

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 469**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0789 (2010.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2017** **PCT/US2017/055369**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018** **WO18067836**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2017** **E 17797460 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024** **EP 3523423**

54 Título: **Métodos para la diferenciación dirigida de células madre pluripotentes en células inmunitarias homocigóticas para HLA**

30 Prioridad:

05.10.2016 US 201662404470 P

18.04.2017 US 201762486895 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 989 469 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

Métodos para la diferenciación dirigida de células madre pluripotentes en células inmunitarias homocigóticas para HLA

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de la patente de Estados Unidos n.º 62/404.470, presentada el 5 de octubre de 2016 y 62/486.895, presentada el 18 de abril de 2017.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general al campo de la biología molecular. Más particularmente, se refiere a métodos y composiciones para la producción de células inmunitarias homocigóticas para HLA a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés) derivadas de células sanguíneas.

Descripción de la técnica relacionada

Se han desarrollado métodos de terapia celular para mejorar la respuesta inmunitaria del huésped a tumores, virus y patógenos bacterianos. Los métodos de terapia celular con frecuencia implican la activación *ex vivo* y la expansión de las células T. Entre los ejemplos de estos tipos de tratamientos se incluyen la utilización de células linfocitarias infiltrantes tumorales (LIT), células T citotóxicas, células expandidas de ganglios linfáticos drenantes de tumor y otras diversas preparaciones linfocitarias. Debido al importante potencial médico de las células madre y progenitoras hematopoyéticas, se ha realizado un trabajo sustancial para intentar mejorar los métodos para la diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas en células inmunitarias, tales como las células T y las células NK.

En los seres humanos, las células madre pluripotentes inducidas (iPS) se generan comúnmente a partir de fibroblastos dérmicos. Sin embargo, la necesidad de realizar una biopsia de piel y de expandir las células de fibroblastos en varios pases *in vitro* lo convierten en una fuente engorrosa para generar células madre específicas del paciente. Además, los métodos previos para la reprogramación de las células somáticas humanas resultan inconvenientes porque requieren la obtención de células somáticas directamente de un sujeto humano, o el mantenimiento de las células en un sistema de cultivo celular laborioso. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos para inducir células madre pluripotentes procedentes de fuentes alternativas que resulten simples, cómodos y fácilmente accesibles. De acuerdo con lo anterior, las muestras de sangre pueden ser una fuente de este tipo porque la sangre puede recogerse de un paciente o de una persona sana, almacenarse o transferirse, por ejemplo, de una unidad central para su distribución a uno o más lugares distantes. Por lo tanto, actualmente existe una clara necesidad de métodos para reprogramar las células iPS procedentes de células sanguíneas y a continuación diferenciar eficientemente las células iPS derivadas de las células sanguíneas en células inmunitarias, tales como células T, células NK, células T/NK y células dendríticas.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones. Una primera realización de la presente exposición proporciona un método según se define en las reivindicaciones de producción de células inmunitarias homocigóticas para HLA que comprende la obtención de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), en donde las iPSC se reprograman a partir de una población de células sanguíneas homocigóticas para HLA, se diferencian las iPSC a células precursoras hematopoyéticas (HPC), se aíslan las HPC que expresan los marcadores de superficie celular CD144, CD34, CD45 y CD7, y se cultivan las HPC bajo condiciones que promuevan la diferenciación de las células inmunitarias, produciendo de esta manera células inmunitarias homocigóticas para HLA, en donde las células inmunitarias homocigóticas para HLA son células linfoides, y el cultivo de las células para promover la diferenciación linfóide comprende el cultivo de las HPC en medios definidos sobre una superficie recubierta con matriz y ligando de Notch, y el mantenimiento del cultivo en presencia de una o más citoquinas, produciendo de esta manera células linfoides. En algunos aspectos, las iPSC están esencialmente libres de elementos víricos integrados exógenos.

En algunos aspectos, las células sanguíneas homocigóticas para HLA son homocigóticas para uno o más de los alelos de loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. En aspectos particulares, las células sanguíneas homocigóticas para HLA son homocigóticas para dos de los alelos de loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. En aspectos particulares, las células sanguíneas homocigóticas para HLA son homocigóticas para HLA-A y HLA-B. En un aspecto específico, las células sanguíneas homocigóticas para HLA son homocigóticas para HLA-A, HLA-B y HLA-C.

En la presente invención, las células inmunitarias homocigóticas para HLA son células linfoides. En aspectos particulares, las células linfoides son células T, células B y/o células NK.

En algunos aspectos, la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA es de mamíferos. En aspectos particulares, la población de células sanguíneas es humana. En algunos aspectos, la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA no ha sido movilizada con G-CSF aplicado extrínsecamente. En determinados aspectos, la

población de células sanguíneas homocigóticas para HLA comprende células T, células B y/o células NK. En algunos aspectos, la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA se define como células sanguíneas progenitoras, células mononucleares de sangre periférica o células linfoblastoides. En determinados aspectos, la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA se aísla de sangre periférica, sangre del cordón umbilical o tejido linfoide. En aspectos particulares, el tejido linfoide comprende médula ósea, ganglios linfáticos o hígado fetal. En aspectos específicos, la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA comprende células T. En algunos aspectos, las células T se cultivan en presencia de un anticuerpo anti-CD3 y/o un anticuerpo anti-CD28. En aspectos particulares, las células T son células T CD4⁺ o T CD8⁺. En algunos aspectos, las células T son células T ayudantes 1 (TH1), células T ayudantes 2 (TH2), células TH17, células T citotóxicas, células T reguladoras, células T asesinas naturales, células T no expuestas, células T de memoria o células T gamma delta.

En determinados aspectos, la reprogramación comprende la introducción de factores de reprogramación en la población de células sanguíneas. En algunos aspectos, la reprogramación comprende la introducción de ARN, proteína o moléculas pequeñas en la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA.

En algunos aspectos, los factores de reprogramación están codificados por uno o más casetes de expresión. En determinados aspectos, los factores de reprogramación comprenden dos o más genes seleccionados del grupo que consiste en Sox2, Oct4, cMyc, Klf4, Nanog, antígeno T grande del SV40, y Lin28. En determinados aspectos, los factores de reprogramación comprenden 3, 4, 5 o 6 de los genes seleccionados del grupo que consiste en Sox2, Oct4, cMyc, Klf4, Nanog, antígeno T grande del SV40, y Lin28. En determinados aspectos, el casete o casetes de expresión están comprendidos en un vector de reprogramación seleccionado del grupo que consiste en un vector vírico, un vector episómico y un transposón. En algunos aspectos, el vector vírico se define adicionalmente como un vector retrovírico. En aspectos particulares, el vector episómico se define adicionalmente como un vector episómico basado en el virus de Epstein-Barr (VEB). En algunos aspectos, la reprogramación comprende el cultivo de las células bajo condiciones definidas y libres de células nodriza.

En algunos aspectos, las HPC se diferencian en por lo menos 20 células inmunitarias homocigóticas para HLA por cada HPC, tal como por lo menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más células inmunitarias homocigóticas para HLA por cada HPC. En particular, las HPC se diferencian en por lo menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 o más células NK por cada HPC. En algunos aspectos, las HPC se diferencian en por lo menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 o más células T por cada HPC.

En determinados aspectos, la diferenciación de las iPSC en HPC comprende las etapas secuenciales de cultivo de las iPSC en un primer medio definido que comprende por lo menos un factor de crecimiento, la incubación de las células en un segundo medio definido que está libre o esencialmente libre de IL-3, ligando de Flt3, y y GM-CSF, el cultivo de las células en un tercer medio definido que comprende BMP4, FGF2 y VEGF suficiente para expandir o promover la diferenciación en una pluralidad de las células, y el cultivo de las células en un cuarto medio definido que comprende IL-3 y ligando de Flt3, suficiente para expandir o promover la diferenciación en una pluralidad de las células. En algunos aspectos, una pluralidad de las células pluripotentes se diferencian en HPC. En algunos aspectos, el segundo medio definido comprende blebistatina. En determinados aspectos, el segundo medio definido comprende, además, un inhibidor de GSK3. En algunos aspectos, el inhibidor de GSK3 es CHIR99021. En algunos aspectos, el segundo medio definido comprende, además, BMP4, VEGF y FGF2. En determinados aspectos, las células se individualizan antes de incubar las células en el segundo medio definido. En algunos aspectos, la incubación de las células en un segundo medio definido, el cultivo de las células en un tercer medio definido y el cultivo de las células en un cuarto medio definido se lleva a cabo utilizando placas de cultivo con aminas. En algunos aspectos, el segundo medio definido comprende, además, VEGF y FGF2. En aspectos particulares, el cuarto medio definido comprende, además, una o más de las citoquinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-3, IL-6, SCF, TPO y BMP4. En algunos aspectos, el cuarto medio definido comprende heparina. En algunos aspectos, el método comprende el cultivo de las células a una presión atmosférica inferior a 25 % de oxígeno, tal como inferior a 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 10 % o 5 % de oxígeno. En algunos aspectos, una pluralidad de células pluripotentes forman cuerpos embrioides (CE).

En la presente invención, las condiciones para promover la diferenciación de células inmunitarias son condiciones para promover la diferenciación linfoide. En la presente invención, el cultivo de las células para promover la diferenciación linfoide comprende el cultivo de las HPC en medios definidos sobre una superficie recubierta con matriz y un ligando de Notch, en donde las HPC expresan CD144, CD34, CD45 y CD7, y el mantenimiento del cultivo en presencia de una o más citoquinas, produciendo de esta manera células linfoides.

En la presente invención, la primera etapa para la diferenciación linfoide comprende el aislamiento de las HPC que expresan uno o más marcadores de superficie celular según se definen en las reivindicaciones. En algunos aspectos, el aislamiento comprende la separación celular activada magnéticamente (MACS, por sus siglas en inglés). En determinados aspectos, las células se cultivaron a una presión atmosférica inferior al 5 % de oxígeno. En determinados aspectos, las células se cultivaron a una presión atmosférica de aproximadamente 5 % de oxígeno. En algunos aspectos, el medio definido comprende ácido ascórbico y/o nicotinamida. En determinados aspectos, el ácido ascórbico está presente en una concentración de 50 μ M a 1 mM, tal como 90 μ M a 100 μ M. En algunos aspectos, la nicotinamida está presente en una concentración de 0,1 mM a 5 mM. En algunos aspectos, la nicotinamida es ácido

nicotínico. En algunos aspectos, la matriz es proteína de la matriz extracelular. En algunos aspectos, la matriz es retronectina, colágeno, laminina o fibronectina. En aspectos particulares, la matriz es retronectina. En algunos aspectos, el ligando de Notch es DLL4. En determinados aspectos, DLL4 es la proteína quimérica DLL4:FC. En aspectos particulares, se selecciona una o más citoquinas del grupo que consiste en SCF, TPO, IL-7 y Flt-3. En algunos aspectos, la segunda etapa es de una a seis semanas, tal como de dos a cuatro semanas. En algunos aspectos, las células linfoides expresan uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD8, CD7, CD45, CD5, CD4 y CD3. En algunos aspectos, más del 5 % de las células linfoides son positivas para como mínimo dos de los marcadores. En aspectos particulares, más del 10 % de las células linfoides son positivas para como mínimo dos de los marcadores.

Se da a conocer, además, una biblioteca de células inmunitarias homocigóticas para HLA, en la que cada miembro de la biblioteca se caracteriza de acuerdo con el tipo HLA. En algunos aspectos, las células inmunitarias homocigóticas para HLA se derivan de una muestra de sangre obtenida de un superdonante. En aspectos particulares, el super donante es un ser humano. En algunos aspectos, las células inmunitarias homocigóticas para HLA son alogénicas. En algunos aspectos, las células inmunitarias homocigóticas para HLA son autólogas. En determinados aspectos, las células inmunitarias homocigóticas para HLA son por lo menos homocigóticas para uno o más genes de HLA de clase I y/o de HLA de clase II. En determinados aspectos, las células sanguíneas homocigóticas para HLA son homocigóticas para uno o más de los alelos de loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP o HLA-DQ. En algunos aspectos, las células sanguíneas homocigóticas para HLA son homocigóticas para dos de los alelos de loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP o HLA-DQ. En algunos aspectos, las células inmunitarias homocigóticas para HLA son homocigóticas para HLA-A y HLA-B. En determinados aspectos, las células inmunitarias homocigóticas para HLA son homocigóticas para HLA-A, HLA-B y HLA-C. En algunos aspectos, las células inmunitarias homocigóticas para HLA son células linfoides, tales como las células T, las células B y/o las células NK. En determinados aspectos, las células inmunitarias homocigóticas para HLA son células mieloides, tales como las células dendríticas. En aspectos particulares, cada miembro de la biblioteca es compatible para HLA con los potenciales receptores. En algunos aspectos, la biblioteca comprende células inmunitarias homocigóticas para HLA conservadas criogénicamente. En aspectos particulares, la biblioteca comprende por lo menos 15 miembros de la biblioteca, en donde los miembros comprenden distintos haplotipos de HLA. En algunos aspectos, la biblioteca comprende por lo menos 30 miembros de la biblioteca, tal como por lo menos 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más miembros de la biblioteca.

Se da a conocer, además, un método de producción de una biblioteca de células inmunitarias homocigóticas para HLA de las realizaciones que comprenden el tipado de HLA de una pluralidad de muestras de sangre obtenidas de superdonantes humanos, la reprogramación de células de la pluralidad de muestras de sangre en iPSC, la diferenciación de las iPSC en HPC, y el cultivo de las HPC bajo condiciones que promueven la diferenciación de las células inmunitarias, produciendo de esta manera una biblioteca de células inmunitarias homocigóticas para HLA.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferentes de la invención, se proporcionan únicamente a modo de ilustración, ya que resultarán evidentes para el experto en la materia diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención a partir de la presente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para mostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. Los dibujos referidos a materia no comprendida en las reivindicaciones se proporcionan a título de referencia. La invención puede ser mejor entendida en referencia a uno o más de dichos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentada en la presente memoria.

FIGS. 1A-1D(A): Esquema del método libre de células nodriza para obtener células T, NK y NK/T a partir de células iPSC. Las iPSC se diferencian en HPC con potencial linfóide y mielóide mediante el procedimiento 3D y los progenitores de los días 7-10 se someten seguidamente a un proceso de diferenciación 2D para generar células T, NK y NK/T. (B) Esquema del método libre de células nodriza para obtener células dendríticas a partir de células iPSC. Las iPSC se diferencian en HPC con potencial linfóide y mielóide mediante el procedimiento 3D y los progenitores del día 12 se diferencian adicionalmente, generando un progenitor mielóide y se someten a un procedimiento de diferenciación 3D gradual para generar células dendríticas. (C) El día 12 se generaron HPC a partir de diversas líneas celulares de iPSC obtenidas de células sanguíneas y el porcentaje de células CD43⁺/CD34⁺ se cuantificó mediante citometría de flujo. (D) La eficiencia de generación de HPC a partir de las iPSC del día 12 se muestra como la relación entre el número absoluto de HPC generadas y el número introducido de iPSC.

La FIG. 2: Se muestran diagramas de dispersión de citometría de flujo que identifican las poblaciones linfoides y linfomieloides durante la diferenciación linfóide de las HPC de los días 7-10. Se determinó la presencia de células pre T, NK y NK/T.

FIGS. 3A-3D: (A) Perfil representativo de tinción para detectar la aparición de células linfoides a partir de iPSC vírica y episómicamente reprogramadas, incluidas las iPSC obtenidas de sangre del cordón umbilical, iPSC de

células T reprogramadas víricamente (TiPSC, por sus siglas en inglés) e iPSC obtenidas de células progenitoras reprogramadas episómicamente (01279.107.3908). Las células se tiñeron para la expresión superficial de diversos marcadores, incluyendo CD5, CD7, CD45, CD3, CD56, y CD8. Se cuantificó el porcentaje de células mediante citometría de flujo bajo FSC-SSC y las clasificaciones (en inglés, "gating") de dispersión linfóide. (EB7=Día 7, EB8=Día 8, EB9=Día 9, EB10=Día 10, y EB11=Día 11. (B) HPC de los días 7-11 diferenciadas a partir de TiPSC (parte superior: HPC totales; parte inferior: HPC CD43⁺CD34⁺) se diferenciaron adicionalmente en células linfoides y se tiñeron para la expresión superficial de CD45, CD7 y CD5. Se cuantificó el porcentaje de células mediante citometría de flujo bajo FSC-SSC y las agrupaciones (en inglés, "gating") de dispersión linfóide. (C) HPC de los días 7-11 generadas a partir de TiPSC (parte superior: HPC totales; parte inferior: CD43⁺CD34⁺HPC) se diferenciaron bajo condiciones hipóxicas y se tiñeron para la expresión superficial de CD56, CD8 y CD3. (D) Se muestra la eficiencia de la generación de células linfoides a partir de TiPSC (izquierda: HPC totales; derecha: HPC CD43⁺CD34⁺).

La FIG. 4: HPC de los días 7-11 diferenciadas a partir de TiPSC (p.ej., TiPSCs1E víricamente reprogramadas o 01279.107.3902 episómicamente reprogramadas) se analizaron para la expresión de CD43/CD34, CD34, DLL4, DLL4/CD144, CD31/CD144, y CD235 en diversos días de diferenciación de las HPC entre los días 7 y 11. El porcentaje de células positivas para cada conjunto de marcadores, si se muestra. La expresión de CD43/CD34 se muestra en la columna izquierda, CD34 columna derecha, DLL4/CD144 línea inferior, CD31/CD144 línea intermedia y CD235 línea superior.

La FIG. 5: Esquema de la estrategia de clasificación magnética para detectar progenitores linfoides durante la diferenciación de las HPC. Marcadores de interés: CD31, CD34, CD144, CD43, CD45, CD7, CD235, FLK1 (también conocido como KDR, VEGFR2 o CD309) y DLL4. El día 8 de la diferenciación, las células se clasificaron en diversas fracciones basándose en los marcadores de interés y después se sometieron al proceso de diferenciación linfóide.

FIGS. 6A-6B: (A) El porcentaje de células positivas para CD3 en cada fracción positiva y negativa de células de la estrategia de clasificación magnética de la FIG. 5 se muestra con las células sin agrupar como el control. (B) El enriquecimiento de las células T generadas a partir de las HPC se muestra para las fracciones positivas y negativas de la estrategia de clasificación magnética de la FIG. 5 con las células sin agrupar como el control.

FIGS. 7A-7B: (A) Se muestra el porcentaje de células positivas para CD3 en cada fracción positiva de células de la estrategia de clasificación magnética de la FIG. 5 tras 4 semanas de diferenciación linfóide de las TiPSC. (B) Diagrama FACS de 5 semanas de diferenciación de las células TiPSC 1E. El análisis de citometría de flujo de las células positivas para CD3 para la expresión de las células linfoides emergentes son CD7⁺, CD5⁺, CD3⁺, CD8⁺, CD56⁺ CD335⁺, CD161⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺ y TCR $\gamma\delta$.

FIGS. 8A-8B: A) La eficiencia del proceso de diferenciación linfóide de las TiPSC a partir de las HPC el día 16 de las fracciones clasificadas magnéticamente tanto positivas como negativas se muestra como la relación entre las HPC de entrada y las células linfoides de salida. (B) Eficiencia acumulada del proceso de diferenciación al cabo de cuatro semanas, partiendo de las fracciones de clasificación magnética positivas.

FIGS. 9A-9B: (A) Análisis fenotípico de células dendríticas obtenidas a partir de iPSC 02179 (MeCP2 WT) el día 42 de diferenciación. Las células se tiñeron para la expresión en superficie celular de los marcadores dendríticos mieloides CD205, CD209, HLA-DR, CD1a, CD1c, CD80, CD11c, CD80, CD86 y CD83 (B) Histogramas representativos de FACS de cuantificación de la expresión de diversos marcadores de superficie celular expresados sobre las células dendríticas.

FIG. 10: Se disolvió ovalbúmina DQ TM (DQ-OVA, Invitrogen) 1 mg/ml en PBS y se añadió a las CD obtenidas a partir de iPSC a razón de 100 μ g/ml. Las células se incubaron a 37 °C o a 4 °C, se lavaron dos veces con tampón de FACS y se analizaron en el citómetro de flujo de Accuri. Las CD obtenidas a partir de iPSC a 37 °C mostraron incorporación específica de OVA, en comparación con la incorporación no específica de OVA a 4 °C.

