo

Los precursores de células T inducidos en presencia de TNF-alfa pueden acelerar en gran medida la reconstitución del linaje T *in vivo*.

De hecho, 4 semanas después del trasplante, los ratones receptores inyectados con precursores de células T mPB producidos en presencia de TNF-alfa tienen un timo más grande que los ratones inyectados con precursores de células T mPB producidos sin TNF-alfa. Los precursores de células T inducidos en presencia de TNF-alfa pueden diferenciarse a células T TCRαβ activadas en 4 semanas *in vivo*. (Datos no mostrados)

En resumen, la adición de TNF-alfa desde el día 0 en el sistema de cultivo DL-4 conduce a un aumento de progenitores de células T (definido por la expresión superficial de CD7) de 40 veces para mPB HSPC y 20 veces para CB HSPC en el día 7.

Los progenitores de células T CD7+ generados a partir de CB y mPB eran en su mayoría CD34- y CD1a negativos. Las células también eran en su mayoría CD5 negativas.

- 5 Expresaron Bcl11b, que es un importante giro fino molecular para el compromiso T y una mayor diferenciación de células T.

No mostraron ningún signo de reordenamiento del receptor de células T.

- 10 Su fenotipo y características moleculares fueron similares a las de los progenitores de células T CD34-CD7+ obtenidos sin TNF-alfa.

- 15 En cuanto a los mecanismos implicados en la acción del TNF-alfa, el TNF-alfa disminuye la expresión de marcadores de apoptosis y aumenta la proliferación celular durante el cultivo. También inhibe la producción de células mieloides.

- 20 El uso de TNF-alfa en el sistema de cultivo de DL-4 aumenta en gran medida las cantidades de progenitores de células T producidas a partir de HSPC de sangre de cordón umbilical y de adultos humanos. Por lo tanto, puede superar la dificultad de obtener grandes cantidades de progenitores de células T a partir de HSPC adultas. También puede disminuir el número de HSPC iniciales requeridas en futuros ensayos clínicos y la cantidad de grado GMP y otros reactivos requeridos, disminuyendo así los costos de producción de estos progenitores de células T.

Listado de secuencias

- 25 <110> ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS FONDATION IMAGINE - INSTITUT DES MALADIES GÉNÉTIQUES UNIVERSITE PARIS DESCARTES INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)

- 30 <120> MÉTODO PARA GENERAR PROGENITORES DE CÉLULAS T

<130> BRV 126 - WO

<150> EP 17305161.6

<151> 2017-02-13

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

- 35 <210> 1

<211> 723

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

- 40 <223> Delta -1 humana (fracción soluble: 1-536) G502 puede ser R

<400> 1

ES 2 931 530 T3

	Met	Gly	Ser	Arg	Cys	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	
	1				5					10					15		
5	Cys	Gln	Val	Trp	Ser	Ser	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Lys	Leu	Gln	Glu	Phe	
				20					25					30			
10	Val	Asn	Lys	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Asn	Arg	Asn	Cys	Cys	Arg	Gly	Gly	
			35					40					45				
15	Ala	Gly	Pro	Pro	Pro	Cys	Ala	Cys	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Val	Cys	Leu	
		50					55					60					
20	Lys	His	Tyr	Gln	Ala	Ser	Val	Ser	Pro	Glu	Pro	Pro	Cys	Thr	Tyr	Gly	
	65					70				75						80	
25	Ser	Ala	Val	Thr	Pro	Val	Leu	Gly	Val	Asp	Ser	Phe	Ser	Leu	Pro	Asp	
					85					90					95		
30	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Ser	Ala	Phe	Ser	Asn	Pro	Ile	Arg	Phe	Pro	Phe	
				100					105					110			
35	Gly	Phe	Thr	Trp	Pro	Gly	Thr	Phe	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Ala	Leu	His	
			115					120					125				
40	Thr	Asp	Ser	Pro	Asp	Asp	Leu	Ala	Thr	Glu	Asn	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile	
		130					135					140					

ES 2 931 530 T3

	Ser	Arg	Leu	Ala	Thr	Gln	Arg	His	Leu	Thr	Val	Gly	Glu	Glu	Trp	Ser	145	150	155	160
5	Gln	Asp	Leu	His	Ser	Ser	Gly	Arg	Thr	Asp	Leu	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Arg	165	170	175	
10	Phe	Val	Cys	Asp	Glu	His	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Gly	Cys	Ser	Val	Phe	Cys	180	185	190	
	Arg	Pro	Arg	Asp	Asp	Ala	Phe	Gly	His	Phe	Thr	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	195	200	205	
15	Glu	Lys	Val	Cys	Asn	Pro	Gly	Trp	Lys	Gly	Pro	Tyr	Cys	Thr	Glu	Pro	210	215	220	
20	Ile	Cys	Leu	Pro	Gly	Cys	Asp	Glu	Gln	His	Gly	Phe	Cys	Asp	Lys	Pro	225	230	235	240
25	Gly	Glu	Cys	Lys	Cys	Arg	Val	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Tyr	Cys	Asp	Glu	245	250	255	
	Cys	Ile	Arg	Tyr	Pro	Gly	Cys	Leu	His	Gly	Thr	Cys	Gln	Gln	Pro	Trp	260	265	270	
30	Gln	Cys	Asn	Cys	Gln	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asn	Gln	Asp	275	280	285	
35	Leu	Asn	Tyr	Cys	Thr	His	His	Lys	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys	290	295	300	
	Thr	Asn	Thr	Gly	Gln	Gly	Ser	Tyr	Thr	Cys	Ser	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	305	310	315	320
40	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys	Glu	Leu	Gly	Ile	Asp	Glu	Cys	Asp	Pro	Ser	Pro	325	330	335	
45	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Thr	Asp	Leu	Glu	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	340	345	350	
50	Thr	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Tyr	Gly	Lys	Ile	Cys	Glu	Leu	Ser	Ala	Met	355	360	365	
	Thr	Cys	Ala	Asp	Gly	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Arg	Cys	Ser	Asp	Ser	370	375	380	
55	Pro	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Cys	Arg	Cys	Pro	Val	Gly	Tyr	Ser	Gly	Phe				

ES 2 931 530 T3

	385					390						395				400
5	Asn	Cys	Glu	Lys	Lys	Ile	Asp	Tyr	Cys	Ser	Ser	Ser	Pro	Cys	Ser	Asn
					405					410					415	
	Gly	Ala	Lys	Cys	Val	Asp	Leu	Gly	Asp	Ala	Tyr	Leu	Cys	Arg	Cys	Gln
				420					425					430		
10	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	His	Cys	Asp	Asp	Asn	Val	Asp	Asp	Cys	Ala
			435					440					445			
15	Ser	Ser	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Arg	Asp	Gly	Val	Asn	Asp
		450					455					460				
	Phe	Ser	Cys	Thr	Cys	Pro	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Arg	Asn	Cys	Ser	Ala
20	465					470					475					480
	Pro	Val	Ser	Arg	Cys	Glu	His	Ala	Pro	Cys	His	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys
					485					490					495	
25	His	Glu	Arg	Gly	His	Gly	Tyr	Val	Cys	Glu	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Gly
				500					505					510		
	Gly	Pro	Asn	Cys	Gln	Phe	Leu	Leu	Pro	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala
30			515					520					525			
	Val	Val	Asp	Leu	Thr	Glu	Lys	Leu	Glu	Gly	Gln	Gly	Gly	Pro	Phe	Pro
35		530					535					540				
	Trp	Val	Ala	Val	Cys	Ala	Gly	Val	Ile	Leu	Val	Leu	Met	Leu	Leu	Leu
	545					550					555					560
40	Gly	Cys	Ala	Ala	Val	Val	Val	Cys	Val	Arg	Leu	Arg	Leu	Gln	Lys	His
					565					570					575	
	Arg	Pro	Pro	Ala	Asp	Pro	Cys	Arg	Gly	Glu	Thr	Glu	Thr	Met	Asn	Asn
45				580					585					590		
	Leu	Ala	Asn	Cys	Gln	Arg	Glu	Lys	Asp	Ile	Ser	Val	Ser	Ile	Ile	Gly
			595					600					605			
50	Ala	Thr	Gln	Ile	Lys	Asn	Thr	Asn	Lys	Lys	Ala	Asp	Phe	His	Gly	Asp
		610					615					620				
55	His	Ser	Ala	Asp	Lys	Asn	Gly	Phe	Lys	Ala	Arg	Tyr	Pro	Ala	Val	Asp
	625					630					635					640

ES 2 931 530 T3

	Tyr Asn Leu Val Gln Asp Leu Lys Gly Asp Asp Thr Ala Val Arg Asp	645	650	655
5	Ala His Ser Lys Arg Asp Thr Lys Cys Gln Pro Gln Gly Ser Ser Gly	660	665	670
10	Glu Glu Lys Gly Thr Pro Thr Thr Leu Arg Gly Gly Glu Ala Ser Glu	675	680	685
15	Arg Lys Arg Pro Asp Ser Gly Cys Ser Thr Ser Lys Asp Thr Lys Tyr	690	695	700
20	Gln Ser Val Tyr Val Ile Ser Glu Glu Lys Asp Glu Cys Val Ile Ala	705	710	715
25	Thr Glu Val			
30	<210> 2			
	<211> 724			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
35	<223> Proteína delta-4 humana (fracción soluble 1-526)			
	<400> 2			
40	Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu	1	5	10
45	Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu	20	25	30
50	Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg	35	40	45
55	Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His	50	55	60
60	Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser	65	70	75
65	Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser	85	90	95
70	Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro	100	105	110
75	Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp			

ES 2 931 530 T3

	115					120					125					
5	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	Leu	Ile	Ser	Lys	Ile	Ala
	130						135					140				
	Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Gln	Asn	Trp	Leu	Leu	Asp	Glu	Gln
	145					150					155					160
10	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys	Ser
					165					170					175	
15	Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Asn	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Asn
				180					185					190		
	Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Val	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Cys
20			195					200					205			
	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Gln	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Ser
	210						215					220				
25	Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys	Pro	Ala	Glu	Cys	Leu
	225					230					235					240
	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	His
30					245					250					255	
	Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Cys
35				260					265					270		
	Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr	Cys
			275					280					285			
40	Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser	Gly
	290						295					300				
	Gln	Arg	Ser	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Val	Asp
45	305					310					315					320
	Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Cys	Asp	Ser	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly
					325					330					335	
50	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asp	Gly	Tyr	His	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro
				340					345					350		
55	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Leu	His	Cys	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Asp
			355					360					365			

ES 2 931 530 T3

	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly	Ala	
	370						375					380					
5	Asn	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu	
	385					390					395					400	
	Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Gln	
10				405						410					415		
	Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Met	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	
				420					425					430			
15	Thr	Gly	Thr	Tyr	Cys	Glu	Leu	His	Val	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Asn	Pro	
			435					440						445			
	Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Met	Cys	
20		450					455					460					
	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Thr	Ser	
	465					470					475					480	
25	Ile	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Arg	Ala	Thr	Cys	Tyr	
				485						490					495		
	Thr	Asp	Leu	Ser	Thr	Asp	Thr	Phe	Val	Cys	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly	Phe	
30				500					505					510			
	Val	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Phe	Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Phe	Pro	
35			515					520					525				
	Trp	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Leu	
	530						535					540					
40	Leu	Gly	Met	Val	Ala	Val	Ala	Val	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro	
	545					550					555					560	
	Asp	Asp	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	Gln	Lys	
45					565					570					575		
	Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys	Lys	
				580					585					590			
50	Glu	Leu	Glu	Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Cys	Gly	Lys	Gln	
		595						600					605				
	Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Arg	
55		610					615					620					