FIG. 11: Diagrama que representa la diferenciación libre de células nodriza y suero, de células hPSC en células T y NK. Las PSC se diferenciaron primero en células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ (HPC) en cultivo de cuerpo embrionario (EB) en suspensión (3D) a través de etapas sucesivas de formación de agregados, inducción de mesodermo y diferenciación de las HPC durante 9 días. Se aislaron las células CD34⁺ mediante MACS utilizando perlas paramagnéticas CD34 directas (Miltenyi Biotec) y se transfirieron a placas recubiertas con DLL4+RetroNectin para la diferenciación en T/NK durante 2 semanas. Las células T podrían expandirse adicionalmente durante 2 semanas en cultivo sobre placas recubiertas con anticuerpos monoclonales (mAb, por sus siglas en inglés) anti-CD3 (OKT3) + retronectina (ambos a 0,5 μ g/cm²) en T-EM (medio de expansión de células T ImmunoCult-XF (StemCell Technologies)) suplementado con IL2 sola o en combinación con otras citoquinas promotoras del crecimiento de células T (IL7, IL15, IL21). Abreviaturas: SFDm, medio de diferenciación libre de suero (por sus siglas en inglés); TCDm, medio de diferenciación de células T; TCEM, medio de expansión de células T; MACS, separación celular activada magnéticamente.

FIG. 12: análisis citométrico de flujo de cultivos de diferenciación de T/NK. Las células CD34⁺ derivadas de PSC (TiPSC 1C) después de 2 semanas bajo condiciones de diferenciación en T/NK desarrollan una población de células linfoides típica definida por parámetros bajos de FSC/SSC (diagrama de puntos a la izquierda). Esta población linfóide contiene principalmente células T CD3⁺ y NK CD56⁺CD3⁺ (diagrama de puntos central). La población de células T incluye células simples y dobles positivas para CD4⁺ y CD8⁺, así como una proporción significativa de células dobles negativas (diagrama de puntos a la derecha).

FIG. 13: rendimiento de diferentes poblaciones celulares a lo largo de la diferenciación. Los rendimientos de cada tipo celular respectivo se expresan como una relación entre salida y entrada del número absoluto de células en cada etapa de derivación celular representada en el diagrama. Por ejemplo, un rendimiento de células CD34⁺ de

1,5 indica que en promedio pueden derivarse 1,5 (salida) células CD34⁺ a partir de 1 célula PSC (entrada). De acuerdo con lo anterior, un rendimiento celular de 102 células T indica que pueden derivarse 102 células T (salida) a partir de 1 célula CD34⁺ (entrada).

FIG. 14: fenotipo de células T derivadas de células PSC. Las células T derivadas de células PSC (CD3⁺) diferenciadas y expandidas durante 4 semanas expresan TCR α/β (no TCR NKT V α 24 invariantes o γ/δ) y los marcadores de células T típicos CD5, CD27 y CD7. También expresan marcadores asociados a NK (CD161, CD94) y marcador de activación (CD69).

FIG. 15: expansión de células T derivadas de células PSC. Los anticuerpos anti-CD3 inmovilizados (iCD3) resultan necesarios en cantidad mínima y resultan suficientes para conseguir la expansión de las células T derivadas de PSC (gráfico de columnas). Los mAAb de CD3 y CD28 estimulantes solubles (sCD3, sCD28) no resultaron eficaces ni solos ni en combinación (sCD3+sCD28), ni al añadirlos a iCD3 (iCD3+sCD28). Las células T que proliferan en los cultivos de expansión adquieren una morfología característica de linfoblastos de forma irregular (fotografía). En contraste con la población de células de entrada relativamente heterogénea, las células recolectadas a partir de la expansión de las células T de 2 semanas eran esencialmente células T CD3⁺ puras, que también expresan CD56 y adquieren expresión de CD8 (diagramas de puntos de la citometría de flujo).

FIGS. 16A-16H: (A) Fotografía representativa de cultivos de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) del día 8: Las HPC van naciendo de la capa endotelial subyacente. (B) Representación esquemática del proceso de diferenciación 2D de las HPC. (C) Generación de HPC a partir de la línea celular 01279.107.3902 (MeCP2 KO) los días 7-10 de diferenciación. (D) Generación de HPC a partir de la línea celular TiPSCsIE los días 7-10 de diferenciación. Se recolectaron las células y se cuantificó el porcentaje de células CD43/CD34 mediante citometría de flujo. (E) Eficiencia de generación de HPC a partir de las células iPSC. Se calculó la eficiencia del procedimiento mediante la división del número absoluto de HPC generadas por número de entrada de células iPSC. (F) Análisis de células pre-T y pre-NK. Las HPC generadas a partir de células iPSC 0.1279.107.3902 (MeCP2 KO) se recolectaron los días 7-10 y se conservaron criogénicamente. Se descongelaron las HPC y se sembraron en placas a una densidad de 25K/cm² en placas recubiertas con RetroNectin-DLL4. Se introdujeron las células en medio definido libre de suero (SFD) que contenía GlutaMax al 1 %, estreptomycin-penicilina al 1 %, 2-fosfato de ácido L-ascórbico 95 μ M, 50 ng/ml de factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), ligando de Flt-3 (Flt-3) e IL-7 para estimular la diferenciación linfóide bajo condiciones hipóxicas. Se alimentaron las células con medio nuevo cada 48 h y se recolectaron el día 14 utilizando PBS frío. Se tiñeron las células para la expresión superficial de CD4, CD7, CD5, CD56, CD8 y CD3. Se cuantificó el porcentaje de células mediante citometría de flujo agrupando la dispersión según las linfoides. Se cuantificó la presencia de células T, NK y NK/T. (G) Análisis de células pre-T y pre-NK. Se tiñeron las células para la expresión superficial de CD4, CD7, CD5, CD56, CD8 y CD3. Se cuantificó el porcentaje de células mediante citometría de flujo agrupando la dispersión según las linfoides. (H) Eficiencia de la generación de células T a partir de células HPC. La eficiencia del procedimiento se calculó mediante división del número absoluto de células T (CD3⁺) generadas por número de entrada de células HPC (CD43/34⁺).

FIGS. 17A-17C: (A) Representación esquemática del proceso 3D de diferenciación de HPC utilizando células iPSC adaptadas al crecimiento sin células nodriza en Matrigel o vitronectina en presencia de medio E8 y bajo condiciones hipóxicas. La primera etapa de diferenciación de las HPC estaba controlada por BMP4, VEGF y FGF durante 4 días y la segunda etapa de diferenciación se controló mediante introducción de las células en medio que contenía heparina, SCF, TPO, ligando de Flt-3, IL-3 e IL-6. (B) Estrategia de ingeniería para generar un KO MeCP2 en la línea celular 2.038 de células iPSC de varón para crear 9006 (01279.107.003902). (C) Representación de la alineación de aminoácidos de las variantes 001, 002, 005 y 008 de MeCP2 a partir de células iPSCs 01279 transfectadas con MeCP2 TALENS y plásmido donante p1553. Todas las variantes (001, 002, 005 y 008) no codifican para un dominio de unión metil-CpG.

FIGs. 18A-18C: cuantificación de células iPSC pre-T y pre-NK Tips 1E recolectadas el día 7-11 de la diferenciación de HPC y se aplicaron en placas recubiertas con Ret-DLL4 para iniciar la diferenciación linfóide a una densidad de 2,5x10⁴/cm². Se determinaron los porcentajes de CD8⁺CD3⁺ (células T), CD56⁺CD8⁺ (células NK) y CD56⁺CD3⁺ (células NK/T) en células 01279 (MeCP2WT) mantenidas bajo condiciones hipóxicas (A) y normóxicas (B), así como células 01279.107.3902 (MeCP2KO) (C). (A-B) Las células NK presentan el porcentaje más alto de células positivas, seguido de las células NK/T, y las células T. (C) Entre los días 7 y 10, el porcentaje de células positivas de arriba a abajo son células T, células NK/T y células NK. El día 11, el porcentaje más alto de células positivas eran las células NK seguidas por las células NK/T y las células T.

FIGs. 19A-19C: estrategia de agrupación para identificar las células linfoides generadas *in vitro*. (A) Perfil general de dispersión de linfocitos de sangre periférica humana adulta. (B) Perfil de dispersión de las células linfoides el día 18 de la diferenciación. Se ilustran los portales FSC-SSC y linfóide. (C) Agrupación de células vivas dentro de la dispersión de FSC-SSC y linfóide utilizando yoduro de propidio.

FIG. 20: estrategia de clasificación para identificar las células linfoides generadas *in vitro*. Se muestra un perfil de dispersión de las células linfoides el día 18 de la diferenciación. Se ilustran los portales FSC-SSC y linfóide. Las células vivas se agruparon en la dispersión FSC-SSC y la dispersión linfóide utilizando yoduro de propidio seguido de tinción para células positivas para CD7 y CD5, mediante citometría de flujo.

FIG. 21A-21B: cuantificación de células NK (CD3⁺/CD56⁺) el día 7-11 de HPC de diferenciación y se aplicaron en placas recubiertas con Ret-DLL4 para iniciar la diferenciación linfóide a una densidad de 2,5x10⁴/cm². Se determinaron los porcentajes de células doblemente positivas, CD56⁺/CD3⁺, bajo el portal de FSC-SSC de todas las células vivas (A) y el portal de linfoides (B) para clones de células iPSC que contenían células de estado MeCP2WT y MeCP2KO

FIG. 22: perfil de producción de citoquinas tipo 1 de células T obtenidas a partir de células PSC. Las células T generadas en cultivos de diferenciación T/NK de 2 semanas a partir de células CD34⁺ obtenidas a partir de TiPSC (1C) se transfirieron al cultivo de expansión de células T (mAb anti-CD3 inmovilizado, II,2 y II,7). Se midieron las citoquinas en sobrenadantes de cultivo utilizando el ensayo de citoquinas multiplex de citometría de flujo LEGENDplex (panel CD8/NK; BioLegend). Se ilustran los niveles relativos de citoquinas en los diagramas de puntos respectivos.

FIG. 23A-23B: potencial de diferenciación en T/NK de PSC de superdonante de HLA. Se evaluó el potencial de diferenciación en T/NK de las líneas de PSC H, K, L y O de superdonante de HLA derivadas mediante el método episómico libre de transgénicos y se comparó con células TiPSC 1C altamente productoras de T/NK reprogramadas por retrovirus. (A) Diagramas de puntos que muestran las proporciones de HPC CD34⁺ en los cultivos de diferenciación de PSC recolectados el día 9. El gráfico de columnas indica los rendimientos cuantitativos de HPC CD34⁺. (B) La diferenciación en T/NK de las HPC CD34⁺ derivadas de las líneas de PSC de superdonante de HLA mostró un potencial linfopoyético T/NK relativamente alto en todas las HPC sometidas a ensayo (100-200 T/NK por 1 HPC CD34⁺ de entrada).

Descripción de realizaciones ilustrativas

En determinadas realizaciones, la presente exposición proporciona métodos altamente eficientes para generar células inmunitarias a partir de células madre pluripotentes inducidas que han sido reprogramadas a partir de una población inicial de células somáticas (p. ej., células sanguíneas). Entre las células inmunitarias producidas mediante los métodos actuales se pueden incluir células T, células NK y células T/NK. En algunos aspectos, la población inicial de células somáticas comprende células T. Las células T se pueden aislar de diversas fuentes, tal como una muestra de sangre.

En realizaciones particulares, la población inicial de células sanguíneas comprende células homocigóticas para HLA (es decir, homocigóticas para los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clases I y II). En consecuencia, las células iPSC pueden producirse a partir de células aisladas de sujetos homocigóticos para HLA, a los que se hace referencia en la presente memoria como superdonantes de HLA.

La población de células sanguíneas puede reprogramarse a células iPSC mediante la introducción de factores de reprogramación, tales como a través de un vector vírico o episómico. Estas células iPSC derivadas de células sanguíneas (p. ej., células iPSC derivadas de células T (TiPSC)) seguidamente se diferencian en células precursoras hematopoyéticas. En un método, el procedimiento de diferenciación implica la activación de WNT, el cultivo con citoquinas inductoras de hematopoyesis y el aislamiento de células CD34⁺. Finalmente, las HPC se diferencian entonces en células linfoides (p. ej., células T, NK y T/NK).

La diferenciación en células linfoides puede ser a través del uso de RetroNectin y DLL-4 como matriz libre de células nodriza. La diferenciación de las células T puede potenciarse adicionalmente mediante la utilización de ácido ascórbico para aumentar la eficiencia y la maduración, así como mediante el cultivo bajo condiciones hipóxicas. Curiosamente, los inventores han determinado un período de tiempo óptimo durante la diferenciación de las HPC (p. ej., los días 7-11) para el potencial linfoide. Estas HPC con potencial linfoide pueden identificarse mediante la expresión de CD34 y CD43. Además, las HPC con potencial linfoide mejorado se aíslan mediante la clasificación de fracciones de células positivas para los marcadores CD144, CD34, CD45 y CD7.

Entre las células linfoides producidas a partir de las PSC derivadas de células sanguíneas se pueden incluir células T, células NK y células T/NK que conservan sus reordenamientos genéticos característicos del receptor de células T (RCT), una propiedad que podría ser explotada, por ejemplo, como un marcador de seguimiento genético o en experimentos de rediferenciación para estudiar el desarrollo de células T humanas. Una ventaja particular de la presente exposición radica en los segmentos reorganizados y reducidos de los genes V, D, J de los receptores de células T que pueden retenerse en las células T diferenciadas. Lo anterior sirve como una característica específica o "código de barras" de diferentes poblaciones clonales de células iPSC derivadas de células T, y también ayuda a diferenciar esas células iPSC a partir de células madre pluripotentes que no han sido sometidas a recombinación V(D)J.

Por lo tanto, los métodos de la presente exposición podrían proporcionar un número ilimitado de células inmunitarias homocigóticas para HLA, tales como células T, células NK, células T/NK, para una amplia gama de aplicaciones, tales como el trasplante estable *in vivo*, el cribado *in vitro* de compuestos y la elucidación de los mecanismos de enfermedades y lesiones hematológicas.

I. Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, "esencialmente libre", en términos de un componente especificado, se utiliza en la presente memoria para referirse a que ninguno de los componentes especificados ha sido formulado deliberadamente en una composición y/o que está presente solo como un contaminante o en cantidades trazadas. Por lo tanto, la cantidad total del componente especificado resultante de cualquier contaminación no deliberada de una composición es muy inferior al 0,05 %, preferentemente inferior al 0,01 %. Lo más preferente es una composición en la que no se puede detectar ninguna cantidad del componente especificado mediante métodos analíticos estándares.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "un" o "una o "el" o "la" puede significar uno o más. Tal como se utiliza en la presente memoria, en la reivindicación o reivindicaciones, cuando se utiliza junto con la expresión "que comprende", los términos "un" o "una" pueden referirse a uno o más de uno.

La utilización del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para referirse a "y/o", a menos que se indique explícitamente que se refiere únicamente a alternativas o a que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la exposición incluye una definición que se refiere únicamente a alternativas e "y/o". Tal como se usa en la presente memoria, "otro" puede referirse a por lo menos un segundo elemento o más elementos.

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

El término "exógeno", cuando se utiliza en relación con una proteína, gen, ácido nucleico o polinucleótido en una célula u organismo, se refiere a una proteína, gen, ácido nucleico o polinucleótido que se ha introducido en la célula u organismo por medios artificiales o naturales; o en referencia a una célula, el término se refiere a una célula que ha sido aislada y posteriormente introducida en otras células o en un organismo por medios artificiales o naturales. Un ácido nucleico exógeno puede ser de un organismo o célula diferente, o puede ser una o más copias adicionales de un ácido nucleico que ocurre naturalmente dentro del organismo o célula. Una célula exógena puede proceder de un organismo diferente, o puede proceder del mismo organismo. A modo de ejemplo no limitativo, un ácido nucleico exógeno es uno que se encuentra en una ubicación cromosómica diferente de donde estaría en las células naturales, o está flanqueado alternativamente por una secuencia de ácido nucleico diferente a la que se encuentra en la naturaleza.

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

Un "vector" o "constructo" (en ocasiones conocido como un sistema de administración de genes o "vehículo" de transferencia génica) se refiere a una macromolécula o complejo de moléculas que comprende un polinucleótido para la administración en una célula huésped, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

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

Un "origen de replicación" ("ori") es una secuencia de ADN, p. ej., en un virus herpes linfotrófico, que cuando está presente en un plásmido en una célula es capaz de mantener secuencias unidas en el plásmido y/o en un sitio en o en proximidad a donde se inicia la síntesis de ADN. Por ejemplo, un ori para el VEB (virus de Epstein-Barr) incluye secuencias de FR (20 copias imperfectas de una repetición de 30 pb), y preferentemente secuencias DS; sin embargo, otros sitios en el VEB se unen a EBNA-1, p. ej., secuencias Rep* pueden sustituir a DS como origen de replicación (Kirshmaier y Sugden, 1998). Por lo tanto, un origen de replicación del VEB incluye secuencias de FR, DS o Rep* o cualesquiera secuencias funcionalmente equivalentes mediante modificaciones de ácido nucleico o una combinación sintética derivada de ellas. Por ejemplo, la presente exposición puede utilizar, además, el origen de replicación genéticamente modificado del VEB, tal como por inserción o mutación de elementos individuales, tal como se describe específicamente en Lindner et al., 2008.

Un "gen", "polinucleótido", "región codificante", "secuencia", "segmento", "fragmento" o "transgén" que "codifica" una proteína en particular, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe y, opcionalmente, también se traduce en un producto génico, p. ej., un polipéptido, *in vitro* o *in vivo* cuando se introduce bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas. La región codificante puede estar presente en forma de ADNCc, ADN genómico o ARN. Cuando está presente en una forma de ADN, la molécula de ácido nucleico puede ser de una sola cadena (es decir, la cadena de sentido) o de doble cadena. Los límites de una región codificante están determinados por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) terminal y un codón de parada de traducción en el extremo 3' (carboxi) terminal. Un gen puede incluir, aunque sin limitación, el ADNc de ARNm procariótico o eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN procariótico o eucariótico, y secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción generalmente se localiza en el lado 3' de la secuencia génica.

La expresión "elementos de control" se refiere colectivamente a regiones de promotor, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de transcripción, dominios reguladores cadena arriba, orígenes de replicación, sitios internos de entrada ribosómica (IRES, por sus siglas en inglés), intensificadores, uniones de procesamiento génico y similares, que en conjunto proporcionan la replicación, transcripción, procesamiento post-transcripcional y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No todos estos elementos de control necesitan estar presentes

siempre y cuando la secuencia codificante seleccionada sea capaz de ser replicada, transcrita y traducida en una célula huésped apropiada.

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

El término "intensificador" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que, cuando está ubicada en proximidad a un promotor, confiere una mayor actividad de transcripción respecto a la actividad de transcripción resultante del promotor en ausencia del dominio intensificador.

Las expresiones "operablemente ligadas" o "coexpresadas" en referencia a las moléculas de ácido nucleico se refieren a que dos o más moléculas de ácido nucleico (p. ej., una molécula de ácido nucleico que va a transcribirse, un promotor y un elemento intensificador) están conectados de tal manera que permiten la transcripción de la molécula de ácido nucleico. La expresión "operablemente unida" o "coexpresada" en referencia a moléculas de péptidos y/o polipéptidos se refiere a dos o más moléculas de péptidos y/o polipéptidos que están conectadas de tal manera que producen una única cadena de polipéptidos, es decir, un polipéptido de fusión, que presenta por lo menos una propiedad de cada péptido y/o componente polipeptídico de la fusión. El polipéptido de fusión es preferentemente quimérico, es decir, compuesto por moléculas heterólogas.

El término "homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o dos polipéptidos. La correspondencia entre una secuencia y otra puede determinarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, la homología se puede determinar mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas de polipéptido mediante la alineación de la información de secuencia y utilizando programas informáticos fácilmente disponibles. Alternativamente, la homología puede determinarse mediante hibridación de polinucleótidos bajo condiciones que promueven la formación de dúplex estables entre regiones homólogas, seguida de la digestión con una o más nucleasas específicas de una sola cadena y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Dos secuencias de ADN, o dos polipéptidos, son "sustancialmente homólogos" entre sí cuando por lo menos aproximadamente 80 %, preferentemente por lo menos aproximadamente 90 %, y más preferentemente por lo menos aproximadamente 95 % de los nucleótidos, o aminoácidos, respectivamente, coinciden en una longitud definida de las moléculas, según se determinó utilizando los métodos anteriormente proporcionados.

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

La expresión "célula madre" se refiere en la presente memoria a una célula que bajo condiciones adecuadas es capaz de diferenciarse en una amplia gama de tipos de células especializadas, mientras que en otras condiciones adecuadas es capaz de autorrenovarse y permanecer en un estado pluripotente esencialmente indiferenciado. La expresión "célula madre" comprende, además, una célula pluripotente, una célula multipotente, una célula precursora y una célula progenitora. Las células madre pluripotentes de la presente invención se producen a partir de células somáticas mediante su reprogramación a un estado pluripotente mediante la expresión de determinados factores de transcripción asociados a la pluripotencia; estas células se denominan "células madre pluripotentes inducidas" o "células iPSCs o iPS".