ES 2 931 530 T3

	Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu	
	625 630 635 640	
5	Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser	
	645 650 655	
10	Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile	
	660 665 670	
15	Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val Thr Pro Arg	
	675 680 685	
20	Leu Asp Leu Pro Ser Ala Leu Phe Thr Leu His Pro Gly Trp Asp Val	
	690 695 700	
25	Phe His Met Gln Arg Ala Ala Leu Arg Arg Arg Arg Glu Trp Gln Glu	
	705 710 715 720	
30	Pro Asp Arg Leu	
	<210> 3	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Patrón RGDS	
	<400> 3	
	Arg Gly Asp Ser	
	1	
35	<210> 4	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> dominio de unión a la heparina XBBXB; B = aminoácido básico; X = aminoácido hidropático	
	<220>	
40	<221> misc_característica	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural	
	<220>	
	<221> misc_característica	
45	<222> (4)..(4)	
	<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural	
	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (6)..(6)	
50	<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural	
	<400> 4	
	Xaa Asx Asx Xaa Asx Xaa	
	1 5	
55	<210> 5	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> dominio de unión a la heparina XBBBXXB; B = aminoácido básico; X = aminoácido hidropático	
60	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural	
	<220>	
65	<221> misc_característica	
	<222> (5)..(6)	

[illegible]

ES 2 931 530 T3

	Met	Ala	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Ala	Ser	Gly	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	
	1				5					10					15		
5	Val	Ala	Leu	Trp	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	
				20					25					30			
	Gln	Leu	Gln	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu	Arg	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg	
10			35					40					45				
	Pro	Cys	Glu	Pro	Gly	Cys	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Val	Cys	Leu	Lys	His	
		50					55					60					
15	Phe	Gln	Ala	Val	Val	Ser	Pro	Gly	Pro	Cys	Thr	Phe	Gly	Thr	Val	Ser	
	65					70				75						80	
	Thr	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Asn	Ser	Phe	Ala	Val	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	
20					85					90					95		
	Gly	Gly	Gly	Arg	Asn	Pro	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Thr	Trp	Pro	
25				100					105					110			
	Gly	Thr	Phe	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Ala	Trp	His	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	
			115					120					125				
30	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	Leu	Ile	Ser	Lys	Ile	Ala	
		130					135					140					
	Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Gln	Asn	Trp	Leu	Leu	Asp	Glu	Gln	
35		145				150				155						160	
	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys	Ser	
				165					170						175		
40	Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Asn	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Asn	
				180					185					190			
45	Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Val	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Cys	
			195					200					205				
	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Gln	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Ser	
		210					215					220					

ES 2 931 530 T3

	Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys	Pro	Ala	Glu	Cys	Leu
	225					230					235					240
5	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	His
					245					250					255	
	Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Cys
10				260					265					270		
	Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr	Cys
			275					280					285			
15	Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser	Gly
		290					295					300				
	Gln	Arg	Ser	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Val	Asp
20	305					310					315					320
	Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Cys	Asp	Ser	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly
					325					330					335	
25	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asp	Gly	Tyr	His	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro
				340					345					350		
	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Leu	His	Cys	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Asp
30			355					360					365			
	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly	Ala
35		370					375					380				
	Asn	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu
	385					390					395					400
40	Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Gln
					405					410					415	
	Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Met	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe
45				420					425					430		
	Thr	Gly	Thr	Tyr	Cys	Glu	Leu	His	Val	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Asn	Pro
			435					440					445			
50	Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Met	Cys
		450					455					460				
	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Thr	Ser
55	465					470					475					480

ES 2 931 530 T3

	Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr	485	490	495
5	Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe	500	505	510
10	Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Thr Met	515	520	525
	Val Arg Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly	530	535	540
15	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	545	550	555
20	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	565	570	575
	Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Met Glu Val His	580	585	590
25	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg	595	600	605
30	Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	610	615	620
35	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu	625	630	635
	Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	645	650	655
40	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	660	665	670
45	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	675	680	685
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met	690	695	700
50	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp	705	710	715
55	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	725	730	735
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	740	745	750
60	Gly Lys			
	<210> 8			
	<211> 157			
	<212> PRT			
65	<213> Secuencia artificial			
	<220>			

ES 2 931 530 T3

<223> TNF-alfa humano soluble

<400> 8

5	Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val	1 5 10 15
10	Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg	20 25 30
15	Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu	35 40 45
20	Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe	50 55 60
25	Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile	65 70 75 80
30	Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala	85 90 95
35	Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys	100 105 110
40	Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys	115 120 125
45	Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe	130 135 140
50	Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu	145 150 155

<210> 9

<211> 23

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para detectar el reordenamiento de TCR

<400> 9

45 caaggaaagg gaaaaaggaa gaa 23

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Cebador para detectar el reordenamiento de TCR

<400> 10

ttgccctgc agttttgta c 21

<210> 11

55 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda para detectar el reordenamiento de TCR

60 <400> 11

atacgcacag tgctacaaaa cctacagaga cct 33

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para detectar el reordenamiento de TCR
 <400> 12
 agcgggtggt gatggcaaag t 21
 <210> 13
 5 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para detectar el reordenamiento de TCR
 10 <400> 13
 ttagatggag gatgccttaa cctta 25
 <210> 14
 <211> 32
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda para detectar el reordenamiento de TCR
 <400> 14
 cccgtgtgac tgtggaacca agtaagtaac tc 32
 20 <210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador para detectar el reordenamiento de TCR
 <400> 15
 gacttgagaa aaacatctgg ttctg 25

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para generar progenitores de células T que tienen el fenotipo CD7+CD34-, que comprende la etapa de cultivar células CD34+ en un medio que comprende TNF-alfa y, opcionalmente, un antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, en particular StemRegenin 1 (SR1), en presencia de un ligando de Notch inmovilizado.
2. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ligando de Notch se inmoviliza en la superficie interna de un recipiente de cultivo o en la superficie de perlas presentes en el medio de cultivo.
3. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el TNF-alfa está presente, en el medio de cultivo, desde el día 0 del cultivo, preferentemente a una concentración mayor o igual a 3 ng/ml, y opcionalmente en donde el antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina está presente, en el medio de cultivo, desde el día 0 del cultivo, preferentemente a una concentración mayor o igual a 10 ng/ml.
4. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células CD34+ se han aislado de un donante adulto.
5. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células se cultivan en presencia de TNF-alfa y opcionalmente SR1 durante a lo máximo 10 días, preferentemente entre 3 y 7 días.
6. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el ligando de Notch es la proteína similar a delta-4.
7. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el ligando de Notch es el dominio soluble del ligando similar a delta-4, fusionado con una región Fc de una proteína IgG, preferentemente una proteína IgG2.
8. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde las células también se exponen a un fragmento de fibronectina, en donde dicho fragmento comprende los patrones RGDS y CS-1 así como también un dominio de unión a heparina, preferentemente en donde el fragmento de fibronectina es retronectina@.
9. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el fragmento de fibronectina se inmoviliza en la superficie interna del recipiente de cultivo o en perlas.
10. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el medio de cultivo también contiene un vector destinado a la transfección o transducción de las células CD34+, durante al menos algún tiempo de exposición de las células CD34+ al ligando de Notch.
11. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el vector destinado a la transfección o transducción de las células CD34+ es un transgén que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR).
12. Un método para obtener progenitores de células T que tienen el fenotipo CD7+CD34-, que comprende las etapas de
 - a. realizar el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y
 - b. purificar los progenitores de células T generados, y
 - c. opcionalmente, acondicionar los progenitores de células T en una bolsa para inyectar a un paciente.
13. Un método *in vitro* para obtener progenitores de células T transformadas que tienen el fenotipo CD7+CD34-, que comprende las etapas de
 - a. cultivar células CD34+ en un medio que comprende TNF-alfa y en presencia de un ligando de Notch inmovilizado, y
 - b. exponer las células a un vector destinado a la transfección o transducción de células CD34+.
14. Un método *in vitro* para obtener progenitores de células T modificadas que tienen el fenotipo CD7+CD34-, que comprende las etapas de
 - a. cultivar células CD34+ en un medio que comprende TNF-alfa y en presencia de un ligando de Notch inmovilizado, y
 - b. exponer las células a un vector o secuencias de ácido nucleico que contengan el elemento apropiado para la edición de genes.

15. Un kit para realizar el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende:
- (i) un medio de recubrimiento que contiene un ligando de Notch y, opcionalmente, un fragmento de fibronectina
 - (ii) un medio adaptado para cultivar células CD34+ y células T
 - (iii) un medio de expansión de progenitores que contiene TNF-alfa, un antagonista del receptor de arilhidrocarburo/dioxina, y preferentemente tres o cuatro citocinas seleccionadas del grupo que consiste en SCF, TPO, Flt3L e IL-7.
- 5