Las "células madre pluripotentes inducidas (iPSCs o células iPS)" son células generadas mediante la reprogramación de una célula somática a través de la expresión o inducción de la expresión de una combinación de factores (en lo sucesivo denominados factores de reprogramación). Las células iPS se pueden generar usando células somáticas fetales, postnatales, recién nacidas, juveniles o adultas. En determinadas realizaciones, entre los factores que se pueden usar para reprogramar células somáticas a células madre pluripotentes se incluyen, por ejemplo, Oct4 (en ocasiones denominado Oct 3/4), Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog y Lin28. En algunas realizaciones, las células somáticas se reprograman mediante la expresión de por lo menos dos factores de reprogramación, por lo menos tres factores de reprogramación, por lo menos cuatro factores de reprogramación, por lo menos cinco factores de reprogramación, por lo menos seis factores de reprogramación, o por lo menos siete factores de reprogramación para reprogramar una célula somática a una célula madre pluripotente.

La expresión "células progenitoras hematopoyéticas" o "células precursoras hematopoyéticas" se refiere a células que están comprometidas con un linaje hematopoyético pero que son capaces de una mayor diferenciación hematopoyética y entre ellas se incluyen células madre hematopoyéticas, células madre hematopoyéticas

multipotenciales, progenitoras mieloides comunes, progenitoras de megacariocitos, progenitores de eritrocitos y progenitores de células linfoides. Las células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) son células madre multipotentes que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas, incluyendo mieloides (monocitos y macrófagos, granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos y mastocitos), eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linajes linfoides (células T, células B y células NK) (ver, p. ej., Doulatov et al., 2012; Notta et al., 2015). Un "progenitor multilinfoide" (MLP, por sus siglas en inglés) se define para describir cualquier progenitor que da lugar a todos los linajes linfoides (células B, T y NK), aunque puede presentar o no presentar otros potenciales (mieloides) (Doulatov et al., 2010) y es CD45RA⁺/CD10⁺/CD7⁻. Puede hacerse referencia a cualquier progenitor B, T y NK como MLP. Un "progenitor mieloide común" (CMP, por sus siglas en inglés) se refiere a un progenitor mieloide común definido por la expresión de células CD45⁺/CD31⁺/CD43⁺/CD34⁻ que pueden dar lugar a granulocitos, monocitos, megacariocitos y eritrocitos. Las células progenitoras hematopoyéticas pueden expresar CD34. Las células progenitoras hematopoyéticas pueden coexpresar CD133 y ser negativas para la expresión de CD38. Entre las células precursoras hematopoyéticas se incluyen células precursoras hematopoyéticas CD34⁺/CD45⁺ y células precursoras hematopoyéticas CD34⁺/CD45⁺/CD43⁺. Las células precursoras hematopoyéticas CD34⁺/CD43⁺/CD45⁺ pueden estar altamente enriquecidas para los progenitores mieloides. Entre las células hematopoyéticas se incluyen, además diversos subconjuntos de células hematopoyéticas primitivas, incluyendo: CD34⁺/CD133⁺/CD38⁻ (células precursoras hematopoyéticas primitivas), CD43(+)/CD235a(+)/CD41a(+/-) (eritro-megacariopoyéticas), lin(-)/CD34(+)/CD43(+)/CD45(+) (multipotente), y células lin(+)/CD34(+)/CD45(+) (sesgadas hacia mieloides), células CD133⁺/ALDH⁺ (aldehído deshidrogenasa) (p. ej., Hess et al., 2004; Christet et al., 2007). Se anticipa que cualquiera de estos tipos celulares hematopoyéticos primitivos o células precursoras hematopoyéticas pueden convertirse en células iPS tal como se describe en la presente memoria. En algunos aspectos, entre las células se pueden incluir mastocitos, células de Langerhans, osteoclastos, células NK, células T, células T CIK, u otros subtipos de células T, células NK y células B.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "célula o células inmunitarias" se refiere a las células del sistema inmunitario, incluyendo, aunque sin limitación, células T, células NK, células T/NK, células dendríticas, macrófagos, células B, neutrófilos, eritrocitos, monocitos, basófilos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y cualquier combinación de los mismos.

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

Las expresiones "linfocito T" y "célula T" se utilizan indistintamente, y se refieren a una célula que expresa un receptor de antígeno de células T (RCT) capaz de reconocer antígenos cuando está expuesto sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos o matriz junto con una o más moléculas del CMH, o una o más moléculas del CMH no clásico.

La expresión "células T" se refiere a linfocitos T tal como se definen en la técnica y pretende incluir timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo o linfocitos T activados. Las células T pueden ser células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T CD4⁺CD8⁺, o células T CD4⁺CD8⁻. Las células T también pueden ser células T ayudantes, tales como las células T ayudantes 1 (TH1), o T ayudantes 2 (TH2), o células TH17, así como células T citotóxicas, células T reguladoras, células T asesinas naturales, células T no expuestas, células T de memoria, o células T gamma-delta (Wilson et al., 2009; Wynn, 2005; Ladiet et al., 2006). Las células T que difieren entre sí por como mínimo un marcador, tal como CD4, en la presente memoria se denominan "subconjuntos" de células T.

Las "células T CD4⁺" se refieren a un subconjunto de células T que expresan CD4 sobre su superficie y que están asociadas a la respuesta inmunitaria celular. Se caracterizan por los perfiles de secreción después de la estimulación, que pueden incluir la secreción de citoquinas, tales como IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-4 e IL-10. Las "CD4" son glicoproteínas 55 kD originalmente definidas como antígenos de diferenciación sobre los linfocitos T, pero que también se encuentran sobre otras células, incluyendo monocitos/macrófagos. Los antígenos CD4 son miembros de la familia supergénica de inmunoglobulinas y participan como elementos de reconocimiento asociativo en las respuestas inmunitarias de clase II restringida del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad). Sobre los linfocitos T definen el subconjunto ayudante/inductor.

La expresión "células T CD8⁺" se refiere a un subconjunto de células T que expresan CD8 sobre su superficie, están restringidas a CMH de clase I y funcionan como células T citotóxicas. Las moléculas "CD8" son antígenos de diferenciación que se encuentran sobre los timocitos y los linfocitos T citotóxicos y supresores. Los antígenos CD8 son miembros de la superfamilia génica de inmunoglobulinas y son elementos de reconocimiento asociativo en interacciones restringidas al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I.

La expresión "célula madre pluripotente" se refiere a una célula madre que posee el potencial de diferenciarse en

todas las células que constituyen uno o más tejidos u órganos, o preferentemente, cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal y los pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre y urogenital) o ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula somática" se refiere a cualquier célula que no sean células germinales, tales como un óvulo, un espermatozoide, o similares, que no transfiere directamente su ADN a la siguiente generación. Típicamente, las células somáticas poseen una pluripotencia limitada o nula. Las células somáticas utilizadas en la presente invención pueden ser naturales o modificadas genéticamente.

La "programación" es un procedimiento que altera el tipo de progenie que una célula puede producir. Por ejemplo, una célula ha sido programada cuando ha sido alterada para que pueda formar progenie de por lo menos un nuevo tipo de célula, ya sea en cultivo o *in vivo*, en comparación con lo que habría sido capaz de formar bajo las mismas condiciones sin programación. Lo anterior significa que después de una proliferación suficiente, se observa una proporción mensurable de la progenie que presenta características fenotípicas del nuevo tipo de célula, si esencialmente no se podía formar tal progenie antes de la programación; alternatively, la proporción que presenta características del nuevo tipo de célula es mensurablemente mayor que antes de la programación. Dicho procedimiento incluye la diferenciación, la desdiferenciación y la transdiferenciación.

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

La "reprogramación" es un proceso que confiere a una célula una capacidad mensurablemente mayor para formar progenie de por lo menos un nuevo tipo de célula, ya sea en cultivo o *in vivo*, de la que presentaría bajo las mismas condiciones sin reprogramación. Más específicamente, la reprogramación es un proceso que confiere a una célula somática un potencial pluripotente. Lo anterior significa que después de una proliferación suficiente, se observa una proporción mensurable de la progenie que presenta características fenotípicas del nuevo tipo de célula, si esencialmente no se podía formar tal progenie antes de la programación; en caso contrario, la proporción que presenta características del nuevo tipo de célula es mensurablemente mayor que antes de la programación. Bajo determinadas condiciones, la proporción de progenie con características del nuevo tipo celular puede ser de por lo menos aproximadamente 1 %, 5 %, 25 % o superior, en orden de preferencia creciente.

La expresión "programación hacia adelante" se refiere a la programación de una célula multipotente o pluripotente, a diferencia de una célula somática diferenciada que no presenta pluripotencia, por la provisión de uno o más genes específicos determinantes de linaje o productos génicos a la célula multipotente o pluripotente. Por ejemplo, la programación hacia adelante puede describir el procedimiento de programación de células ESC o iPSC en células precursoras hematopoyéticas u otras células precursoras, o en células hematopoyéticas u otras células somáticas diferenciadas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" o "sujeto que lo necesita" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, hombre o mujer a cualquier edad que necesita un trasplante de células o tejidos. Normalmente, el sujeto necesita trasplante de células o tejidos (también referido en la presente memoria como "receptor") debido a un trastorno o una afección, estado o síndrome patológico o no deseado, o una anomalía física, morfológica o fisiológica que es susceptible de tratamiento a través de trasplante de células o tejidos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "disrupción" de un gen se refiere a la eliminación o reducción de la expresión de uno o más productos génicos codificados por el gen en cuestión en una célula, en comparación con el nivel de expresión del producto génico en ausencia de la disrupción. Entre los productos génicos de ejemplo se incluyen ARNm y productos proteicos codificados por el gen. La disrupción en algunos casos es transitoria o reversible y en otros casos es permanente. La disrupción en algunos casos es de una proteína o ARNm funcional o de longitud completa, a pesar del hecho de que puede producirse un producto truncado o no funcional. En algunas realizaciones en la presente memoria, se interrumpe la actividad o función génica, no la expresión. La alteración genética se induce generalmente mediante métodos artificiales, es decir, mediante la adición o introducción de un compuesto, molécula, complejo o composición, y/o mediante la alteración del ácido nucleico del gen o asociado al mismo, tal como al nivel del ADN. Entre los métodos de ejemplo para la disrupción génica se incluyen el silenciamiento génico, la reducción de la expresión (en inglés, "knockdown"), la inactivación génica (en inglés, "knockout") y/o las técnicas de disrupción génica, tales como la edición génica. Entre los ejemplos se incluyen tecnología antisentido, tal como ARNi, ARNip, ARNhp, y/o ribozimas, que generalmente resultan en una reducción transitoria de la expresión, así como técnicas de edición génica que resultan en la inactivación o disrupción génica dirigida, p. ej., mediante la inducción de roturas y/o recombinación homóloga. Entre los ejemplos se incluyen inserciones, mutaciones y delecciones. Las disrupciones normalmente resultan en la represión y/o ausencia completa de expresión de un producto normal o "de tipo salvaje"

codificado por el gen. Son ejemplos de tales disrupciones génicas, las inserciones, las mutaciones por desplazamiento de marco y las mutaciones con sentido erróneo, la inserción (en inglés, "knock-in") y la extracción (en inglés, "knock-out") del gen o parte del gen, incluyendo las delecciones del gen completo. Tales disrupciones pueden ocurrir en la región codificante, p. ej., en uno o más exones, lo que resulta en la incapacidad de producir un producto de longitud completa, un producto funcional o cualquier producto, tal como mediante la inserción de un codón de parada. Dichas disrupciones también pueden ocurrir por disrupciones en el promotor o intensificador, u otra región que afecte a la activación de la transcripción, a fin de impedir la transcripción del gen. Las disrupciones génicas incluyen el direccionamiento génico, incluido la inactivación génica dirigida mediante recombinación homóloga.

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

Los "superdonantes" se refieren en la presente memoria a individuos homocigóticos para determinados genes del CMH de clase I y II. Estos individuos homocigóticos pueden servir como superdonantes y sus células, incluyendo tejidos y otros materiales que componen sus células, pueden ser trasplantadas en individuos que son homocigóticos o heterocigóticos para ese haplotipo. El superdonante puede ser homocigótico para los alelos locus/loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP o HLA-DQ, respectivamente.

II. Células iPSC derivadas de células somáticas

A. Población inicial de células somáticas

Las realizaciones de la presente exposición se refieren a una población inicial de células somáticas (p. ej., células sanguíneas o células de la piel) que se reprograman a células iPSC. La población de células sanguíneas puede incluir células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), sangre completa o fracciones de la misma que contienen poblaciones mixtas, células del bazo, células de médula ósea, linfocitos infiltrantes tumorales, células obtenidas por leucaféresis, tejido de biopsia y ganglios linfáticos, p. ej., ganglios linfáticos que drenan de un tumor. Entre los donantes adecuados se incluyen donantes inmunizados, donantes no inmunizados (no expuestos), donantes tratados o donantes no tratados. Un donante "tratado" es uno que ha estado expuesto a uno o más modificadores biológicos. Un donante "no tratado" es uno que no ha estado expuesto a uno o más modificadores biológicos.

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

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

Las células T pueden proceder de muestras de sangre previamente almacenadas, de un individuo sano o, alternativamente, de un individuo afectado por una afección. La afección puede ser una enfermedad infecciosa, tal como una afección resultante de una infección vírica, una infección bacteriana o una infección por cualquier otro microorganismo, o una enfermedad hiperproliferativa, tal como cáncer como el melanoma. En una realización específica, las células T proceden de un individuo infectado por un virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En todavía otra realización, las células T proceden de un sujeto que sufre o es susceptible de sufrir una enfermedad autoinmune o patologías de células T. Las células T pueden ser de origen humano, origen murino o cualquier otra especie de mamífero.

Los métodos de obtención de poblaciones de células que comprenden células T son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se pueden obtener según se describe de acuerdo con los métodos conocidos de la técnica. Se proporcionan ejemplos de tales métodos en la sección de Ejemplos, y se comentan en Kim et al. (1992); Biswas et al. (1990); Biswas et al. (1991).

En algunos aspectos, la población inicial de células sanguíneas comprende células madre hematopoyéticas (HSC). Las HSC normalmente residen en la médula ósea, aunque puede forzarse su paso a la sangre, un procedimiento denominado movilización utilizado clínicamente para recolectar grandes cantidades de HSC en sangre periférica. Un agente movilizador de elección es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés). Las células madre hematopoyéticas CD34⁺ o los progenitores que circulan en la sangre periférica pueden recolectarse mediante técnicas de aféresis, ya sea en estado no perturbado, o después de la movilización tras la administración externa de factores de crecimiento hematopoyético tales como G-CSF. El número de células madre o progenitoras recolectadas después de la movilización es mayor que el obtenido después de la aféresis en estado no perturbado. En algunos aspectos, la fuente de la población celular es un sujeto cuyas células no han sido movilizadas por factores aplicados extrínsecamente porque no hay necesidad de enriquecer las células madre hematopoyéticas o las células progenitoras.

Los métodos de obtención de células precursoras hematopoyéticas a partir de poblaciones de células también son bien conocidos de la técnica. Las células precursoras hematopoyéticas pueden expandirse utilizando diversas citoquinas, tales como hSCF, hFLT3 y/o IL-3 (Akina et al. et al., 1996), o las células CD34⁺ pueden enriquecerse mediante MACS o FACS. Tal como se ha mencionado anteriormente, las técnicas de selección negativa también se pueden utilizar para enriquecer las células CD34⁺.

Las poblaciones de células que se utilizarán en los métodos descritos en el presente documento pueden ser células de mamífero, tales como células humanas, células de primates no humanas, células de roedores (p. ej., de ratón o rata), células bovinas, células ovinas, células porcinas, células equinas, células de oveja, células caninas y células felinas, o una mezcla de las mismas. Entre las células de primate no humano se incluyen las células de macaco rhesus. Las células pueden obtenerse de un animal, p. ej., un paciente humano, o pueden proceder de líneas celulares. Si las células se obtienen de un animal, pueden usarse como sin modificación, p. ej., en forma de células no separadas (es decir, una población mixta); pueden haber sido establecidas en el cultivo primero, p. ej., mediante transformación; o pueden haber sido sometidas a métodos preliminares de purificación. Por ejemplo, una población celular puede ser manipulada mediante selección positiva o negativa basándose en la expresión de marcadores de superficie celular; estimularse con uno o más antígenos *in vitro* o *in vivo*; tratarse con uno o más modificadores biológicos *in vitro* o *in vivo*; o una combinación de cualquiera o la totalidad de los mismo. En una realización ilustrativa, una población celular se somete a selección negativa para la reducción del número de subgrupos de células no T y/o de subgrupos particulares de células T. La selección negativa se puede llevar a cabo sobre la base de la expresión en superficie celular de una variedad de moléculas, incluyendo marcadores de células B, tales como CD19, y CD20; el marcador de monocitos CD14 o el marcador de células NK CD56. Alternativamente, una población celular puede someterse a selección negativa para la eliminación de células hematopoyéticas no CD34⁺ y/o subconjuntos particulares de células hematopoyéticas. La selección negativa se puede realizar sobre la base de la expresión de la superficie celular de una variedad de moléculas, tales como un cóctel de anticuerpos (e.g., CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, CD235a y CD41 (p. ej., para células del linaje de megacariocitos) que se pueden utilizar para la separación de otros tipos celulares, p. ej., mediante MACS o separación en columna.

También es posible obtener una muestra celular de un sujeto, y después enriquecerla para un tipo de célula deseado. Por ejemplo, las células hematopoyéticas PBMC y/o CD34⁺ se pueden aislar de la sangre tal como se indica en la presente memoria. Se puede utilizar la centrifugación en contraflujo (elutriación) para enriquecer en células T a partir de células PBMC. Las células también se pueden aislar de otras células utilizando una variedad de técnicas, tales como el aislamiento y/o la activación con un anticuerpo de unión a un epítipo en la superficie celular del tipo de célula deseado, por ejemplo, algunos kits de aislamiento de células T utilizan perlas conjugadas con anticuerpos para activar las células y permitir después la separación en la columna con las mismas perlas. Otro método que se puede utilizar incluye la selección negativa utilizando anticuerpos contra marcadores de superficie celular para enriquecer selectivamente para un tipo de célula específico sin activar la célula mediante el acoplamiento al receptor.

Las células de médula ósea pueden obtenerse de la cresta ilíaca, fémures, tibias, columna vertebral, costillas u otros espacios medulares. La médula ósea se puede extraer del paciente y aislarse a través de diversas separaciones y procedimientos de lavado. Un procedimiento conocido para el aislamiento de las células de la médula ósea comprende las siguientes etapas: A) separación centrífuga de suspensión de médula ósea en tres fracciones y recolección de la fracción intermedia, o capa leucocitaria; B) la fracción de capa leucocitaria de la etapa (a) se centrifuga una vez más en un líquido de separación, habitualmente Ficoll (una marca comercial de Pharmacia Fine Chemicals AB), y se recoge una fracción intermedia que contiene las células de médula ósea, y c) lavado de la fracción recolectada en la etapa b) para la recuperación de células de médula ósea nuevamente transfundibles.

Si se desea utilizar una población de células enriquecidas en células T, tales poblaciones de células pueden obtenerse de una población mixta de células mediante leucaféresis y aféresis mecánica utilizando un separador de células de flujo continuo. Por ejemplo, las células T se pueden aislar de la capa leucocitaria mediante cualquier método conocido, incluyendo la separación en gradiente Ficoll-Hypaque[™], la separación en un gradiente de Percoll, o la elutriación.

En determinados aspectos, las células T son activadas por agentes que se unen a los receptores de las células T para inducir una cascada de señalización para la activación de las células T. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo

CD3. Para la expansión de las células T hasta un número significativo y un estado de proliferación para la reprogramación, también se puede utilizar una citoquina, tal como la IL-2. En un determinado aspecto, tanto anti-CD3 como anti-CD28 pueden ser utilizados para la activación de células T en donde está involucrada la coestimulación. En un aspecto alternativo, puede aplicarse el entrecruzamiento del anticuerpo anti-CD3, tal como anticuerpo anti-CD3 unido a placa. Si se utiliza anti-CD3 soluble para activar las células T en PBMC, el anticuerpo anti-CD3 soluble puede unirse a células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés) en el PBMC, que después presentan el anticuerpo a las células T. Si el anticuerpo soluble anti-CD3 solo se utiliza en una población de células T purificadas, resultaría anergia por las razones mencionadas anteriormente. Una determinada realización comprende el cultivo de células T en presencia de anti-CD3 (OKT3) e IL2, lo cual resulta ventajoso y conveniente porque no hay necesidad de usar perlas costosas y engorrosas o anticuerpos unidos a placas; después de añadir OKT3 e IL2, el entorno celular de las PBMC ayudaría a activar las células T. A continuación, las células T dominarían en número sobre los demás tipos de células en el cultivo de PBMC debido a la expansión preferente.