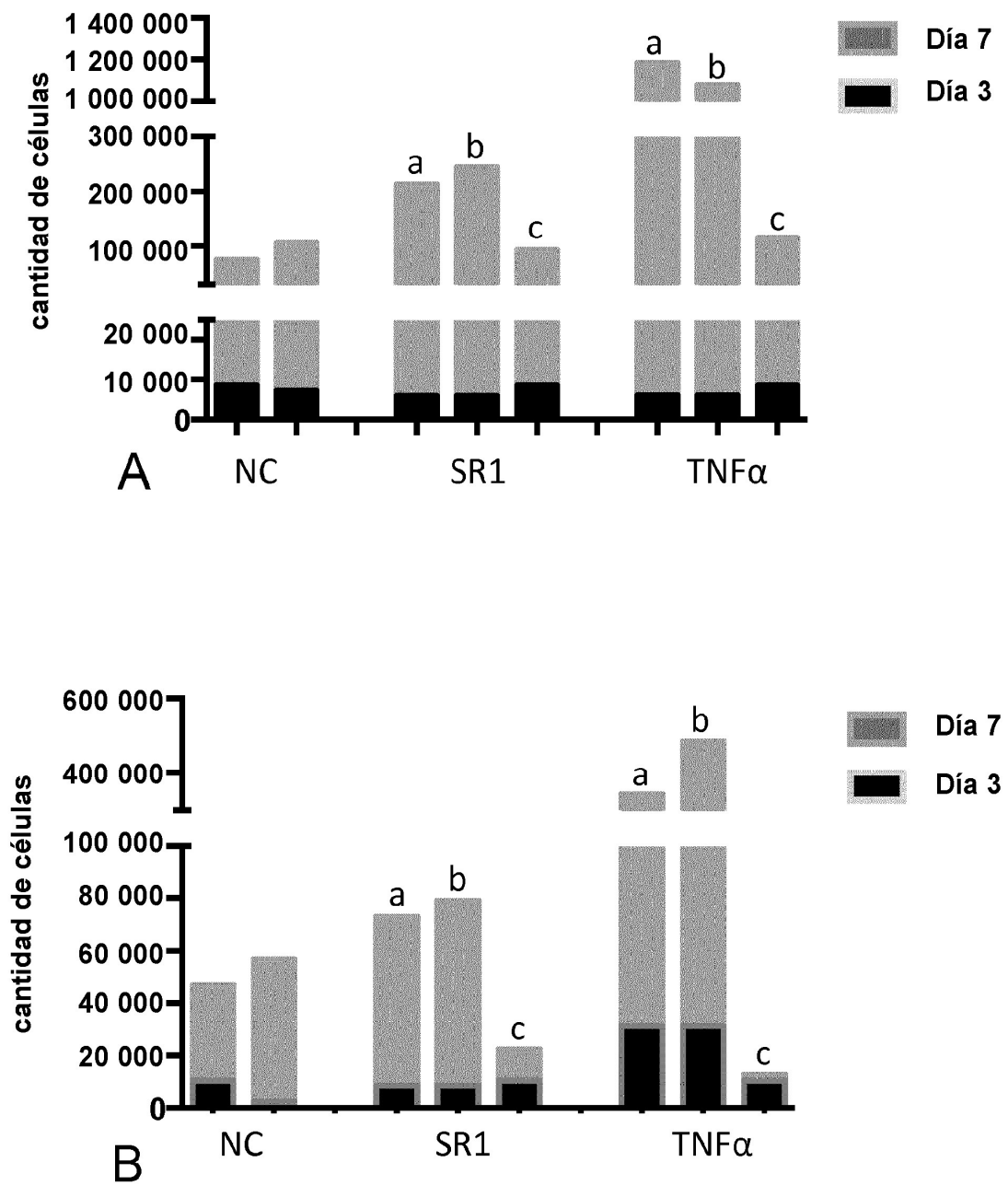


Figura 1

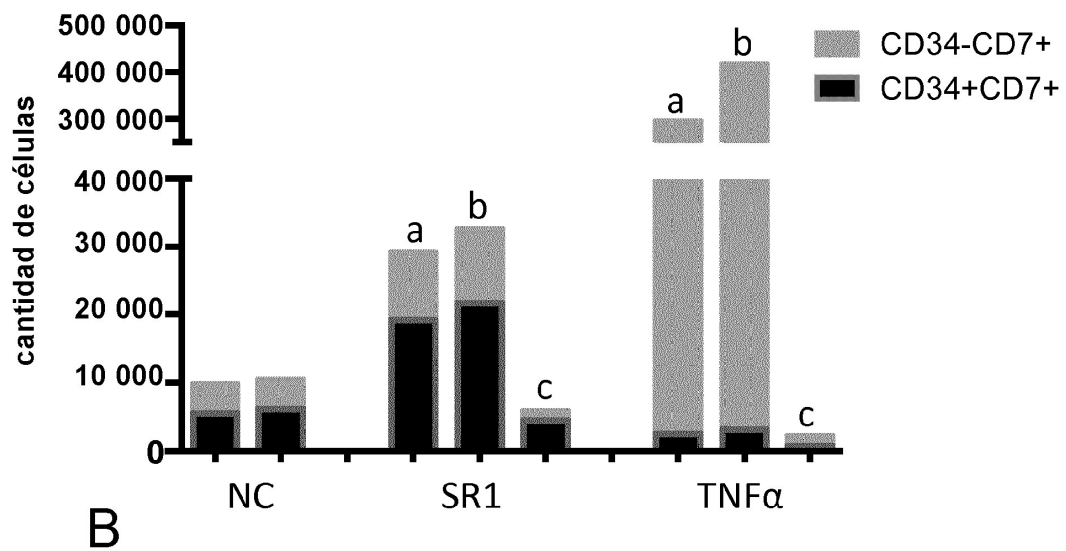
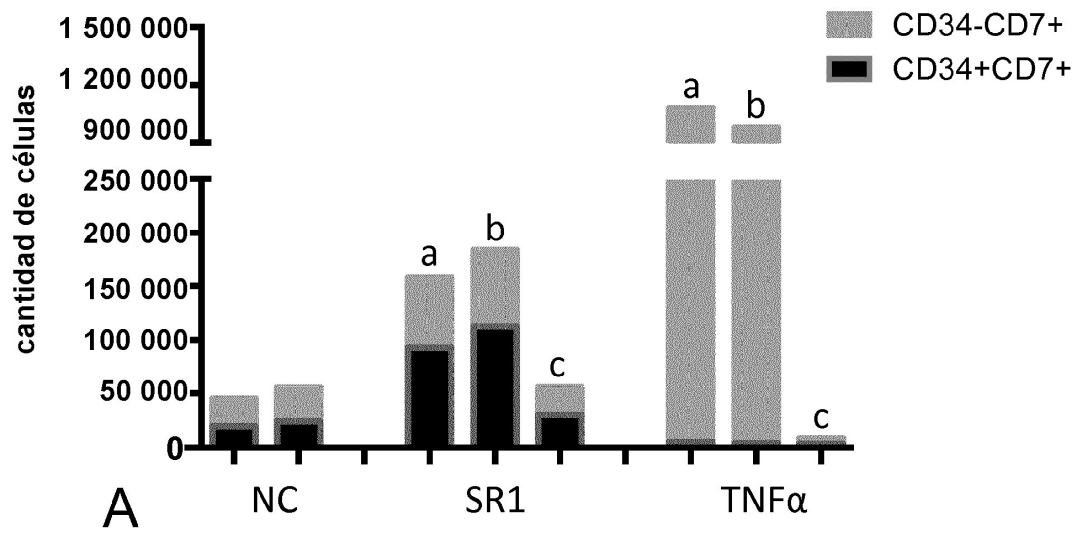


Figura 2

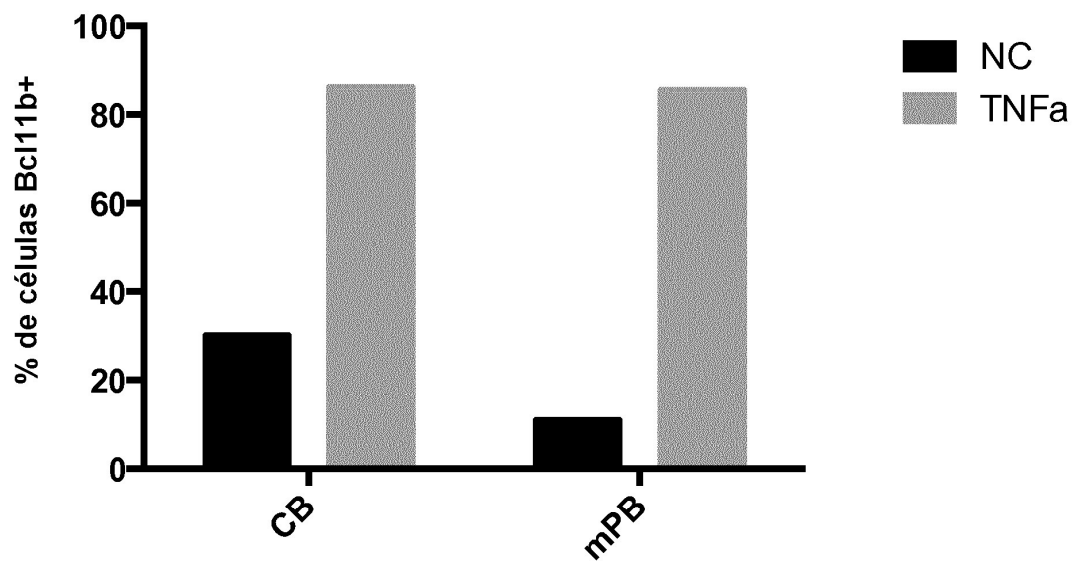


Figura 3

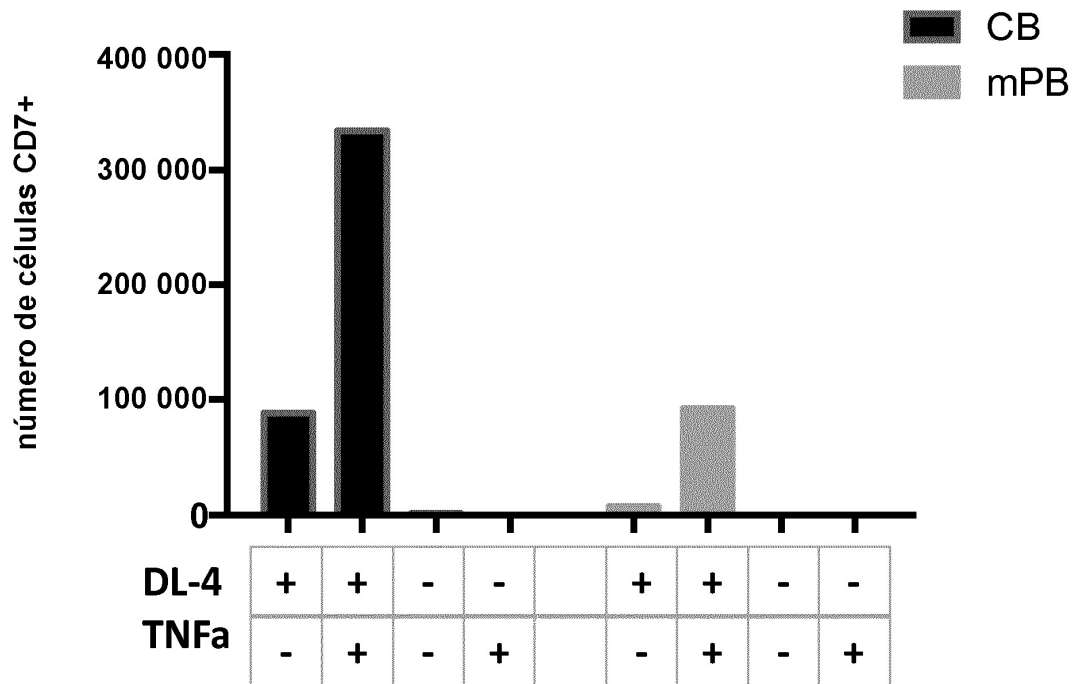


Figura 4