En determinados aspectos, la población inicial de células sanguíneas comprende células linfoblastoides, tales como las líneas celulares linfoblastoides (LCL). La generación de LCL es conocida de la técnica, por ejemplo, mediante infección de células B por el virus de Epstein-Barr (VEB) (Frisan et al., Virus Protocols, parte III, 125-127, 2001).

B. Emparejamiento de haplotipos de CMH

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

Debido a la importancia del HLA en el trasplante, los loci de HLA normalmente se tipifican serológicamente y mediante PCR para identificar los pares de donante-receptor favorables. La detección serológica de antígenos HLA de clase I y II se puede llevar a cabo mediante un ensayo de linfocitotoxicidad mediada por el complemento con linfocitos T o B purificados. Este procedimiento se utiliza predominantemente para emparejar los loci HLA-A y -B. La tipificación de tejidos basada en técnicas moleculares con frecuencia puede ser más precisa que los ensayos serológicos. Los métodos moleculares de baja resolución, tales como los métodos SSOP (por sus siglas en inglés, sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia), en los que los productos de PCR se someten a ensayo contra una serie de sondas de oligonucleótidos, se pueden utilizar para identificar antígenos HLA, y actualmente estos métodos son los métodos más habitualmente utilizados para la tipificación de HLA de clase II. Las técnicas de alta resolución tales como los métodos de SSP (por sus siglas en inglés, cebador específico de secuencia) que utilizan cebadores específicos de alelo para la amplificación por PCR pueden identificar alelos específicos del CMH.

La compatibilidad del CMH entre un donante y un receptor se incrementa significativamente si las células del donante son homocigóticas para HLA, es decir, contienen alelos idénticos para cada proteína presentadora de antígeno. La mayoría de los individuos son heterocigóticos para los genes de CMH de clase I y II, aunque determinados individuos son homocigóticos para estos genes. Estos individuos homocigóticos pueden servir como superdonantes y los injertos generados a partir de sus células pueden trasplantarse en todos los individuos que sean homocigóticos o heterocigóticos para ese haplotipo. Además, si las células homocigóticas de donantes presentan un haplotipo que se observa a alta frecuencia en una población, estas células pueden poseer una aplicación en terapias de trasplante para un gran número de individuos.

De acuerdo con ello, en algunas realizaciones, las células iPSC de los presentes métodos pueden producirse a partir de células somáticas del sujeto a tratar, u otro sujeto con el mismo o sustancialmente el mismo tipo de HLA que el del paciente. En un caso, los HLA principales (p. ej., los tres principales loci: HLA-A, HLA-B y HLA-DR) del donante son idénticos a los HLA principales del receptor. En algunos casos, el donante de células somáticas puede ser un superdonante; por lo tanto, las células iPSC derivadas de un superdonante homocigótico para CMH pueden utilizarse para generar HPC y, seguidamente, células inmunitarias, tales como células T. Por lo tanto, las células inmunitarias derivadas de un superdonante pueden ser trasplantadas en sujetos homocigóticos o heterocigóticos para ese haplotipo. Por ejemplo, las células inmunitarias pueden ser homocigóticas en dos alelos de HLA, tales como HLA-A y HLA-B. De esta manera, las células inmunitarias producidas a partir de superdonantes se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento, para producir células inmunitarias que potencialmente pueden "coincidir" con un gran número de receptores potenciales.

Por consiguiente, determinadas realizaciones de la presente exposición proporcionan un repositorio (p. ej., una biblioteca) de células inmunitarias homocigóticas para HLA (p. ej., células T, células NK y células dendríticas). Los

haplotipos de HLA representados en una biblioteca pueden reflejar los haplotipos de HLA más comunes observados en poblaciones humanas, p. ej., haplotipos de HLA comunes caucásicos, haplotipos de HLA comunes observados en individuos de ascendencia africana, haplotipos de HLA comunes asiáticos, haplotipos de HLA comunes hispanos comunes, haplotipos de HLA de nativos americanos comunes, etc. Por ejemplo, un solo haplotipo abundante puede estar presente en una proporción significativa de una población, permitiendo que una sola línea celular homocigótica de HLA sirva como donante histocompatible para un porcentaje significativo de pacientes. Una biblioteca incluye uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 10 a 15, 15 a 20, 20 a 25, 25 a 30, o más de 30 tipos diferentes de células homocigóticas para HLA. Una biblioteca de sujetos puede incluir una primera célula homocigótica para HLA, homocigótica para un primer haplotipo de HLA, y por lo menos una segunda célula homocigótica para HLA, homocigótica para un segundo haplotipo de HLA. Una biblioteca de sujetos puede incluir un solo tipo celular o puede incluir dos o más tipos celulares diferentes. Una biblioteca de sujetos puede ser catalogada, por ejemplo, por una base de datos informática consultable, en la que se almacena y puede buscarse información sobre el haplotipo de HLA, y opcionalmente información adicional, tal como marcadores de superficie celular, información cariotípica y similares.

Las células inmunitarias homocigóticas para HLA descritas en la presente memoria pueden encontrarse en un amplio abanico de aplicaciones clínicas que involucran el trasplante de células y/o tejidos. Las células inmunitarias homocigóticas para HLA son compatibles con un receptor y, por lo tanto, pueden introducirse en el receptor sin necesidad de terapia inmunosupresora, o por lo menos con una menor necesidad de terapia inmunosupresora. Un régimen de medicamentos inmunosupresores estándar cuesta miles de dólares al mes, y puede presentar efectos secundarios indeseables, incluyendo infecciones y cánceres que frecuentemente resultan potencialmente mortales y caros de tratar. Las actuales células inmunitarias homocigóticas para HLA superan de esta manera algunos de los obstáculos que actualmente limitan el uso de células humanas para aplicaciones clínicas.

C. Factores de reprogramación

En determinadas realizaciones, la población inicial de células somáticas es reprogramada a células iPS mediante la introducción de factores de reprogramación. La generación de células iPS es crucial en los factores de reprogramación utilizados para la inducción. Los siguientes factores o una combinación de los mismos podrían utilizarse en los métodos dados a conocer en la presente exposición. En determinados aspectos, los ácidos nucleicos que codifican Sox y Oct (particularmente Oct3/4) se incluirán en el vector de reprogramación. Por ejemplo, uno o más vectores de reprogramación pueden incluir casetes de expresión que codifican Sox2, Oct4, Nanog y opcionalmente Lin28, o casetes de expresión que codifican Sox2, Oct4, Klf4 y opcionalmente c-Myc, o casetes de expresión que codifican Sox2, Oct4, y opcionalmente Esrrb, o casetes de expresión que codifican Sox2, Oct4, Nanog, Lin28, Klf4, c-Myc, y opcionalmente el antígeno T grande de SV40. Los ácidos nucleicos codificantes de estos factores de reprogramación pueden estar comprendidos en el mismo casete de expresión, en diferentes casetes de expresión, en el mismo vector de reprogramación o en diferentes vectores de reprogramación.

Oct4 y ciertos elementos de la familia de genes Sox (Sox1, Sox2, Sox3 y Sox15) han sido identificados como reguladores transcripcionales cruciales que participan en el proceso de inducción y cuya ausencia hace imposible la inducción. Sin embargo, se han identificado genes adicionales, incluyendo determinados miembros de la familia KLF (Klf1, Klf2, Klf4 y Klf5), de la familia Myc (c-Myc, L-Myc y N-Myc), Nanog y Lin28, para incrementar la eficiencia de la inducción.

Oct4 (Pou5f1) es uno de los factores de transcripción octámeros ("Oct"), y desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la pluripotencia. La ausencia de Oct4 en las células Oct4⁺, tales como blastómeros y células madre embrionarias, lleva a la diferenciación espontánea de trofoblastos, y la presencia de Oct4 da lugar a la pluripotencia y al potencial de diferenciación de las células madre embrionarias. Otros diversos genes de la familia "Oct", incluyendo parientes cercanos de Oct4, Oct1 y Oct6, no conseguir provocar la inducción, demostrando de esta manera la exclusividad de Oct-4 en el proceso de inducción.

La familia de genes Sox está asociada al mantenimiento de una pluripotencia similar a Oct4, aunque está asociada a células madre multipotentes y unipotentes en contraste con Oct4, que se expresa exclusivamente en células madre pluripotentes. Aunque Sox2 fue el gen inicial utilizado para la inducción de reprogramación, se ha encontrado que otros genes de la familia Sox funcionan bien en el proceso de inducción. Sox1 produce células iPS con una eficiencia similar a Sox2, y los genes Sox3, Sox15 y Sox18 también generan células iPS, aunque con una eficiencia menor.

En las células madre embrionarias, Nanog, junto con Oct4 y Sox2, resulta necesario para promover la pluripotencia. Por lo tanto, resultó inesperada el informe de Yamanaka et al. de que Nanog es innecesario para la inducción, aunque Thomson et al. ha informado de que resulta posible generar células iPS con Nanog como uno de los factores.

Lin28 es una proteína de unión a ARNm expresada en células madre embrionarias y células de carcinoma embrionarias asociadas con la diferenciación y proliferación. Thomson et al. han demostrado que es un factor en la generación de iPS, aunque no resulta necesario.

Klf4 de la familia de genes KLF fue identificado inicialmente por Yamanaka et al., 2007 y confirmado por Jaenisch et al., 1988 como un factor para la generación de células iPS de ratón y fue demostrado por Yamanaka et al., 2007 como

un factor para la generación de células iPS humanas. Sin embargo, Thompson et al. han informado de que Klf4 resultaba innecesario para la generación de células iPS humanas y de hecho no consigue generar células iPS humanas. Se ha encontrado que Klf2 y Klf4 son factores capaces de generar células iPS, y los genes relacionados Klf1 y Klf5 también lo hacen, aunque con una eficiencia menor.

La familia de genes Myc son protooncogenes implicados en el cáncer. Yamanaka et al., 2007 y Jaenisch et al., 1988 han demostrado que c-Myc es un factor implicado en la generación de células iPS de ratón y Yamanaka et al., 2007 han demostrado que es un factor implicado en la generación de células iPS humanas. Sin embargo, Thomson et al. y Yamanaka et al. han informado de que c-Myc resulta innecesario para la generación de células iPS humanas. El antígeno grande del SV40 puede utilizarse para reducir o prevenir la citotoxicidad que puede producirse al expresarse c-Myc.

Las proteínas de reprogramación utilizadas en la presente exposición pueden ser sustituidas por homólogos de proteínas con aproximadamente las mismas funciones de reprogramación. Los ácidos nucleicos que codifican esos homólogos también podrían utilizarse para la reprogramación. Entre las sustituciones conservadoras de aminoácidos se pueden incluir, por ejemplo, aspártico-glutámico como aminoácidos ácidos polares; lisina/arginina/histidina como aminoácidos básicos polares; leucina/isoleucina/metionina/valina/alanina/glicina/prolina como aminoácidos no polares o hidrofóbicos; serina/treonina como aminoácidos hidrófilos polares o sin carga. La sustitución conservadora de aminoácidos también incluye agrupaciones basadas en cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que presentan cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que presentan cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que presentan cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que presentan cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que presentan cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que presentan cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Por ejemplo, sería razonable esperar que el reemplazo de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado no presentará un efecto importante sobre las propiedades del polipéptido resultante. Puede determinarse fácilmente si un cambio de aminoácidos resulta en un polipéptido funcional, mediante el ensayo de la actividad específica del polipéptido.

D. Reprogramación de células sanguíneas

En algunas realizaciones, la población inicial de células sanguíneas se reprograma a células iPSC mediante los métodos descritos en la publicación de patente US n.º 2014/0315304. En determinados aspectos de la presente exposición, los factores de reprogramación se expresan a partir de casetes de expresión comprendidos en uno o más vectores, tal como un vector de integración o un vector episómico. En un aspecto adicional, las proteínas de reprogramación podrían introducirse directamente en las células somáticas mediante transducción de proteínas.

El experto en la materia poseerá los conocimientos para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 2001 y Ausubel et al., 1996). Entre los vectores se incluyen, aunque sin limitación, plásmidos, cosmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales), y cromosomas artificiales (p. ej., los YAC), tales como vectores retrovíricos (p. ej., derivados de vectores del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV, SNV, etc.), vectores lentivíricos (p. ej., derivados del VIH-1, VIH-2, SIV, BIV, FIV, etc.), vectores adenovíricos (Ad), incluidos los vectores competentes en replicación, deficientes en replicación y formas de vectores sin secuencias, vectores víricos adenoasociados (VAA), vectores del virus 40 del simio (SV-40), vectores del virus del papiloma bovino, vectores del virus de Epstein-Barr, vectores del virus del herpes, vectores del virus Vaccinia, vectores del virus del sarcoma murino de Harvey, vectores del virus del tumor mamario murino y vectores del virus del sarcoma de Rous.

1. Vectores víricos

Los vectores víricos pueden proporcionarse en determinados aspectos de la presente exposición. Al generar vectores víricos recombinantes, los genes no esenciales normalmente son reemplazados por un gen o secuencia codificante para una proteína heteróloga (o no nativa). Un vector vírico es un tipo de constructo de expresión que utiliza secuencias víricas para introducir ácido nucleico y posiblemente proteínas en una célula. La capacidad de determinados virus para infectar células o entrar en las células a través de la endocitosis mediada por receptores, y para integrarse en los genomas de las células huésped y expresar genes víricos de manera estable y eficiente, los ha convertido en candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos foráneos hasta el interior de células (p. ej., células de mamíferos). A continuación se describen ejemplos no limitativos de vectores víricos que pueden utilizarse para administrar un ácido nucleico de determinados aspectos de la presente exposición.

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

Con el fin de construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico en el genoma vírico en lugar de determinadas

secuencias víricas para producir un virus que es defectuoso en la replicación. Con el fin de producir viriones, se construye una línea celular de empaquetado que contiene los genes *gag*, *pol* y *env*, aunque sin la repetición terminal larga (RTL) y los componentes de empaquetado (Mann et al., 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con el RTL retrovítico y las secuencias de empaquetado, se introduce en una línea celular especial (p. ej., mediante con fosfato cálcico), la secuencia de empaquetado permite que la transcripción del ARN del plásmido recombinante sea empaquetada en partículas víricas, que luego se secretan al medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). El medio que contiene los retrovirus recombinantes seguidamente se recolecta, se concentra opcionalmente y se utiliza para la transferencia de genes. Los vectores retrovíricos son capaces de infectar una amplia variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de las células huésped (Paskind et al., 1975).

Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovíricos comunes *gag*, *pol* y *env*, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivíricos son bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1997; Blomer et al., 1997; patentes US n.º 6.013.516 y n.º 5.994.136).

Los vectores lentivíricos recombinantes son capaces de infectar células que no se dividen y se pueden utilizar para la transferencia de genes *in vivo* y *ex vivo* y la expresión de secuencias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se describe un lentivirus recombinante capaz de infectar una célula no proliferativa, en donde una célula huésped adecuada es transfectada con dos o más vectores portadores de funciones de empaquetado, es decir, *gag*, *pol* y *env*, así como *rev* y *tat*, en la patente US n.º 5.994.136.

2. Vectores episómicos

El uso de vectores extracromosómicos basados en plásmidos o liposomas (es decir, episómicos) también puede proporcionarse en determinados aspectos de la presente exposición. Entre dichos vectores episómicos se pueden incluir, p. ej., vectores basados en oriP, y/o vectores que codifican un derivado de EBNA-1. Estos vectores pueden permitir la introducción de grandes fragmentos de ADN en una célula y su mantenimiento extracromosómico, replicación una vez por ciclo celular, repartición eficiente entre las células hijas, y no inducen sustancialmente ninguna respuesta inmunitaria.

En particular, EBNA-1, la única proteína vírica necesaria para la replicación del vector de expresión basado en oriP, no induce una respuesta inmunitaria celular porque ha desarrollado un mecanismo eficiente para eludir el procesamiento requerido para la presentación de sus antígenos sobre las moléculas de CMH de clase I (Levitskaya et al., 1997). Además, EBNA-1 puede actuar *in trans* para mejorar la expresión del gen clonado, induciendo la expresión de un gen clonado hasta 100 veces en algunas líneas celulares (Langle-Rouault et al., 1998; Evans et al., 1997). Finalmente, la fabricación de tales vectores de expresión basados en oriP resulta económica.

Entre otros vectores extracromosómicos se incluyen otros vectores basados en el virus herpes linfotrófico. El virus herpes linfotrófico es un virus herpes que se replica en un linfoblasto (p. ej., un linfoblasto B humano) y se convierte en un plásmido durante una parte de su ciclo de vida natural. El virus herpes simple (VHS) no es un virus herpes "linfotrófico". Entre los virus herpes linfotróficos de ejemplo se incluyen, aunque sin limitación, el VEB, el virus del herpes del sarcoma de Kaposi (VHSK), el virus del herpes saimiri (HS) y el virus de la enfermedad de Marek (VEM). También se encuentran contempladas otras fuentes de vectores de base episómica, tales como ARS de levadura, adenovirus, SV40 o VPB.

El experto en la materia poseerá los conocimientos para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándares (ver, por ejemplo, Maniatis et al., 1988 y Ausubel et al., 1994).

Los vectores pueden comprender, además, otros componentes o funcionalidades que modulan adicionalmente la transferencia de genes y/o la expresión génica, o que de otra manera proporcionan propiedades beneficiosas a las células diana. Entre tales otros componentes se incluyen, por ejemplo, componentes que influyen en la unión a células o el reconocimiento de las mismas (incluidos los componentes que actúan como mediadores en la unión específica de tipo celular o de tejido); componentes que influyen en la absorción del vector ácido nucleico por la célula; componentes que influyen en la localización del polinucleótido dentro de la célula después de su incorporación (como agentes que actúan de mediador en la localización nuclear), y componentes que influyen en la expresión del polinucleótido.

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

3. Sistema basado en transposones

En determinados aspectos, la transferencia de factores de programación puede utilizar un sistema transposón-transposasa. Por ejemplo, el sistema transposón-transposasa podría ser el bien conocido sistema "Sleeping Beauty", el sistema transposon-transposasa "Frog Prince" (para una descripción de este último, ver, p. ej., el documento n.º EP1507865), o el sistema de transposon específico de TTAA "PiggyBac".

Los transposones son secuencias de ADN que pueden moverse a diferentes posiciones dentro del genoma de una sola célula, un proceso llamado transposición. En el proceso, pueden causar mutaciones y modificar la cantidad de ADN en el genoma. Los transposones inicialmente se denominaban "genes saltantes" (en inglés, "jumping genes"), y son ejemplos de elementos génicos móviles.

Existe una variedad de elementos génicos móviles, y pueden agruparse en función de su mecanismo de transposición. Los elementos génicos móviles de clase I, o retrotransposones, se copian primero al ser transcritos en ARN, y después son transcritos inversamente a ADN por la transcriptasa inversa, y después son insertados en otra posición en el genoma. Los elementos génicos móviles de clase II se mueven directamente de una posición a otra utilizando una transposasa para "cortarlos y pegarlos" dentro del genoma.

En realizaciones particulares, los constructos (p. ej., el constructo multilíneal) proporcionados en la presente exposición utilizan un sistema de expresión PiggyBac. Los transposones de ADN de PiggyBac (PB) se movilizan a través de un mecanismo de "cortar y pegar" mediante el cual un enzima transposasa (PB transposasa), codificado por el propio transposón, extrae y reintegra el transposón en otros sitios dentro del genoma. La PB transposasa reconoce específicamente las repeticiones terminales invertidas (RTI) de PB que flanquean el transposón; se une a estas secuencias y cataliza la extracción del transposón. A continuación, PB se integra en los sitios de TTAA en todo el genoma, de una manera relativamente aleatoria. Para la creación de mutaciones de trampa génica (o adaptada para generar animales transgénicos), la transposasa se suministra en *trans* en un plásmido y se cotransfecta con un plásmido que contiene el transposón donante, un transposón recombinante que comprende una trampa génica flanqueada por los sitios de unión para la transposasa (RTI). La transposasa catalizará la excisión del transposón respecto del plásmido y su posterior integración en el genoma. La integración dentro de una región codificante capturará los elementos necesarios para la expresión de la trampa génica. PB posee varias propiedades ideales: (1) se inserta preferentemente dentro de los genes (50 % a 67 % de las inserciones afectan a genes) (2) no muestra salto local (cobertura genómica generalizada) (3) no es sensible a la inhibición de la sobreproducción, en la que los niveles elevados de la transposasa causan una disminución de la transposición (4) se extrae limpiamente de un sitio donante, sin dejar "huella", a diferencia de Sleeping Beauty.