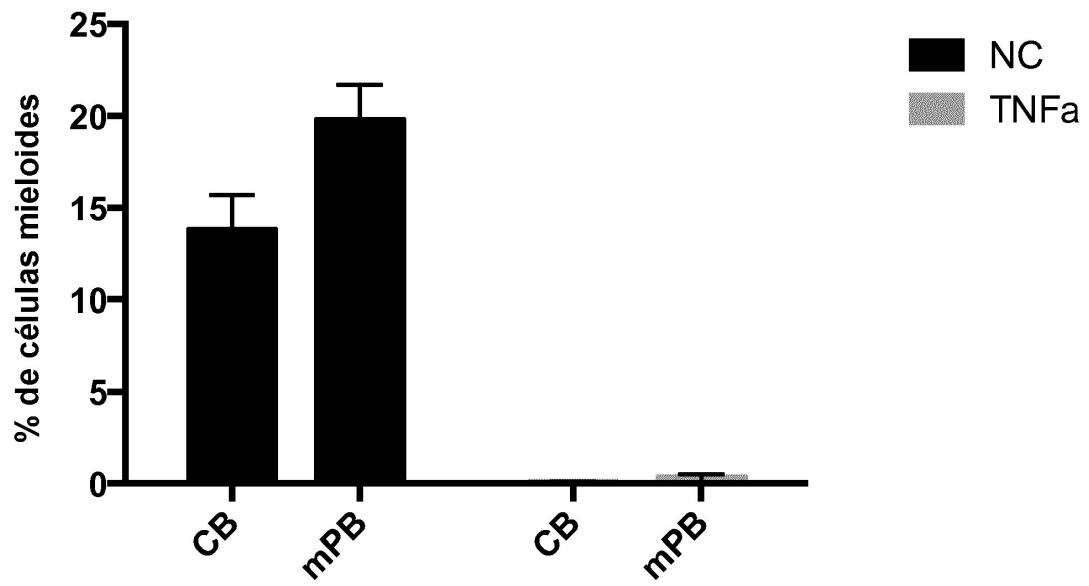


Figura 5

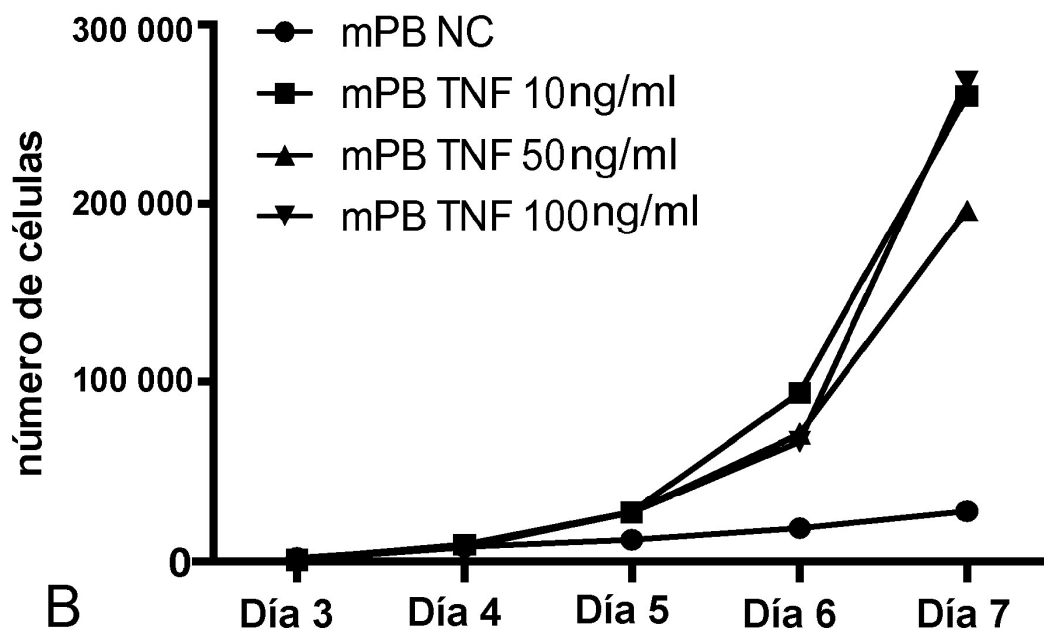
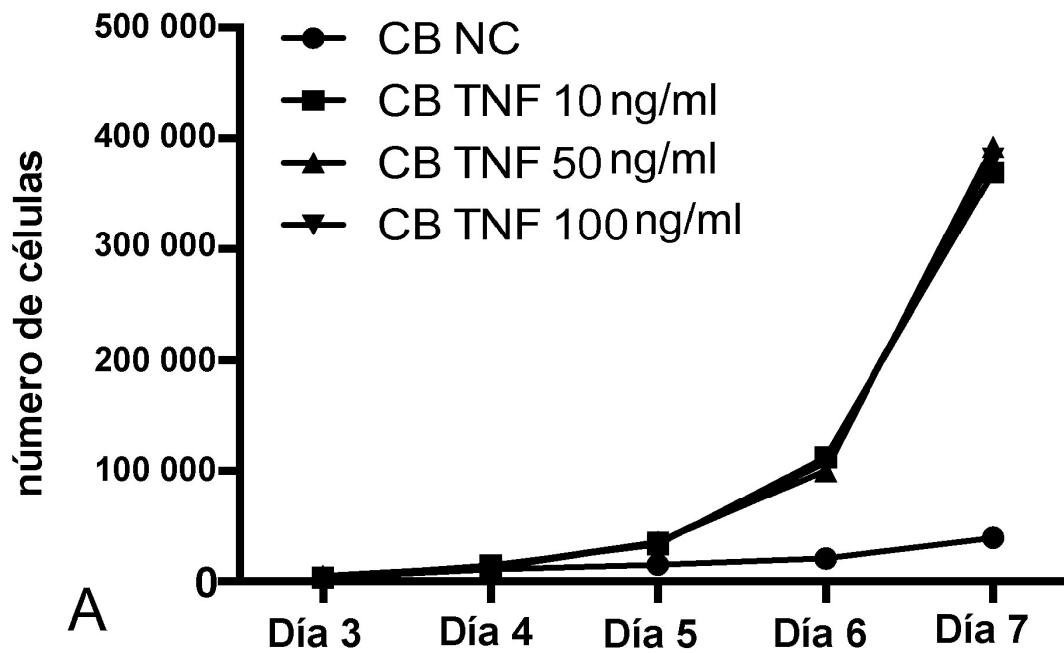