4. Elementos reguladores

Los casetes de expresión incluidos en los vectores de reprogramación útiles en la presente exposición contienen preferentemente (en una dirección 5'-a-3') un promotor transcripcional eucariótico operablemente ligado a una secuencia codificante de proteína, señales de procesamiento, incluyendo secuencias intermedias, y una secuencia de terminación de transcripción/poliadenilación.

a. Promotores/intensificadores

Los constructos de expresión proporcionados en la presente memoria comprenden promotores para controlar la expresión de los genes de programación. Un promotor generalmente comprende una secuencia que funciona para posicionar el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El ejemplo mejor conocido de lo anterior es la caja TATA, aunque en algunos promotores que carecen de una caja TATA, tales como, por ejemplo, el promotor del gen terminal de la desoxinucleotidiltransferasa de mamífero y el promotor de los genes tardíos del SV40, un elemento discreto que recubre el sitio de inicio en sí ayuda a fijar el lugar de inicio. Unos elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de inicio transcripcional. Normalmente, estos se encuentran en la región 30-110 pb cadena arriba del sitio de inicio, aunque se ha demostrado que varios promotores también contienen elementos funcionales cadena abajo del sitio de inicio. Para llevar una secuencia codificante "bajo el control de" un promotor, se posiciona el extremo 5' del sitio de inicio de transcripción del marco de lectura transcripcional "cadena abajo" (es decir, en el lado 3') del promotor seleccionado. El promotor "cadena arriba" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

El espaciado entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de modo que la función promotora se conserva cuando los elementos están invertidos o desplazados unos respecto a otros. En el promotor tk, el espaciado entre los elementos promotores se puede aumentar a 50 pb de separación antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, aparentemente los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independientemente para activar la transcripción. Un promotor puede o no ser utilizado junto con un "intensificador", que se refiere a una secuencia reguladora de acción en *cis* involucrada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede estar naturalmente asociado a una secuencia de ácido nucleico, tal como puede obtenerse mediante aislamiento de las secuencias 5' no codificantes situadas cadena arriba del segmento de codificación y/o exón. Dicho promotor puede denominarse "endógeno". De manera similar, un intensificador puede ser uno naturalmente asociado a una secuencia de ácido nucleico, ubicado cadena abajo o cadenas arriba de esa secuencia. Alternativamente, se obtendrán determinadas ventajas al posicionar el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que normalmente no está asociado a una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un intensificador recombinante o heterólogo se refiere, además, a un intensificador no asociado normalmente a una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Tales promotores o intensificadores pueden incluir promotores o intensificadores de otros genes, y promotores o intensificadores aislados de cualquier otro virus, o de células procariotas o eucariotas, y promotores o intensificadores que no "ocurren naturalmente", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras transcripcionales, y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, entre los promotores que se utilizan más comúnmente en la construcción del ADN recombinante se incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa (penicilinas), lactosa y triptófano (trp). Además de producir secuencias de ácidos nucleicos de promotores y intensificadores sintéticamente, pueden producirse secuencias utilizando la tecnología de clonación recombinante y/o amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo PCR™, en relación con las composiciones dadas a conocer en la presente memoria (ver las patentes US n.º 4.683.202y n.º 5.928.906). Además, se encuentra contemplado que también puedan utilizarse secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias dentro de orgánulos no nucleares, tales como mitocondrias, cloroplastos y similares.

Naturalmente, será importante utilizar un promotor y/o intensificador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el orgánulo, tipo celular, tejido, órgano u organismo seleccionado para la expresión. El experto en la materia de la biología molecular generalmente conocerá el uso de promotores, intensificadores y combinaciones de tipo celular para la expresión de proteínas (ver, por ejemplo, Sambrook et al. 1989). Los promotores utilizados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles y/o útiles bajo las condiciones apropiadas para dirigir una expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como resulta ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

Además, también podría utilizarse cualquier combinación de promotor/intensificador (según, por ejemplo, la base de datos de promotores eucarióticos EPDB) para el control de la expresión. El uso de un sistema de expresión citoplasmática T3, T7 o SP6 es otra posible realización. Las células eucariotas pueden permitir la transcripción citoplasmática a partir de determinados promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, ya sea como parte del complejo de transferencia o en forma de un constructo adicional de expresión génica.

Entre los ejemplos no limitativos de promotores se incluyen promotores víricos tempranos o tardíos, tales como promotores tempranos o tardíos del SV40, promotores tempranos inmediatos del citomegalovirus (CMV), promotores tempranos del virus del sarcoma Rous (VSR); promotores de células eucariotas, tales como, p. ej., promotor de actina beta (Ng, 1989; Quitsche et al., 1989), promotor de GADPH (Alexander et al., 1988, Ercolani et al., 1988), promotor de metalotioneína (Karin et al., 1989; Richards et al., 1984) y promotores de elementos de respuesta concatenados, tales como promotores de elemento de respuesta a AMP cíclico (cre), promotores de elementos de respuesta sérica (sre), promotores de éster de forbol (TPA) y promotores de elementos de respuesta (tre) en proximidad a una caja TATA mínima. También resulta posible utilizar secuencias de promotor de la hormona del crecimiento humano (p. ej., el promotor mínimo de la hormona de crecimiento humano descrito en Genbank, n.º de acceso X05244, nucleótidos 283 a 341) o un promotor de tumor mamario de ratón (disponible de ATCC, n.º de cat. 45007).

La expresión transgénica específica de tejido, especialmente para la expresión génica de informadores en células hematopoyéticas y precursores de células hematopoyéticas derivadas de la programación, puede resultar deseable como una forma de identificar células hematopoyéticas y precursores derivados. Para aumentar tanto la especificidad como la actividad, se ha contemplado el uso de elementos reguladores que actúan en *cis*. Por ejemplo, se puede usar un promotor específico de células hematopoyéticas. Muchos de tales promotores específicos de células hematopoyéticas son conocidos de la técnica.

En determinados aspectos, los métodos de la presente exposición se refieren, además, a secuencias de intensificador, es decir, secuencias de ácido nucleico que incrementan la actividad de un promotor y que poseen el potencial de actuar en *cis*, e independientemente de su orientación, incluso a distancias relativamente largas (hasta varias kilobases de distancia del promotor diana). Sin embargo, la función de intensificador no está necesariamente restringida a distancias tan largas, ya que también pueden funcionar en estrecha proximidad a un promotor dado.

Se han identificado muchas secuencias de promotores e intensificadores de células hematopoyéticas, y pueden resultar útiles en los presentes métodos. Ver, p. ej., la patente US n.º 5.556.954, la solicitud de patente US n.º 2002/0055144 y la solicitud de patente US n.º 2009/0148425.

b. Señales de inicio y expresión ligada

También puede utilizarse una señal de inicio específica en los constructos de expresión proporcionados en la presente

exposición para una traducción eficiente de las secuencias codificantes. Entre estas señales se incluyen el codón de inicio ATG o secuencias contiguas. Es posible que necesiten proporcionarse señales de control de traducción exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. El experto habitual en la materia será fácilmente capaz de determinar lo anterior y proporcionar las señales necesarias. Es bien conocido que el codón de inicio debe estar "en el mismo marco" que el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Las señales de control traduccional exógenas y los codones de inicio pueden ser naturales o sintéticos. La eficiencia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos intensificadores de transcripción apropiados.

En determinadas realizaciones, se utilizan elementos de sitio de entrada ribosómica interno (IRES, por sus siglas en inglés) para crear mensajes multigénicos (policistrónicos). Los elementos IRES pueden eludir el modelo de escaneo ribosómico de la traducción dependiente de caperuza metilada 5' e iniciar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito elementos IRES de dos miembros de la familia picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos de IRES se pueden asociar a marcos de lectura abiertos heterólogos. Se pueden transcribir múltiples marcos de lectura abiertos juntos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a los ribosomas para una traducción eficiente. Pueden expresarse múltiples genes de manera eficiente usando un solo promotor/intensificador para transcribir un solo mensaje (ver las patentes US n.º 5.925.565y n.º 5.935.819).

Además, determinados elementos de secuencia 2A podrían usarse para crear una expresión ligada o coexpresión de genes de programación en los constructos proporcionados en la presente exposición. Por ejemplo, las secuencias de escisión podrían usarse para coexpresar genes mediante la unión de marcos de lectura abiertos para formar un solo cistrón. Una secuencia de escisión de ejemplo es la secuencia F2A (por sus siglas en inglés, virus de la fiebre aftosa 2A) o una secuencia "de tipo 2A" (p. ej., virus *Thosea asigna* 2A; T2A) (Minskaia y Ryan, 2013). En realizaciones particulares, se utiliza un péptido de escisión de F2A para unir la expresión de los genes en el constructo multilíneal.

c. Orígenes de replicación

Con el fin de propagar un vector en una célula huésped, puede contener uno o más sitios de origen de replicación (frecuentemente denominados "ori"), por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico correspondiente al oriP del VEB, tal como se ha descrito anteriormente, o un oriP genéticamente modificado con una función similar o elevada en la programación, que es una secuencia específica de ácido nucleico en la que se inicia la replicación. Alternativamente, se puede utilizar un origen de replicación de otro virus que se replica extracromosómicamente, tal como se ha indicado anteriormente, o una secuencia de replicación autónoma (SRA).

d. Marcadores de selección y seleccionables

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

Por lo general, la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, son marcadores de selección útiles los genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de transformantes en función de la implementación de condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores, incluyendo marcadores seleccionables tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Alternativamente, se pueden utilizar enzimas seleccionables a modo de marcadores de selección negativos, tales como la timidina quinasa (*tk*) del virus del herpes simple o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). El experto en la materia también conocerá cómo utilizar los marcadores inmunitarios, posiblemente junto con el análisis de FACS. No se cree que el marcador utilizado sea importante, siempre y cuando sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. El experto en la materia conocerá perfectamente ejemplos adicionales de marcadores de selección y seleccionables.

La introducción de un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, en las células madre pluripotentes para ser programadas a células precursoras hematopoyéticas con la presente exposición puede utilizar cualquier método adecuado para la administración de ácido nucleico para la transformación de una célula, tal como se describe en el presente documento o tal como conocería el experto habitual en la materia. Entre estos métodos se incluyen, aunque sin limitación, la transferencia directa de ADN, por ejemplo, mediante transfección *ex vivo* (Wilson et al., 1989; Nabel et al.), mediante inyección (patente US n.º 5.994.624, n.º 5.981.274, n.º 5.945.100, n.º 5.780.448, n.º 5.736.524, n.º 5.702.932, n.º 5.656.610, n.º 5.589.466y n.º 5.580.859), incluyendo la microinyección (Harland y Weintraub, 1985; patente US n.º 5.789.215); mediante electroporación (patente US n.º 5.384.253; Tur-Kaspa et al., 1986; Potter et al., 1984); mediante precipitación con fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippeet al., 1990); utilizando

DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); mediante carga sónica directa (Fechheimer et al., 1987); mediante transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991) y mediante transfección mediada por receptores (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988); mediante bombardeo con microproyectiles (solicitudes de patente PCT n.º WO 94/09699y n.º 95/06128; patentes US n.º. 5.610.042, n.º 5.322.783, n.º 5.563.055, n.º 5.550.318, n.º 5.538.877y n.º 5.538.880); mediante agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppler et al., 1990; patentes US n.º 5.302.523y n.º 5.464.765); mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes US n.º 5.591.616y n.º 5.563.055); mediante incorporación de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus et al., 1985), y cualquier combinación de dichos métodos. Mediante la aplicación de técnicas como las indicadas, pueden transformarse estable o transitoriamente uno o más orgánulos, células, tejidos u organismos.

III. Producción de células inmunitarias

A. Producción de células HPC

Determinadas realizaciones de la presente exposición se refieren a la diferenciación de células iPSC derivadas de células somáticas en células HPC. Las iPSC derivadas de células somáticas pueden diferenciarse en HPC mediante métodos conocidos de la técnica, tales como los descritos en la patente US n.º 8.372.642. Por ejemplo, pueden utilizarse combinaciones de BMP4, VEGF, ligando de Flt3, IL-3 y GM-CSF para promover la diferenciación hematopoyética. En determinadas realizaciones, la exposición secuencial de cultivos celulares a un primer medio para preparar PSC para la diferenciación, un segundo medio que incluye BMP4, VEGF y FGF, seguido por el cultivo en un tercer medio que incluye ligando de Flt3, SCF, TPO, IL-3 e IL-6 puede diferenciar las células pluripotentes en células precursoras hematopoyéticas y células hematopoyéticas. El segundo medio definido puede comprender, además, heparina. Además, la inclusión de FGF-2 (50 ng/ml) en los medios que contienen BMP4 y VEGF puede mejorar la eficiencia de la generación de células precursoras hematopoyéticas a partir de células pluripotentes. Además, la inclusión de un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) (p. ej., CHIR99021, BIO y SB-216763) en los primeros medios definidos puede mejorar adicionalmente la producción de HPC.

La diferenciación de células pluripotentes en células precursoras hematopoyéticas puede llevarse a cabo utilizando condiciones definidas o no definidas. En general, se apreciará que las condiciones definidas resultan generalmente preferibles en realizaciones en las que las células resultantes están destinadas a ser administradas a un sujeto humano. Las células madre hematopoyéticas pueden derivarse de células madre pluripotentes bajo condiciones definidas (p. ej., utilizando un medio TeSR), y pueden generarse células hematopoyéticas a partir de cuerpos embrioides derivados de células pluripotentes. En otras realizaciones, las células pluripotentes pueden cocultivarse sobre células OP9 o células fibroblásticas embrionarias de ratón y posteriormente diferenciarse.

Se puede permitir que las células pluripotentes formen cuerpos embrioides o agregados como parte del proceso de diferenciación. La formación de "cuerpos embrioides" (CE), o grupos de células en crecimiento, con el fin de inducir la diferenciación generalmente implica la agregación *in vitro* de células madre pluripotentes humanas en los CE y permite la diferenciación espontánea y aleatoria de células madre pluripotentes humanas en múltiples tipos de tejido que representan los orígenes de endodermo, ectodermo y mesodermo. De esta manera, pueden utilizarse CE tridimensionales para producir alguna fracción de las células hematopoyéticas y células endoteliales.

Los CE pueden formarse utilizando el siguiente protocolo. Las células iPSC no diferenciadas y adaptadas al crecimiento libre de células nodriza en placas recubiertas con Matrigel™ pueden recolectarse a la confluencia utilizando un tratamiento de EDTA 0,5 M durante unos 8 a 10 minutos a temperatura ambiente. Se aspira el EDTA después de la incubación y pueden formarse los CE mediante la recolección de las células en medio SFD que contienen inhibidor Rock o blebistatina. Puede cambiarse el medio al día siguiente a medio de diferenciación EB1 que contengan diferentes formulaciones de citoquinas. Las células se siembra en placa a una densidad de 0,25-0,5 millones de células por ml para promover la formación de agregados.

Para promover la formación de agregados, las células pueden transferirse a placas de baja adherencia para una incubación durante la noche en medio de diferenciación libre de suero (SFD, por sus siglas en inglés), que consiste en IMDM al 75 % (Gibco), medio de Ham F12 modificado al 25 % (Cellgro) suplementado con N2 al 0,05 % y B-27 sin suplementos de AR, 1-glutamina 200 mM, 0,05 mg/ml de sal de ácido ascórbico-2-fosfato de magnesio (Asc 2-P) (WAKO), y $4,5 \times 10^{-4}$ MTG. Al día siguiente pueden recolectarse las células de cada pocillo y centrifugarse. A continuación, pueden resuspenderse las células en "medio de diferenciación EB", que consiste en medio basal SFD suplementado con aproximadamente 50 ng/ml de factor morfogenético óseo (BMP-4, por sus siglas en inglés), aproximadamente 50 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y 50 ng/ml de FGF zb durante los primeros cuatro días de diferenciación. Se sustituye la mitad del medio de las células cada 48 horas. En el quinto día de diferenciación, se sustituye el medio por un segundo medio compuesto por medio SFD suplementado con 50 ng/ml de factor de células madre (SCF, por sus siglas en inglés), aproximadamente 50 ng/ml de ligando de Flt-3 (Flt-3L), 50 ng/ml de interleuquina-6 (IL-6), 50 ng/ml de interleuquina-3 (IL-3) y 50 ng/ml de trombopoyetina (TPO). Se sustituyó la mitad del medio de las células cada 48 horas con medio de diferenciación fresco. Los cambios de medio se llevaron a cabo mediante centrifugación de los cultivos de diferenciación a 300 g durante 5 minutos y aspiración de la mitad del volumen de los cultivos en diferenciación, y reposición de lo extraído.

con medio fresco. En determinadas realizaciones, el medio de diferenciación EB puede incluir aproximadamente BMP4 (p. ej., aproximadamente 50 ng/ml), VEGF (p. ej., aproximadamente 50 ng/ml) y opcionalmente FGF-2 (p. ej., aproximadamente 25-75 ng/ml o aproximadamente 50 ng/ml). Puede aspirarse el sobrenadante y reemplazarse con medio de diferenciación fresco. Alternativamente, puede sustituirse la mitad del medio de las células cada dos días por medio fresco. Las células pueden recolectarse en diferentes puntos temporales durante el proceso de diferenciación.

Las células precursoras hematopoyéticas se pueden cultivar a partir de células madre pluripotentes utilizando un medio definido. Se describen los métodos para la diferenciación de células pluripotentes en células madre CD34 hematopoyéticas utilizando un medio definido en, p. ej., la solicitud n.º US 12/715.136. Se prevé que estos métodos puedan utilizarse con la presente exposición.

Por ejemplo, se puede utilizar un medio definido para inducir la diferenciación hematopoyética de CD34⁺. El medio definido puede contener los factores de crecimiento BMP-4, VEGF, ligando de Flt3, IL-3 y/o GM-CSF. Pueden cultivarse células pluripotentes en un primer medio definido que comprende BMP4, VEGF y opcionalmente FGF-2, seguido del cultivo en un segundo medio que comprende ya sea (ligando de Flt3, IL-3 y GM-CSF) o (ligando de Flt3, IL-3, IL-6 y TPO). El primer y segundo medio pueden incluir, además, uno o más de SCF, IL-6, G-CSF, EPO, FGF-2, y/o TPO. Las condiciones sustancialmente hipóxicas (p. ej., menos de 20 % de O₂) pueden promover adicionalmente la diferenciación hematopoyética o endotelial.

Las células pueden individualizarse sustancialmente a través de medios mecánicos o enzimáticos (p. ej., utilizando una tripsina o TrypLE™). También puede incluirse en el medio un inhibidor ROCK (p. ej., H1152 o Y-27632). Se prevé que estos enfoques puedan ser automatizados utilizando, p. ej., la automatización robótica.

En determinadas realizaciones, se pueden usar condiciones sustancialmente hipóxicas para promover la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras hematopoyéticas. Tal como reconocería el experto en la materia, un contenido de oxígeno atmosférico inferior al 20,8 % sería considerado hipóxico. Las células humanas en cultivo pueden crecer bajo condiciones atmosféricas con un contenido reducido de oxígeno en comparación con el aire ambiente. Esta hipoxia relativa puede conseguirse mediante la reducción de la exposición del medio de cultivo al oxígeno atmosférico. Las células embrionarias se desarrollan normalmente *in vivo* bajo condiciones reducidas de oxígeno, generalmente de entre 1 % y aproximadamente 6 % de oxígeno atmosférico, con dióxido de carbono a niveles ambientales. Sin respaldo teórico, se espera que las condiciones hipóxicas pueden imitar un aspecto de determinadas condiciones de desarrollo embrionario. Tal como se muestra en los siguientes ejemplos, pueden utilizarse condiciones hipóxicas en determinadas realizaciones para promover una diferenciación adicional de las células pluripotentes, tal como las iPSC o hESC, en un tipo celular más diferenciado, tal como las células precursoras hematopoyéticas.

En determinadas realizaciones, se pueden usar condiciones sustancialmente hipóxicas para promover la diferenciación de células pluripotentes en células progenitoras hematopoyéticas. En determinadas realizaciones, se puede utilizar un contenido de oxígeno atmosférico inferior a aproximadamente 20 %, inferior a aproximadamente 19 %, inferior a aproximadamente 18 %, inferior a aproximadamente 17 %, inferior a aproximadamente 16 %, inferior a aproximadamente 15 %, inferior a aproximadamente 14 %, inferior a aproximadamente 13 %, inferior a aproximadamente 12 %, inferior a aproximadamente 11 %, inferior a aproximadamente 10 %, inferior a aproximadamente 9 %, inferior a aproximadamente 8 %, inferior a aproximadamente 7 %, inferior a aproximadamente 6 %, inferior a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 5 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 2 %, o aproximadamente 1 %, para promover la diferenciación en células precursoras hematopoyéticas. En determinadas realizaciones, la atmósfera hipóxica comprende aproximadamente 5 % de gas oxígeno.

Independientemente del medio específico que se utilice en cualquier expansión dada de células progenitoras hematopoyéticas, el medio utilizado se suplementa preferentemente con por lo menos una citoquina a una concentración de entre aproximadamente 0,1 ng/ml y aproximadamente 500 ng/ml, más generalmente de entre 10 ng/ml y 100 ng/ml. Entre las citoquinas adecuadas se incluyen, aunque sin limitación, el ligando de c-kit (KL) (también llamado factor Steel (STI), factor de crecimiento de mastocitos (MGF, por sus siglas en inglés) y factor de células madre (SCF)), IL-6, G-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-1 α , IL-11 MIP-1 α , LIF, ligando de c-mpl/TPO y ligando de flk2/flk3 (Flt2L o Flt3L). (Nicola et al., 1979; Golde et al., 1980; Lusk, 1981; Abboud et al., 1981; Okabe, 1982; Fauser et al., 1981). En particular, el cultivo incluirá por lo menos uno de SCF, Flt3L y TPO. Más particularmente, el cultivo incluirá SCF, Flt3L y TPO.

En una realización, las citoquinas están contenidas en el medio y se reponen mediante perfusión del medio. Alternativamente, cuando se utiliza un sistema de biorreactor, las citoquinas pueden añadirse por separado, sin perfusión del medio, en forma de una solución concentrada a través de puertos de entrada separados. Cuando las citoquinas se añaden sin perfusión, normalmente se añaden como una solución de 10x a 100x en una cantidad de entre un décimo y 1/100 del volumen en los biorreactores, añadiendo citoquinas nuevas aproximadamente cada 2 a 4 días. Además, las citoquinas concentradas nuevas también se pueden añadir por separado, a las citoquinas en el medio perfundido.

En algunas realizaciones, las HPC muestran una proteína 2 de unión a metil-CpG (MeCP2) alterada y se cultivan bajo condiciones que promueven la diferenciación mieloide o la diferenciación linfóide. En algunos aspectos, las HPC expresan un MeCP2 no funcional que esencialmente no se une al ADN metilado. En determinados aspectos, las HPC no expresan MeCP2 a niveles que sean suficientes para producir la actividad de unión al ADN de MeCP2. En aspectos particulares, el MeCP2 no es funcional en virtud de un truncamiento o mutación en el gen de MeCP2. En algunos aspectos, la obtención de HPC que muestran un MeCP2 alterado comprende la puesta en contacto de las HPC con ARNip, ARNhp o un inhibidor de molécula pequeña de MeCP2.

i) Método de ejemplo de diferenciación 3D

Un método de ejemplo para diferenciar PSC en HPC comprende el mantenimiento bajo condiciones libres de células nodriza, tal como en placas en medio Essential 8 (E8) recubiertas con Matrigel™ o vitronectina. Los agregados están constituidos de células PSC, particularmente subconfluentes, tales como <80 % de confluencia) a una densidad de 0,5 a 1 millón de células por ml, la presencia de FGF2, VEGF y blebistatina, y un inhibidor de GSK-3. Por ejemplo, las células se cultivan en medio esencial 3 (E3) (p. ej., que contiene solo 3 de los 8 componentes del medio E8: medio basal DMEM/F12, ácido ascórbico-2-fosfato de magnesio y selenita sódica) suplementado con 50 ng/ml de FGF2, 50 ng/ml de VEGF, CHIR99021 2 μ M (inhibidor de GSK-3) y blebistatina 10 μ M (inhibidor de la miosina II). Particularmente, la formación de agregados, y las etapas posteriores se pueden llevar a cabo mediante cultivo durante 24 horas en matraces de adherencia ultrabaja (ULA, por sus siglas en inglés) bajo agitación continua.

Los agregados celulares formados (es decir, los cuerpos embrioides (CE)) se transfieren adicionalmente a medio de diferenciación libre de suero que comprende BMP4, VEGF y FGF2 (p. ej., 50 % IMDM, 50 % medio de Ham-F12, 100 μ g/ml de alcohol polivinílico, 100 μ g/ml de albúmina sérica humana recombinante, 1x suplemento de aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 0,1x suplemento lipídico definido químicamente (Invitrogen), ácido ascórbico-2-fosfato de magnesio 125 μ M, ácido linoleico 0,25 μ M, suplementos de elementos traza A (0,3x), B (0,2x) y C (0,1x) (Corning), cloruro sódico 5 mM, monotioglicerol 100 μ M, etanolamina 20 μ M, 100 ng/ml de heparina, y 10 ng/ml de IGF1) suplementado con citoquinas inductoras de mesodermo hematopoyético - 25 ng/ml de BMP4, 50 mg/ml de VEGF y 50 ng/ml de FGF2. Se continúan los cultivos, tal como durante 4 días, con cambio completo del medio el segundo día.

Para apoyar la diferenciación y expansión de los progenitores hematopoyéticos CD34⁺, los agregados celulares se transfieren adicionalmente a medio de diferenciación libre de suero (tal como se ha indicado anteriormente) suplementado con citoquinas de soporte hematopoyético, tal como 50 ng/ml de SCF, 20 mg/ml de TPO, 10 ng/ml de FLT3L, 20 ng/ml de IL-3 y 25 ng/ml de BMP4. Se continúan los cultivos, tal como durante 4 días, con cambio completo del medio el segundo día.

Los cultivos se recolectan después del proceso de diferenciación, tal como a los 9 días. Se obtiene una suspensión unicelular mediante la digestión de los agregados celulares diferenciados, tal como en acutasa. Las células CD34⁺ aisladas, tal como las aisladas mediante MACS, se siembran en placas de cultivos de diferenciación T/NK o se conservan criogénicamente para su uso posterior dentro de la hora posterior al aislamiento.

ii) Método de ejemplo de diferenciación 2D

En un método de ejemplo alternativo, las células PSC se someten a un protocolo de diferenciación 2D para la producción de HPC. En primer lugar, las PSC se aclimatan a condiciones hipóxicas, tales como durante 5 a 10 pases, bajo condiciones libres de células nodriza, tal como en medio Essential 8 (E8) recubierto con Matrigel™ o vitronectina. Las PSC se individualizan y siembran en placas recubiertas con aminos, tales como las placas de 6 pocillos recubiertos con aminos PureCoat (Corning Inc.), en presencia de blebistatina (p. ej., 1-10 μ M, tal como 5 μ M). Las células se cultivan en presencia de BMP-4, VEGF y bFGF. Por ejemplo, el medio puede ser medio basal SFD que contiene 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES+P/S 25 mM), 25 % medio de Ham-F12 (Mediatech 10-080-CV), suplemento de N₂ al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 0,5 μ g/ml de ácido ascórbico, y monotioglicerol 4,5x10⁻⁴ M suplementado con 50 ng/ml de BMP-4, VEGF y bFGF.

La inducción de la diferenciación hematopoyética se inicia el día 1 mediante cultivo en presencia de BMP-4, VEGF y bFGF. Por ejemplo, las células se cultivan en medio basal SFD que contiene 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES+P/S 25 mM), 25 % medio de Ham-F12 (Mediatech 10-080-CV), suplemento de N₂ al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 0,5 μ g/ml de ácido ascórbico, y monotioglicerol 4,5x10⁻⁴ M suplementado con 50 ng/ml de BMP-4, VEGF y bFGF. El día 2, se aspira el medio y las células se introducen en medio EB1 fresco (p. ej., medio basal SFD que contiene 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES+P/S 25 mM), 25 % de medio de Ham-F12 (Mediatech 10-080-CV), suplemento de N₂ al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 50 μ g/ml de ácido ascórbico, y monotioglicerol 4,5x10⁻⁴ M suplementado con 50 ng/ml de BMP-4, VEGF y bFGF) durante 48 horas adicionales.

En los días 5 a 10, se aspira el medio y las células se introducen en medio que comprende ligando de Flt-3, IL3, IL6,

SCF, TPO y heparina, tal como durante las siguientes 48 h. Por ejemplo, el medio EB2 puede incluir medio basal SFD nuevo que contiene 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES+P/S 25 mM), 25 % de medio de Ham-F12 (Mediatech 10-080-CV), suplemento de N₂ al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 0,5 µg/ml de ácido ascórbico y monotioglicerol 4,5x10⁻⁴ M suplementado con 50 ng/ml de ligando de Flt-3, IL3, IL6, SCF y TPO cada uno a 50 ng/ml y 5.000 U/ml de heparina. Las células se recolectan los días 7, 8, 9, 10 de la diferenciación utilizando TrypLE y se tiñen para la presencia de marcadores de HPC y progenitores linfoides.

B. Diferenciación de células linfoides

Las HPC que se diferencian a partir de PSC derivadas de células somáticas seguidamente pueden diferenciarse en células linfoides, incluyendo células T, células NK y células T/NK. En algunos aspectos, las HPC durante la diferenciación se aíslan los días 7 a 12, tal como los días 8 a 11, para la diferenciación en células linfoides. Las HPC en esta etapa pueden identificarse por la expresión de CD34 y CD43. Además, las HPC con potencial linfóide pueden expresar CD144, DLL4, CD7 y CD235 a niveles bajos que disminuyen el día 11, lo que implica que se requiere un determinado nivel umbral de expresión de estos marcadores para acondicionar las células hacia la diferenciación linfóide en presencia de DLL4.

En algunos aspectos, las HPC aisladas los días 7 a 11, tal como el día 7, el día 8, el día 9, el día 10 o el día 11 del proceso de diferenciación pueden diferenciarse en células linfoides, tales como las células T y NK. En algunos aspectos, los tiempos de aparición de los progenitores linfoides coinciden con la caída de los progenitores hematoendoteliales y la emergencia de progenitores eritroides durante la diferenciación de la HPC. En aspectos particulares, las HPC del día 9 pueden presentar una mayor eficiencia en la generación de células T. Las HPC capaces de diferenciación linfóide pueden aislarse y/o identificarse a partir de la expresión de determinados marcadores. Por ejemplo, las células con expresión en superficie de CD34 y/o CD43 pueden seleccionarse para la diferenciación linfóide. Entre los marcadores adicionales para detectar progenitores linfoides se incluyen DLL4, CD144, CD31, CD34, CD43^{lo}, CD45^{lo/-}, CD235, CD7, Flk-1 y APNLR. En particular, la presencia de poblaciones dobles positivos CD34/CD7, CD235/CD7, DLL4/CD34, DLL4/CD31, DLL4/CD144, o CD34/CD43^{lo} se utiliza para identificar progenitores linfoides. La expresión CD144 sobre las HPC se cotiñe con CD31, CD34 y DLL4. La expresión de CD7 sobre las HPC se cotiñe con CD235, CD34 y CD43. Por lo tanto, las HPC que coexpresan CD144 y CD7 muestran precursores de captura de potencial linfóide que expresan ligando de Notch unido a membrana (DLL4) junto con marcadores hematoendoteliales y crean la firma fenotípica para progenitores linfoides emergentes capaces de generar linajes de hematopoyesis definitiva *in vitro*. En aspectos particulares, las HPC pueden clasificarse en células con potencial linfóide mejorado mediante la clasificación de los marcadores de superficie, incluyendo CD31, CD34, CD144, CD43, CD45, CD31, CD34, CD144, CD43, CD45, CD6, CD335, FLK-1 y DLL4. En la presente invención, las fracciones positivas CD144/CD34/CD45/CD7 de las HPC se diferencian en células linfoides.

Las HPC pueden cultivarse bajo condiciones definidas, libres de células nodriza para la diferenciación linfóide. Un medio de cultivo puede contener uno o más componentes de matriz, tal como RetroNectin, fibronectina o un péptido RGD. Sin respaldo teórico, un componente de la matriz puede proporcionar un soporte sólido para el crecimiento de las células madre embrionarias. En determinadas realizaciones, puede aplicarse un componente de matriz en una superficie de cultivo y ponerse en contacto con medio de cultivo antes de sembrar células en el medio. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en un medio definido (p. ej., medio TeSR) en placas recubiertas con fibronectina o Matrigel™ antes de separar mecánicamente las células en agregados o individualizar células e inducir la diferenciación en células precursoras hematopoyéticas.

Se pueden utilizar diversos componentes de la matriz para cultivar células pluripotentes, incluido un colágeno (p. ej., colágeno IV), laminina, vitronectina, Matrigel™, gelatina, polilisina, trombospondina (p. ej., TSP-1, -2, -3, -4 y/o -5), y/o ProNectin-F™. En determinadas realizaciones, podría evitarse el uso de Matrigel™, colágeno IV, o laminina con células previamente cultivadas utilizando TeSR debido a posibles efectos adversos sobre la viabilidad celular; sin embargo, estas composiciones pueden utilizarse ventajosamente en combinación con otros componentes de la matriz. Las combinaciones de estos componentes de la matriz pueden proporcionar un beneficio adicional para promover el crecimiento y viabilidad celulares. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más de los componentes de la matriz anteriormente indicados para cultivar células, p. ej., antes de la diferenciación hematopoyética.

Una matriz de ejemplo libre de células nodriza para la diferenciación linfóide se da a conocer en el Ejemplo 4. En aspectos particulares, una placa tratada con cultivo no tisular puede recubrirse con proteína química DLL4:FC y RetroNectin (fragmento de fibronectina CH-296; Takara Shuzo, Japón) para su uso en la diferenciación linfóide de células HPC.

En algunas realizaciones, el ácido ascórbico se puede usar para mejorar la diferenciación linfóide. El medio definido puede suplementarse con aproximadamente 10 µM a aproximadamente 1 mM de ácido ascórbico, tal como aproximadamente 50 µM a aproximadamente 100 µM, tal como aproximadamente 95 µM. El ácido ascórbico se puede seleccionar de diversos ascorbatos, tal como el ácido ascórbico-fosfato de magnesio. En algunas realizaciones, se

puede utilizar nicotinamida (p. ej., ácido nicotínico) para mejorar la diferenciación linfóide, tal como a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM.

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

Se selecciona un ligando de Notch que promueve y mantiene la diferenciación y proliferación de células del linaje de células T. Un ligando de Notch puede ser de origen humano, o puede derivarse de otras especies, incluidas especies de mamíferos, tales como roedores, perros, gatos, cerdos, ovejas, vacas, cabras y primates. Entre los ejemplos particulares de ligandos de Notch se incluye la familia Delta. La familia Delta incluye Delta-1 (Genbank n.º de acceso AF003522, *Homo sapiens*), Delta-3 (n.º de acceso de Genbank AF084576, *Rattus norvegicus*), Delta-like 1 (n.º de adhesión de Genbank NM_005618 y NP_005609, *Homo sapiens*; n.º de acceso de Genbank X80903, I48324, *M. musculus*), Delta-like 3 (n.º de acceso de Genbank NM_053666, N_446118, *Rattus norvegicus*), Delta-4 (n.º de acceso de Genbank AF273454, BAB18580, *Mus musculus*; n.º de acceso de Genbank AF279305, AAF81912, *Homo sapiens*), y Delta-Like 4 (n.º de acceso de Genbank. Q9NR61, AAF76427, AF253468, NM_019074, *Homo sapiens*; n.º de acceso de Genbank NM_019454, *Mus musculus*). Los ligandos de Notch están disponibles comercialmente o pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante y purificarse hasta diversos grados.

El método incluye, además, la etapa de mantener las células HPC en el cultivo indicado anteriormente durante un tiempo suficiente para producir células NK diferenciadas. En algunas realizaciones, las células NK diferenciadas emergen en los cultivos junto con las células T; sin embargo, las células NK pueden dejar de proliferar después de la semana 6. En general, la determinación de un aumento en el número de células NK y/o su estado de diferenciación se evalúa utilizando métodos convencionales conocidos por el experto habitual en la materia. Por ejemplo, puede realizarse un seguimiento de las células cultivadas, mediante citometría de flujo, para el desarrollo de células NK mediante la tinción de las células con anticuerpos anti-CD56 y anti-CD3. Las células que son CD56⁺/CD3⁻ serían indicativas de células NK diferenciadas.

C. Diferenciación mieloide (como referencia)

Las HPC producidas a partir de PSC derivadas de células somáticas pueden diferenciarse en células mieloides utilizando, p. ej., un medio de diferenciación mieloide. Un medio de diferenciación mieloide puede ser un medio sin suero o definido, y el medio puede contener SCF, EPO, TPO, insulina, dexametasona o hidrocortisona, y/o transferrina. Las células mieloides pueden ser células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, monocitos, basófilos, neutrófilos, mastocitos y/o eosinófilos. En aspectos particulares, las células mieloides son células dendríticas. La diferenciación mieloide de ejemplo y el medio de expansión se describen en, por ejemplo, las Tablas 4 a 6.

En un método de ejemplo, las HPC se transfieren en placas de adherencia baja a un medio que contiene SFEM (StemCell Technologies), heparina (p. ej., 1 a 10 U/ml, tal como 5 U/ml, Sigma), TPO (p. ej., 50 a 150 ng/ml, tal como 100 ng/ml), SCF recombinante humano (p. ej., 50 a 150 ng/ml, tal como 100 ng/ml), FLT3L (p. ej., 50 a 150 ng/ml, tal como 100 ng/ml), IL-3 (p. ej., 1 a 20 ng/ml, tal como 10 ng/ml) e IL-6 (p. ej., 1 a 20 ng/ml, tal como 10 ng/ml). Después de aproximadamente 5 a 15 días, tal como 8 días, las células mieloides se expanden en medio SFEM que contiene GM-CSF (p. ej., 25 a 150 ng/ml, tal como 100 ng/ml). Finalmente, las células se cultivaron en un medio que contenía SFEM (StemCell Technologies), Excyte (p. ej., 0,1 % a 2 %, tal como 1 %), GM-CSF (25 a 150 ng/ml, tal como 100 ng/ml), IL-4 (10 a 30 ng/ml, tal como 20 ng/ml) y TNF α (0,5 a 5 ng/ml, tal como 2,5 ng/ml), durante 1 a 2 semanas adicionales para producir células dendríticas. Las células dendríticas pueden caracterizarse por la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD209⁺, CD1a⁺, HLA-DR⁺, CD11c⁺, CD14⁺, CD83⁺ y CD86⁺. Estos marcadores tiñen predominantemente las DC mieloides y no las DC plasmocitoides (CD123⁺). La tinción de Wright se puede realizar en muestras centrifugadas (Cytospin) para confirmar la morfología clásica de las células dendríticas.

D. Cultivo celular

En determinadas realizaciones, se pueden utilizar condiciones sustancialmente hipóxicas para promover la diferenciación de las HPC en linajes mieloides o linfoides. En determinadas realizaciones, se puede utilizar un contenido de oxígeno atmosférico inferior a aproximadamente 20 %, inferior a aproximadamente 19 %, inferior a aproximadamente 18 %, inferior a aproximadamente 17 %, inferior a aproximadamente 16 %, inferior a aproximadamente 15 %, inferior a aproximadamente 14 %, inferior a aproximadamente 13 %, inferior a aproximadamente 12 %, inferior a aproximadamente 11 %, inferior a aproximadamente 10 %, inferior a aproximadamente 9 %, inferior a aproximadamente 8 %, inferior a aproximadamente 7 %, inferior a aproximadamente 6 %, inferior a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 5 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 2 %, o aproximadamente 1 %, para promover la diferenciación en células precursoras

hematopoyéticas. En determinadas realizaciones, la atmósfera hipóxica comprende aproximadamente 5 % de gas oxígeno.

Tal como se describe en la presente memoria, pueden utilizarse ventajosamente uno o más medios de cultivo definidos para promover la diferenciación de HPC en linajes linfoides; en particular, la eliminación de productos de origen animal, tal como el suero y las capas de células nodriza de ratones, puede reducir los riesgos asociados a la exposición de las células a productos de origen animal y permitir la generación de células que podrían administrarse de forma más segura a un sujeto humano. Dado que el desarrollo tradicional de los cultivos de células madre se ha basado en productos séricos y capas de células nodriza de ratón para diferenciar las células madre en una variedad de tipos celulares, estos procedimientos tradicionales han limitado la escala a la que se puede realizar la diferenciación, aumentando la variabilidad biológica y la contaminación potencial, y ha obstaculizado gravemente el uso de células ES en terapias traslacionales en las que de otra manera podrían resultar útiles.