Figura 6

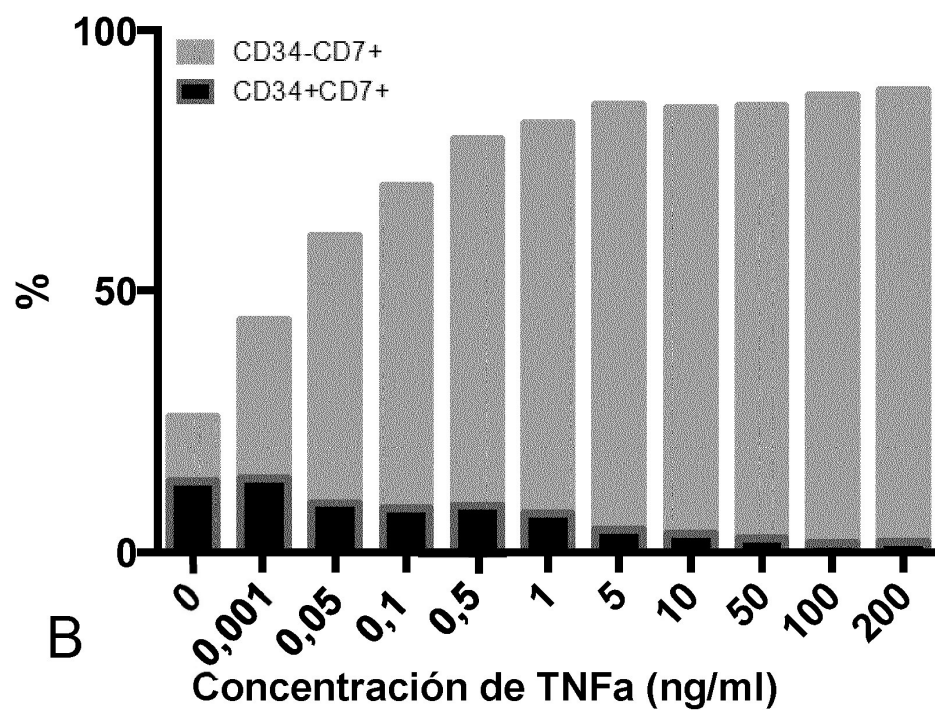
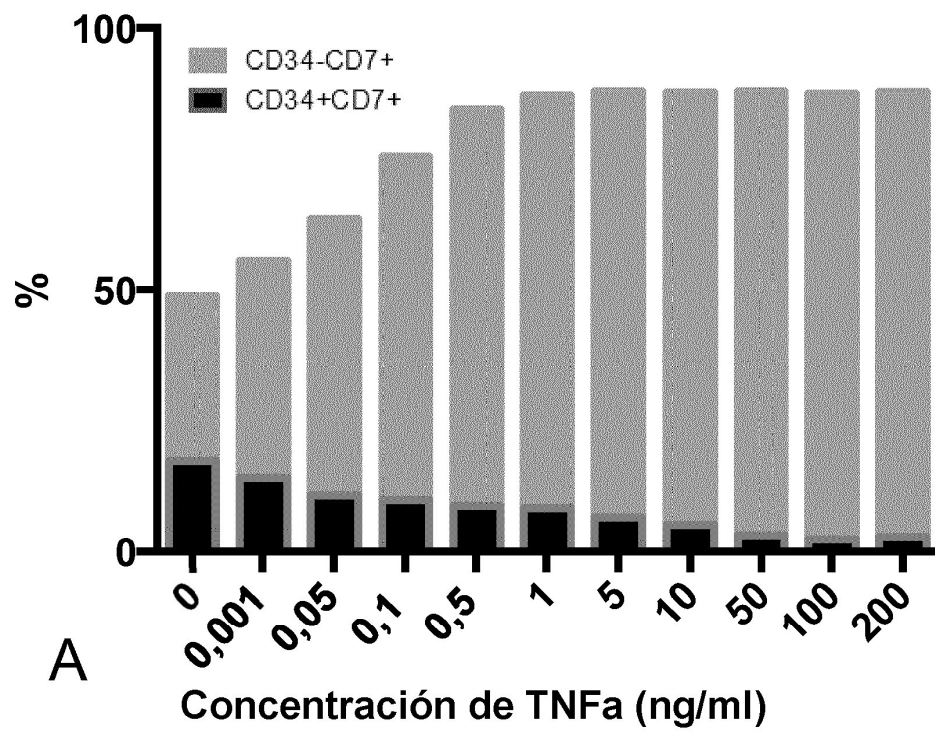


Figura 7

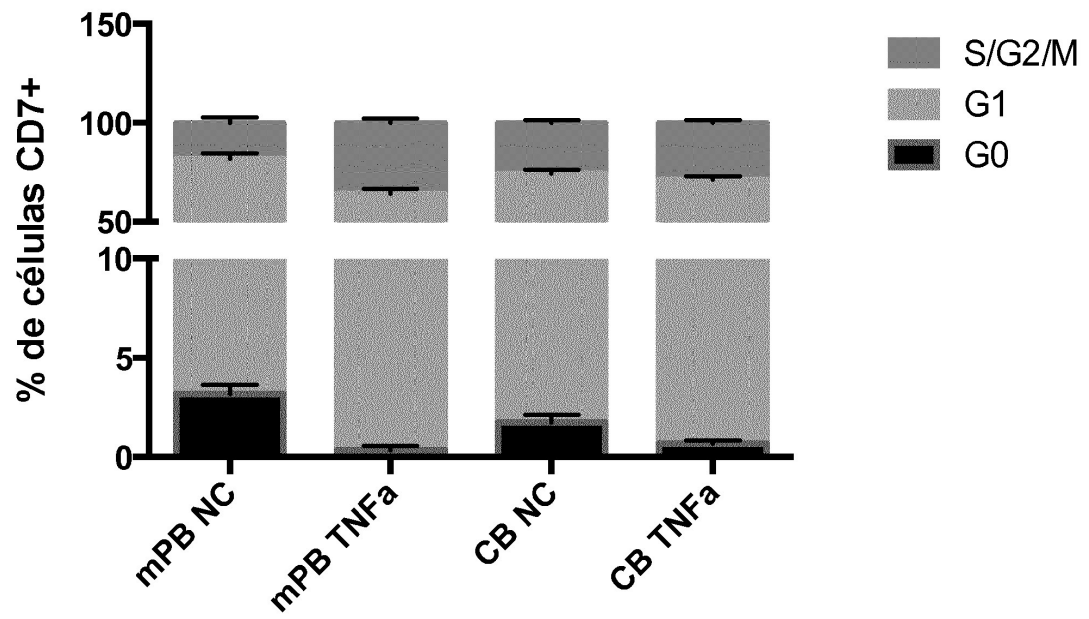


Figura 8