En general, las células de la presente exposición se cultivan en un medio de cultivo, que es una solución tamponada rica en nutrientes capaz de sostener el crecimiento celular. Los medios de cultivo adecuados para aislar, expandir y diferenciar células madre pluripotentes en células precursoras hematopoyéticas y células hematopoyéticas de acuerdo con el método descrito en el presente documento incluyen, aunque sin limitación, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) rico en glucosa, DMEM/F-15, RPMI 1640, medio de Dubelcco modificado por Iscove (IMDM, por sus siglas en inglés) y SFM Opti-MEM (Invitrogen Inc.). También resulta adecuado medio químicamente definido que comprende un medio esencial mínimo, tal como medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (Gibco), suplementado con albúmina sérica humana, lipoproteína ExCyte humana, transferrina, insulina, vitaminas, aminoácidos esenciales y no esenciales, piruvato sódico, glutamina y un mitógeno. Tal como se utiliza en la presente memoria, un mitógeno se refiere a un agente que estimula la división de la célula. Un agente puede ser un compuesto químico, generalmente alguna forma de proteína que induce a que la célula inicie la división celular, induciendo la mitosis. En una realización, se encuentran contemplados medios libres de suero, tales como los descritos en el documento U.S. n.º de serie 08/464.599y el documento n.º WO 96/39487, y "medios completos" tales como los indicados en la patente US. n.º 5.486.359, para su uso con los métodos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el medio de cultivo se suplementa con suero de feto bovino al 10 % (FBS, por sus siglas en inglés), suero autólogo humano, suero AB humano o plasma rico en plaquetas suplementado con heparina (2 U/ml).

Las células inmunitarias pueden generarse mediante cultivo de células madre pluripotentes o células precursoras hematopoyéticas en un medio bajo condiciones que aumentan el nivel intracelular de factores suficientes para promover la diferenciación de las células en linajes linfoides. El medio puede contener, además, uno o más agentes de diferenciación y maduración de células hematopoyéticas, tal como diversos tipos de factores de crecimiento. Estos agentes pueden ayudar a inducir a las células a comprometerse con un fenotipo más maduro, o preferentemente promover la supervivencia de las células maduras, o presentar una combinación de ambos efectos. Los agentes de diferenciación y maduración pueden incluir factores de crecimiento solubles (hormonas peptídicas, citoquinas, complejos de ligando-receptor, y otros compuestos) que son capaces de promover el crecimiento de las células del linaje celular hematopoyético. Entre los ejemplos no limitativos de tales agentes se incluyen, aunque sin limitación, factores de crecimiento hematopoyéticos o endoteliales tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) el, factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), ligando de FLT-3 (FLT3L), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-9 (IL-9), o factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), o isoformas o variantes de las mismas.

IV. Usos de las células inmunitarias

Las células inmunitarias proporcionadas mediante métodos y composiciones de determinados aspectos se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, el trasplante o la implantación de las células *in vivo*; la detección de compuestos citotóxicos, carcinógenos, factores de crecimiento/reguladores mutágenos, compuestos farmacéuticos, etc., *in vitro*; que dilucidan el mecanismo de las enfermedades y lesiones hemáticas; el estudio del mecanismo de acción de fármacos y/o factores de crecimiento; el diagnóstico y monitorización del cáncer en un paciente; la terapia génica; y la producción de productos biológicamente activos, entre otros.

A. Cribado de compuestos de ensayo

Las células inmunitarias de la presente exposición se pueden usar para identificar factores (tales como solventes, fármacos de molécula pequeña, péptidos y polinucleótidos) o condiciones ambientales (tales como condiciones de cultivo o manipulación) que afectan a las características de las células linfoides que se proporcionan en la presente memoria.

Las aplicaciones particulares de cribado de la presente exposición se refieren al ensayo de compuestos farmacéuticos en la investigación de medicamentos. Se remite de manera general al lector al libro de texto estándar "*In vitro* Methods in Pharmaceutical Research", Academic Press, 1997, y la patente US. n.º 5.030.015. En determinados aspectos, las células mieloides y linfoides desempeñan el papel de células de ensayo estándares de detección y de toxicidad, tal como se ha realizado anteriormente en células hematopoyéticas y precursores en cultivos a corto plazo. La evaluación

de la actividad de los compuestos farmacéuticos candidatos implica generalmente combinar las células hematopoyéticas o precursores proporcionados en determinados aspectos con el compuesto candidato, determinando cualquier cambio en la morfología, fenotipo de marcador, o actividad metabólica de las células que es atribuible al compuesto (en comparación con células no tratadas o con células tratadas con un compuesto inerte), y después determinar la correlación entre el efecto del compuesto y el cambio observado. El cribado puede llevarse a cabo debido a que el compuesto está diseñado para presentar un efecto farmacológico sobre las células hematopoyéticas o los precursores, o debido a que un compuesto diseñado para presentar efectos en otra parte puede presentar efectos no deseados sobre las células hematopoyéticas o los precursores. Se pueden someter a ensayo dos o más fármacos en combinación (combinándolos con las células simultánea o secuencialmente), para detectar posibles efectos de interacción fármaco-fármaco.

B. Terapia de células hematopoyéticas

La presente exposición también prevé el uso de células inmunitarias proporcionadas en la presente memoria para restaurar un grado de función a un sujeto que necesita dicha terapia, tal vez debido a una enfermedad o trastorno hemático o una lesión. Por ejemplo, las células inmunitarias derivadas de los métodos que se dan a conocer en la presente memoria pueden utilizarse para tratar enfermedades y trastornos hemáticos, tales como hemoglobinopatías, anemias, etc. Dichas células pueden resultar útiles para el tratamiento de las deficiencias de células hematopoyéticas causadas por terapias supresoras celulares, tales como la quimioterapia.

Para determinar la idoneidad de las células proporcionadas en la presente memoria para aplicaciones terapéuticas, las células pueden someterse a ensayo en primer lugar en un modelo animal adecuado. En un nivel, las células se evalúan para su capacidad de sobrevivir y mantener su fenotipo *in vivo*. Las células proporcionadas en la presente memoria se administran a animales inmunodeficientes (tales como ratones NOG, o animales que se han convertido en inmunodeficientes químicamente o mediante irradiación) en un sitio susceptible de observación adicional, tal como bajo la cápsula renal, en el bazo, en un lóbulo hepático o en la médula ósea. Los tejidos se recolectan después de un período de unos pocos días a varias semanas o más, y se evalúa si los tipos de células iniciales, tales como los eritrocitos, todavía están presentes. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante la provisión de las células administradas con un marcaje detectable (tal como proteína verde fluorescente, o β -galactosidasa), o mediante la medición de un marcador constitutivo específico para las células humanas administradas. En donde las células proporcionadas en la presente memoria se someten a ensayo en un modelo de roedores, la presencia y el fenotipo de las células administradas pueden evaluarse mediante inmunohistoquímica o ELISA usando anticuerpos específicos para seres humanos, o mediante análisis de RT-PCR utilizando cebadores y condiciones de hibridación que causan que la amplificación sea específica para las secuencias de polinucleótidos humanos. Se proporcionan en otros sitios de la presente exposición los marcadores adecuados para evaluar la expresión génica a nivel de ARNm o proteína.

Las células inmunitarias proporcionadas mediante los métodos de la presente exposición pueden someterse a ensayo en diversos modelos animales para su capacidad de tratamiento de trastornos y lesiones hemáticas. Por ejemplo, un modelo de ratón de anemia de células falciformes o el ratón con inactivación de Rag-2 deficiente en células T/B puede ser modelos animales particularmente útiles para someter a ensayo las células mieloides y linfoides que se dan a conocer en la presente memoria.

Las células inmunitarias proporcionadas en determinados aspectos de la presente exposición que muestren características funcionales deseables o eficacia en modelos animales, también pueden resultar adecuados para la administración directa en sujetos humanos que las necesiten. Para fines de hemostasia, las células pueden administrarse en cualquier sitio que disponga de acceso adecuado a la circulación. Las células hematopoyéticas o precursores de las mismas también pueden administrarse en un sitio de lesión o enfermedad.

Las células proporcionadas en determinados aspectos de la presente exposición pueden utilizarse para el tratamiento de cualquier sujeto que lo necesite. Entre las afecciones humanas que pueden resultar apropiadas para dicha terapia se incluyen las diversas anemias y hemoglobinopatías, así como las enfermedades caracterizadas por un número reducido del número de células hematopoyéticas (tal como, por ejemplo, el síndrome mielodisplásico, la mielofibrosis, la neutropenia, la agranulocitosis, la trombastenia de Glanzmann, la trombocitopenia y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Para la terapia humana, la dosis es generalmente de entre 10^9 y 10^{12} células, y normalmente de entre 5×10^9 y 5×10^{10} células, realizando ajustes para el peso corporal del sujeto, la naturaleza y gravedad de la afección, y la capacidad replicativa de las células administradas. La responsabilidad final para determinar el modo de tratamiento y la dosis apropiada recae en el clínico responsable del tratamiento.

C. Distribución con fines comerciales, terapéuticos y de investigación

Para propósitos de fabricación, distribución y uso, las células inmunitarias de la presente exposición se suministran típicamente en forma de cultivo celular o suspensión en un excipiente o medio de cultivo isotónico, opcionalmente congeladas para facilitar el transporte o almacenamiento.

En la presente memoria también se proporcionan diferentes sistemas de reactivos, que comprenden un conjunto o combinación de células que existen en cualquier momento durante la fabricación, distribución o uso. Los conjuntos

celulares comprenden cualquier combinación de dos o más poblaciones celulares descritas en la presente exposición, ejemplificadas, aunque sin limitación, por células derivadas de la programación (células de linaje hematopoyético, sus precursores y subtipos), en combinación con células madre no diferenciadas, células hematopoyéticas derivadas de células somáticas u otros tipos de células diferenciadas. Las poblaciones celulares en el conjunto en ocasiones comparten el mismo genoma o una forma genéticamente modificada del mismo. Cada tipo de célula en el conjunto puede empaquetarse por separado, o en recipientes separados en la misma instalación, o en diferentes ubicaciones, en el mismo momento o en diferentes tiempos, bajo el control de la misma entidad o de entidades diferentes que comparten una relación comercial.

Ejemplos

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar realizaciones preferentes de la invención. Los ejemplos referidos a materia no comprendida en las reivindicaciones se proporcionan a título de referencia. El experto en la materia debería apreciar que las técnicas dadas a conocer en los ejemplos siguientes representan técnicas encontradas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y de esta manera pueden considerarse modos preferentes para su práctica. Sin embargo, el experto en la materia debería apreciar, a la luz de la presente exposición, que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se dan a conocer y todavía conseguir un resultado igual o similar.

Ejemplo 1. Producción de células PSC derivadas de células T (TiPSC, por sus siglas en inglés)

Para la producción de células iPSC, se aislaron las células T a partir de una muestra de sangre y se activaron antes de la reprogramación retroviral a células iPSC. En primer lugar, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) se expandieron en medio AIM-V + pen./estrep./glutamina (medio AIV-V/ps/s/g) (Invitrogen) más 300 UI/ml de rhIL2 (Peprotech) y 10 ng/ml de anticuerpos solubles anti-CD3 (clon OKT3, eBiosciences) y anti-CD28. Varios días después de la activación, se verificó el crecimiento exponencial mediante recuento celular CEDEX. Después de 3 días en cultivo las células se sometieron a ensayo para el fenotipo de células T y después se transdujeron con factores de reprogramación.

Se construyeron los vectores retrovirales Nanog RFP, Lin28 RFP, Oct4 eGFP y Sox2 eGFP tal como se ha descrito anteriormente (ver la solicitud de patente US n.º 61/088.054). Se construyeron de manera similar los vectores retrovirales c-Myc RFP, Klf4 RFP, Oct4 eGFP y Sox2 eGFP.

Las células mononucleares periféricas activadas por CD3 y CD28 se cultivaron en medio de células T que comprendía medio AIM-V que contiene 2 % de suero AB humano y 10 ng/ml de IL-2. El día 6, se transfectaron las células T con 6 factores de reprogramación mediante electroporación utilizando el programa Amaxa U-014 (1-5x10⁶ células/transfección, solución de transfección de células T Amaxa). Hasta el día 25 después de la transfección, las células se cultivaron en pocillos recubiertos con retronectina (0,3 µg/cm²) y vitronectina (0,2 µg/cm²) de placa de 6 pocillos en una transfección por pocillo y con transición gradual de células T a medio E8 de CPS a partir del día 14.

Las células T activadas y en expansión mostraban una morfología celular y comportamiento de agregación característicos. La detección de la eficiencia de la transducción retroviral se determinó mediante la expresión de GFP y RFP 72 h después de la transducción inicial, durante el transcurso de ~3 semanas se silenciaron los transgenes y mostraban un fenotipo de células hES. Empezaron a aparecer colonias de células iPSC el día 23. El silenciamiento de GFP y RFP se verificó mediante microscopía de fluorescencia y las colonias se recogieron en una campana de disección utilizando una punta de pipeta. A continuación, los trozos de colonia se transfirieron a placas de 6 pocillos nuevas. Se contabilizó el número de colonias para estimar la eficiencia de la reprogramación dado el número de entrada de células sembradas en placa. A partir de este punto, las colonias clonales fueron alimentadas diariamente y se realizaron pases manuales en una ocasión más y después se expandieron para producir las líneas TiPSC.

Ejemplo 2. Diferenciación de TiPSC en células precursoras hematopoyéticas (HPC)

Se sometieron diversas células iPSC reprogramadas episómicamente y víricamente (Tabla 1), incluyendo las TiPSC del Ejemplo 1, al protocolo de diferenciación 3D para la producción de HPC (FIG. 1). Primero, las iPSC se aclimataron a condiciones hipóxicas en 5 a 10 pases bajo condiciones libres de células nodriza en placas de adherencia ultrabaja (ULA) recubiertas con Matrigel™ o vitronectina en medio esencial 8 (E8). Se prepararon agregados a partir de células iPSC subconfluentes a una densidad de entre 0,25 y 0,5 millones de células por ml en presencia de medios definidos sin suero (SFD) suplementados con blebistatina 5 µM. El procedimiento se llevó a cabo en placas de adherencia ultrabaja (ULA) o matraces de agitación en medio SFD basal que contenía 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES+P/S 25 mM), 25 % de solución de Ham-F12 (Mediatech 10-080-CV), suplemento de N₂ al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 50 µg/ml de ácido ascórbico y 4,5x10⁻⁴ M de monotiglicerol.

Una vez formadas las CE, se inició la diferenciación mediante suplementación del medio SFD basal con 50 ng/ml de BMP-4, VEGF y FGF2 durante los primeros 4 días. Al quinto día de diferenciación de los CE, los cultivos se sometieron a la presencia de ligando de Flt-3, IL3, IL6, SCF y TPO cada uno a 50 ng/ml y 5.000 unidades de heparina. Los cultivos

de CE se suplementaron con la mitad del volumen de medio de diferenciación nuevo que contenía citoquinas cada 2 días durante el proceso de diferenciación hasta el día 12-16 de la diferenciación bajo condiciones hipóxicas. Las células se recolectaron después del proceso de diferenciación y se evaluó el fenotipo mediante citometría de flujo y se evaluó la capacidad funcional utilizando el ensayo de UFC. Se recolectaron las células y se cuantificó el porcentaje de células CD43/CD34 mediante citometría de flujo (FIG. 1B). Se calculó la eficiencia del procedimiento mediante la división del número absoluto de HPC generadas por número de entrada de células iPSC (FIG. 1C).

Tabla 1: Validación de procesos usando múltiples líneas de iPSC

Línea celular	Método de reprogramación	Material de origen para la reprogramación	
01501.102	Episómico	Sangre de células progenitoras	Varón
TiPSCs1E	Vírico	Células T	Varón
1.025T	Vírico	Células T	Mujer
2.022B	Episómico	LCL	Varón
2.0224B	Episómico	LCL	Mujer
01279.107.3902	Episómico	Sangre de células progenitoras	Varón
01279.107.3908	Episómico	Sangre de células progenitoras	Varón
01279.107.3904	Episómico	Sangre de células progenitoras	Varón
01279	Episómico	Sangre de células progenitoras	Varón
01629	Episómico	Sangre de células progenitoras	Varón

Para el análisis de citometría de flujo, se recolectaron las células y se lavaron una vez con medio. El pellet celular se digirió usando TrypLE™ o tripsina al 0,5 % durante 5 a 10 minutos en un incubador a 37 °C seguido de lavados con medio y pases a través de un filtro celular de 70 µm. Las células se resuspendieron en PBS-FBS que contenía tampón de FACS, se realizó el recuento para estimar la viabilidad celular y se tiñeron con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo: anti-CD43 humano (1G10), anti-CD31 humano (WM-59), anti-CD41 humano (HIP8); anti-CD45 humano (HI30); anti-CD34 humano (581, 8G12) (BD Biosciences San José, CA); y anti-CD235 humano. Las células no viables se excluyeron con 7-aminoactinomicina D (7-AAD, BD Biosciences). El análisis de células vivas se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur™ o Accuri y el software Cell Quest.

Para el ensayo de progenitores hematopoyéticos clonogénicos (ensayo de UFC), se dispersaron los CE en suspensiones de células únicas utilizando TrypLE o tripsina al 0,5 %/EDTA. Las células viables se cuantificaron, se sembraron en placas (50.000-300.000 células por ml) y se sometieron a ensayo en cámaras humidificadas para las CFC hematopoyéticas utilizando medio completo de metilcelulosa humana (R&D Systems, Minneapolis, MN) que contenían factor de células madre (SCF) 50 ng/ml, eritropoyetina (EPO) 3 U/ml, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) 10 ng/ml e interleuquina-3 (IL-3) 10 ng/ml. Después de 14 días, se clasificaron las colonias según su morfología y se cuantificaron las colonias por cada 10⁵ células en placa.

Ejemplo 3. Diferenciación de células iPSC modificadas en células precursoras hematopoyéticas (HPC)

Las iPSC derivadas de células T 1C (TiPSC, derivadas por reprogramación retroviral) se diferenciaron en progenitores hematopoyéticos CD34⁺ mediante cultivo en suspensión de agregados (3D). Las células 1C se mantuvieron bajo condiciones libres de células nodriza en placas de 6 pocillos con medio Essential 8 (E8) recubiertos con Matrigel™ o vitronectina. Los agregados estaban constituidos de células 1C subconfluentes (<80 % de confluencia) a una densidad de entre 0,5 y 1 millón de células por ml en el medio Essential 3 (E3) (que contiene solo 3 de los 8 componentes del medio E8: medio basal DMEM/F12, ácido ascórbico-2-fosfato de magnesio y selenita sódica) suplementado con 50 ng/ml de FGF2, 50 ng/ml de VEGF, CHIR99021 2 µM (inhibidor de GSK-3) y blebbistatina 10 µM (inhibidor de la miosina II). La formación de agregados se llevó a cabo durante el cultivo de 24 horas en matraces ULA bajo agitación continua en la plataforma oscilante a 15 rpm (incluyendo todas las etapas posteriores del cultivo).

Los agregados celulares formados (es decir, los cuerpos embrioides (CE)) se transfieren adicionalmente a medio de diferenciación libre de suero (50 % IMDM, 50 % medio de Ham-F12, 100 µg/ml de alcohol polivinílico, 100 µg/ml de albúmina sérica humana recombinante, 1x suplemento de aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 0,1x suplemento lipídico definido químicamente (Invitrogen), ácido ascórbico-2-fosfato de magnesio 125 µM, ácido linoleico 0,25 µM, suplementos de elementos traza A (0,3x), B (0,2x) y C (0,1x) (Corning), cloruro sódico 5 mM, monoglicérol 100 µM, etanolamina 20 µM, 100 ng/ml de heparina, y 10 ng/ml de IGF1) suplementado con citoquinas inductoras de mesodermo hematopoyético - 25 ng/ml de BMP4, 50 ng/ml de VEGF y 50 ng/ml de FGF2. Se continúan los cultivos durante 4 días, con cambio completo del medio el segundo día.

Para apoyar la diferenciación y expansión de los progenitores hematopoyéticos CD34⁺, los agregados celulares se transfieren adicionalmente a medio de diferenciación libre de suero (tal como anteriormente) suplementado con citoquinas de soporte hematopoyético, tal como 50 ng/ml de SCF, 20 ng/ml de TPO, 10 ng/ml de FLT3L, 20 ng/ml de IL-3 y 25 ng/ml de BMP4. Se continúan los cultivos durante 4 días, con cambio completo del medio el segundo día.

Se recolectaron los cultivos durante los días 7 a 9 del proceso de diferenciación. Se obtuvo una suspensión de células

individuales mediante la digestión de los agregados celulares diferenciados en la solución de acutasa (o Accumax) durante 15 a 20 min a 37 °C. Las células se lavaron en tampón de MACS (p. ej., PBS que contenía 5 mg/ml de BSA y EDTA 1 mM), se filtraron a través de filtros celulares de 70 µm y se marcaron con microperlas paramagnéticas CD34 directas (Miltenyi Biotec) durante 30 min a 4 °C. Se aislaron las células CD34⁺ utilizando columnas magnéticas MS o LS, imanes apropiados y procedimientos de separación estándares siguiendo las recomendaciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Las células CD34⁺ aisladas se sembraron en placas en cultivos de diferenciación T/NK o se conservaron criogénicamente para su uso posterior dentro de la hora posterior al aislamiento.

Ejemplo 4. Diferenciación linfóide de las HPC

Para determinar los parámetros de diferenciación linfóide de las HPC de los Ejemplos 2 y 3, las líneas celulares fueron sometidas a condiciones de cultivo para la diferenciación de células T y NK. En primer lugar, se sometieron a ensayo diversas variables para la diferenciación de células T en un protocolo dependiente de estroma. El día 12 se sometieron a ensayo células HPC de diferentes líneas celulares para detectar el potencial de células T en líneas estromales, incluyendo las células estromales de la médula ósea OP9 y las células estromales de médula ósea MS5 murina. Las células se cultivaron en medio αMEM con FBS al 20 %, 10 ng/ml de SCF, 5 ng/ml de Flt-3 y 5 ng/ml de IL-7. Las células se refrescaron cambiando la mitad del medio tres veces a la semana. El análisis de las células para la presencia de células T mostró que las células presentaban una tendencia a generar células mieloides y no pudo detectarse la presencia de células CD3⁺. Además, los cocultivos estromales presentaron un rendimiento reducido bajo condiciones hipóxicas.

Tabla 2. Selección de matriz para la diferenciación linfóide. Las células sembradas en placa con retronectina-DLL4 revelaron la presencia de células pre-T (CD5⁺/CD7⁺)

Matriz para la diferenciación de células T	%CD5	%CD7	%CD5/CD7
Retronectina-DLL4	11%	40%	11%
Tenascina-DLL4	0,7%	5,2%	0,7%
Vitronectina-DLL4	0,6%	6%	0,6%

Tabla 3. La hipoxia favorece la diferenciación en células T. Las células que se diferencian bajo condiciones hipóxicas revelaron la presencia de células T y NK.

Matriz para la diferenciación en células T	CD3	CD4	CD8	CD3/CD4	CD3/CD4	CD4/CD8	CD56 ⁺ /CD3 ⁺ (células NK)
Hipoxia	7%	11,4%	49%	2,6%	2%	5,6%	28%
Normoxia	0,2	57%	4,7%	0	0	0	6%

En consecuencia, se desarrolló un protocolo de diferenciación de células T libre de células nodriza. Se sembraron las HPC en placas de cultivo de tejidos no tratadas y recubiertas con RetroNectin y Notch DLL4 a razón de 0,5 µg/cm², a una densidad celular de entre aproximadamente 5.000 y aproximadamente 25.000 células/cm². Se cultivaron las HPC en medio de expansión II sin suero StemSpan (SFEM; StemCell Technologies) suplementado con GlutaMax al 1 %, penicilina-estreptomina al 1 %, ácido ascórbico 95 µM (laboratorios WAKO), así como 50 ng/ml de IL-7, SCF, Flt-3 y TPO (Peprotech). Los medios se repusieron cada 48 horas y a las 2 semanas las células se repartieron en nuevas placas recubiertas de ligando. Además, transcurridas entre 2 y 3 semanas, se analizaron las células para detectar la presencia de células pre-T mediante los marcadores de superficie celular CD5 y CD7. A las 4 semanas, se analizaron las células para la presencia de células T a partir de los marcadores de superficie celular CD3, CD4 y CD8. A las 6-8 semanas, se analizaron las células para detectar la presencia de células T y NK utilizando los marcadores de superficie celular CD4, CD8, CD3, CD94 y CD56.

Uno de los parámetros sometidos a ensayo para su efecto sobre la diferenciación de células T fue la elección del recubrimiento de matriz en las placas de cultivo. Se llevó a cabo una comparación mediante el análisis de la aparición de células pre-T bajo condiciones libres de suero utilizando diversas combinaciones de matriz con Notch DLL4 con

células sanguíneas del cordón umbilical 3 semanas después del recubrimiento. Los resultados mostraron que la combinación de retronectina con DLL4 resultaba más eficaz para diferenciar las células sanguíneas del cordón umbilical en células pre-T que la combinación con vitronectina o tenascina (Tabla 2).

Inesperadamente, se encontró que las condiciones hipóxicas mejoraban la diferenciación de las células T sin células nodriza. Específicamente, se observó que la hipoxia resultaba en un aumento en el porcentaje de células positivas para CD8 y una disminución en el porcentaje de células positivas para CD4 en comparación con las células diferenciadas bajo condiciones normóxicas (Tabla 3).

La eficiencia de diferenciar las iPSC derivadas de células sanguíneas en linajes linfoides se analizó mediante la recolección de las diversas líneas celulares los días 5, 7, 9 y 11 de la diferenciación de las HPC descrita en el Ejemplo 2. Se descongelaron las células HPC y se sembraron en placas recubiertas con RetroNectin y DLL4. Se alimentaron las células con medio fresco cada 2 días y se analizaron para marcadores de células pre-T a las 2 semanas, marcadores de células T a las 4 semanas y marcadores de células T y NK a las 6 semanas después de la descongelación de las células HPC. Las células se tiñeron para la expresión en superficie de CD7, CD8, CD56 (FIG. 3A), CD45, CD7, CD5 (FIG. 3B), y CD56, CD8, CD3 (FIG. 3C) para la presencia de células T, NK y NK/T. Se observó que las TiPSC y las células 3908 reprogramadas episómicamente presentaban un potencial linfóide incrementado los días 7 a 11 (FIG. 3A).

Con el fin de determinar si los marcadores de superficie podrían utilizarse para aumentar la eficiencia de la diferenciación linfóide, se analizaron CD43/CD34, CD34, DLL4, CD31/CD144 y CD235 tanto para la línea TiPSCs1E como para la línea episómica 3902 (FIG. 4). Se encontró que la expresión de DLL4 y los niveles de CD235 caían el día 11 de la diferenciación, mientras que la expresión de CD34 disminuía y la expresión de CD43 aumentaba con los días de diferenciación. Dada la ausencia de células linfoides el día 11 de la diferenciación, se infiere que un determinado nivel umbral de expresión de estos marcadores resulta esencial para preparar las células hacia la diferenciación linfóide en presencia de DLL4.

Se realizó un análisis adicional de los progenitores linfoides durante la diferenciación de HPC mediante la clasificación magnética de los marcadores de superficie CD31, CD34, CD144, CD43, CD45, CD6, CD335, Flk-1 y DLL4. Las HPC el día 8 se clasificaron en fracciones positivas y negativas CD114/CD34, CD144/CD45, CD144/CD7 y CD144/CD34/CD45/CD7, así como un control sin clasificar (FIG. 5). A continuación, se sometieron estas fracciones al proceso de diferenciación linfóide y se analizaron para la presencia de células CD3⁺ el día 16 (FIG. 6A). Se observó que cada una de las fracciones positivas mostraba un potencial linfóide significativamente incrementado en comparación con las fracciones negativas y el control no clasificado. Lo anterior resultó adicionalmente corroborado por el aumento del factor de enriquecimiento de la generación de células T a partir de la clasificación magnética de la fracción positiva (FIG. 6B). Las fracciones positivas se volvieron a sembrar en placa sobre la superficie de Ret-DLL4 nueva durante dos semanas adicionales.

A las 4 semanas de diferenciación linfóide, las HPC CD144⁺/CD7⁺ del día 8 y las CD144⁺/CD45⁺ mantuvieron la generación de células T *in vitro*, tal como muestra el porcentaje de células positivas para CD3 en la FIG. 7A. Las células CD3 eran positivas para CD335, positivas para CD161 y negativas para receptores invariantes de células T (6B11). Por lo tanto, los cultivos de estadio tardío presentan un fenotipo de células NK/T emergente. Además, se demostró que las HPC CD144⁺/CD7⁺ presentaban una mayor eficiencia en la producción de células T, medida por una relación de entrada de HPC a salida de células T el día 16. Sin embargo, la eficiencia acumulada del proceso al final de 4 semanas mostró ser más alta para la fracción positiva CD144/CD34/CD45/CD7.

En estudios adicionales se analizaron las células T derivadas de TiPSC para determinar su funcionalidad. Las células T generadas en cultivos de diferenciación T/NK de 2 semanas a partir de células CD34⁺ obtenidas a partir de TiPSC (1C) se transfirieron al cultivo de expansión de células T (mAb anti-CD3 inmovilizado, IL2 e IL7). Las células T de sangre periférica se expandieron en cultivos paralelos. Se recolectaron las células T tras 2 semanas de expansión, se lavaron, se contaron y se ajustaron a una concentración de 10⁶/ml, y se estimularon nuevamente durante 36 horas en cultivo sobre mAb anti-CD3 inmovilizado para la producción de citoquinas activadas (células T + anti-CD3), o se cultivaron sin mAb anti-CD3, para la producción espontánea/constitutiva de citoquinas (células T). Se midieron las citoquinas en los sobrenadantes de cultivo utilizando el ensayo de citoquinas multiplex de citometría de flujo LEGENDplex (panel CD8/NK; BioLegend). Los niveles relativos de citoquinas se representan en los respectivos gráficos de puntos en la FIG. 22. Tanto la sangre periférica como las células T derivadas de las PSC se expandieron 2 semanas bajo condiciones de cultivo idénticas y desarrollaron un perfil de secreción de citoquinas de tipo 1 notablemente similar, caracterizado por un alto nivel de producción de IL2, IFN γ y TNF. Las propiedades citotóxicas de las células T expandidas también se pusieron de manifiesto por la secreción activada de granzima B. Por lo tanto, las células T derivadas de TiPSC mostraban una funcionalidad similar a las células T primarias, como se observa en el perfil de secreción de citoquinas de tipo 1.

Ejemplo 5. Diferenciación mieloide de las HPC

Las HPC CD34⁺ de los Ejemplos 2 y 3 se sometieron a diferenciación mieloide para la producción de poblaciones relativamente puras de células dendríticas humanas (DC). Se cultivaron las células en placas o matraces de cultivo

de tejidos de baja adherencia durante todo el proceso. Se resuspendieron las células en medio libre de suero que contenía 50 ng/ml de ligando de Flt-3 (Flt-3L), 50 ng/ml de factor de células madre (SCF), 50 ng/ml de trombopoyetina (TPO), 50 ng/ml de interleuquina-3 (IL-3) y 50 ng/ml de interleuquina-6 (IL-6) a una densidad de entre 0,5 y 1×10^6 células/ml.

Para iniciar la diferenciación mieloide, las células se sembraron a una densidad de entre 0,25 y 0,5 millones de células por ml en el medio para progenitores mieloides (Tabla 4) y se expandieron durante aproximadamente 2 semanas. Se realizó un seguimiento de las células para la viabilidad y expresión de CD34⁺/CD45⁺/CD43⁺ los días 4 y 8. Se observó que la población CD34⁺ disminuía y que se producía una emergencia de la población CD45⁺/CD43⁺/CD31⁺ en los cultivos. El fenotipo de los cultivos en esta etapa era predominantemente CD43⁺/CD45⁺/CD31⁺/CD34^{Lo}.

Tabla 4: Medios de progenitores mieloides

Componente	Fabricante	n.º de catálogo	Concentración
Medio sin suero*			
GlutaMAX	Gibco	35050	1 %
Pen/Strep	Gibco	15140	1 %
SCF	Peptrotech	300-07	50 ng/ml
IL-6	Peptrotech	200-06	50 ng/ml
TPO	Peptrotech	300-18	50 ng/ml
IL-3	Peptrotech	200-06	50 ng/ml
FLT-3L	Peptrotech	300-19	50 ng/ml
* SFEM StemSpan™ (StemCell Technologies, n.º de cat. 09650), Stem Pro 34 (Invitrogen, n.º de cat. 10639-011), o Stemline II (Sigma, n.º de cat. S0192) puede utilizarse como medio libre de suero.			

Cuando las células mostraron una expresión superior a 50 % de los marcadores de superficie celular CD43⁺/CD45⁺/CD31⁺/CD34⁺, entonces se añadieron las células a medio de expansión mieloide (Tabla 5) durante 8 días. Las células se alimentaron con medio nuevo cada dos días. Al final de los 8 días, las células cultivadas presentaban una población enriquecida en células mieloides con 80-90 % de CD43⁺/CD45⁺/CD31⁺/CD34⁺. Al final de esta fase de expansión mieloide, se determinó el número de células, la viabilidad y la pureza.

Tabla 5: Medios de expansión de mieloides

Componente	Fabricante	n.º de catálogo	Concentración
Medio libre de suero*			
GlutaMAX	Gibco	35050	1%
GM-CSF	Peptrotech	300-03	100 ng/ml
* SFEM StemSpan™ (StemCell Technologies, n.º de cat. 09650), Stem Pro 34 (Invitrogen, n.º de cat. 10639-011), o Stemline II (Sigma, n.º de cat. S0192) puede utilizarse como medio libre de suero.			

Finalmente, al final de 16 días de cultivo, se añadieron los cultivos a medios de enriquecimiento en células dendríticas (Tabla 6). La densidad celular se mantuvo entre 0,5 y 1 millón de células por ml, y las células se alimentaron con medio nuevo cada cuatro días sin ninguna etapa de centrifugación. En esta etapa de diferenciación no se observó prácticamente ninguna proliferación. En cambio, se observó que las células se adherían a las placas de adherencia baja y que aumentaban de tamaño. Al final de una semana, se recolectó una muestra y se realizó un ensayo para la presencia de CD209⁺, CD1a⁺, HLA-DR⁺, CD11c⁺, CD14⁺, CD83⁺ y CD86⁺ mediante citometría de flujo (FIGS. 9-10). Estos marcadores tiñen predominantemente las DC mieloides y no las DC plasmocitoides (CD123⁺). Las células se mantuvieron en medios de enriquecimiento en células dendríticas y se analizaron en diversos puntos temporales para cuantificar el rendimiento y la pureza. La tinción de Wright se llevó a cabo en muestras centrifugadas (Cytospin) para confirmar la morfología clásica de las células dendríticas.

Tabla 6: Medios de enriquecimiento en células dendríticas

Componente	Fabricante	n.º de catálogo	Concentración
Medio libre de suero*			
GlutaMAX	Gibco	35050	1 %
GM-CSF	Peptrotech	300-03	100 ng/ml
Excyte	Millipore	81-129-1	1 %
IL-4	Peptrotech	200-04	20 ng/ml
TNFα	Peptrotech	300-01A	2,5 ng/ml

Ejemplo 6. Métodos de diferenciación de PSC y expansión de células T

Diferenciación de las PSC en progenitores hematopoyéticos linfoides CD34⁺: Las iPSC derivadas de células T 1C (TiPSC, derivadas mediante reprogramación retroviral) se diferenciaron en progenitores hematopoyéticos CD34⁺

mediante cultivo en suspensión de agregados (3D). Las células 1C se mantuvieron bajo condiciones libres de células nodriza en placas de 6 pocillos con medio Essential 8 (E8) recubiertos con Matrigel™ o vitronectina. Los agregados estaban constituidos de células 1C subconfluentes (<80 % de confluencia) a una densidad de entre 0,5 y 1 millón de células por ml en el medio Essential 3 (E3) (que contiene solo 3 de los 8 componentes del medio E8: medio basal DMEM/F12, ácido ascórbico-2-fosfato de magnesio y selenita sódica) suplementado con 50 ng/ml de FGF2, 50 ng/ml de VEGF, CHIR99021 2 μ M (inhibidor de GSK-3) y blebistatina 10 μ M (inhibidor de la miosina II). Se llevó a cabo la formación de agregados durante un cultivo de 24 horas en matraces de adherencia ultrabaja (ULA) bajo agitación continua en la plataforma oscilante a 15 rpm (incluyendo todas las etapas posteriores de cultivo).

Los agregados celulares formados (cuerpos embrioides (CE)) se transfirieron adicionalmente a medio de diferenciación libre de suero (50 % IMDM, 50 % medio de Ham-F12, 100 μ g/ml de alcohol polivinílico, 100 μ g/ml de albúmina sérica humana recombinante, 1x suplemento de aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 0,1x suplemento lipídico definido químicamente (Invitrogen), ácido ascórbico-2-fosfato de magnesio 125 μ M, ácido linoleico 0,25 μ M, suplementos de elementos traza A (0,3x), B (0,2x) y C (0,1x) (Corning), cloruro sódico 5 mM, monioglicerol 100 μ M, etanolamina 20 μ M, 100 ng/ml de heparina, y 10 ng/ml de IGF1) suplementado con citoquinas inductoras de mesodermo hematopoyético: 25 ng/ml de BMP4, 50 mg/ml de VEGF y 50 ng/ml de FGF2. Se continuaron los cultivos durante 4 días, con cambio completo del medio el segundo día.

Para apoyar la diferenciación y expansión de los progenitores hematopoyéticos CD34⁺, los agregados celulares se transfirieron adicionalmente a medio de diferenciación libre de suero (tal como anteriormente) suplementado con citoquinas de soporte hematopoyético, tal como 50 ng/ml de SCF, 20 mg/ml de TPO, 10 ng/ml de FLT3L, 20 ng/ml de IL-3 y 25 ng/ml de BMP4. Se continuaron los cultivos durante 4 días, con cambio completo del medio el segundo día.

Se recolectaron los cultivos después del proceso de diferenciación 1+4+4 (total de 9 días). La suspensión unicelular se obtuvo a través de la digestión de los agregados celulares diferenciados en la solución de acutasa (o Accumax) durante 15 a 20 min a 37 °C. Se lavaron las células en tampón de MACS (PBS que contenía 5 mg/ml de BSA y EDTA 1 mM), filtraron a través de filtros celulares de 70 μ m y se marcaron con microperlas paramagnéticas CD34 directas (Myltenyi Biotec) durante 30 min a 4 °C. Se aislaron las células CD34⁺ utilizando columnas magnéticas MS o LS, imanes apropiados y procedimientos de separación estándares siguiendo las recomendaciones del fabricante (Myltenyi Biotec). Las células CD34⁺ aisladas se sembraron en placas en cultivos de diferenciación T/NK o se conservaron criogénicamente para su uso posterior dentro de la hora posterior al aislamiento.

Cultivos de diferenciación en T/NK: Para la diferenciación en T/NK, las placas de plástico tratadas no de cultivo tisular se recubrieron con proteína quimérica hDLL4-Fc ligando de Notch y retronectina diluida en PBS (a 0,5 μ g/cm² cada una). Antes de la siembra celular, se aspiró la solución de recubrimiento, las placas se lavaron una vez con medio basal de cultivo celular (DMEM/F12 u otro), y se llenó con 0,25 ml/cm² de medio de diferenciación de células T (TCDM) que consistía en SFEM StemSpan (StemCell Technologies), GlumaMax (1/100), PenStrep (1/200), ácido ascórbico-fosfato de magnesio (250 μ M), nicotinamida (2 mM) y las citoquinas SCF, TPO, FLT3L e IL7 (a razón de 50 ng/ml cada una). Las células CD34⁺ aisladas derivadas de PSC se sembraron en placa a razón de 5.000 células/cm² de densidad y se cultivaron en un incubador de CO₂ hipóxico (5 % de O₂) durante 2 semanas, con adición de volumen de cultivo TCDM nuevo los días 3 y 6, e intercambiando la mitad del volumen de cultivo cada tres días. Las células diferenciadas totales se recolectaron mediante resuspensión suave y recolección de las células no adherentes, seguido del desprendimiento de las células adherentes durante 10 a 15 min de tratamiento con PBS-EDTA (0,5 mM).

Cultivos de expansión de células T: Para la expansión de células T, se recubrieron placas de plástico de cultivo tisular con mAb anti-CD3 (clon OKT3) y retronectina diluida en PBS (a razón de 0,5 μ g/cm² cada una). Antes del recubrimiento celular, se aspiró la solución de recubrimiento, se lavaron las placas dos veces con medio basal de cultivo celular (DMEM/F12 u otro) y se llenaron con 0,2 ml/cm² de medio de expansión de células T (TECM) que consistía en medio ImmunoCult XF (StemCell Technologies), GlumaMax (1/100), PenStrep (1/200) y las citoquinas IL2 e IL7 (a razón de 10 ng/ml cada una). También pudo añadirse IL15 y/o IL21 para mejorar la expansión. Las células recolectadas de los cultivos de diferenciación en T/NK se sembraron en placa a razón de 20.000 células/cm² de densidad y se cultivaron en un incubador de CO₂ hipóxico (5 % de O₂) durante 2 semanas, con adición de volumen de cultivo TECM nuevo el día 3, e intercambiando la mitad del volumen de cultivo cada tres días. Las células T expandidas se recolectaron mediante resuspensión suave y recolección de las células no adherentes.

Ejemplo 7. Protocolo 2D para la producción de HPC

Las células 01279.107.3902 *knockout* de MeCP2 y TiPSCs1E se sometieron al protocolo de diferenciación 2D para la producción de HPC (FIG. 16). Primero, se aclimataron las iPSC a condiciones hipóxicas a lo largo de 5 a 10 pases bajo condiciones libres de células nodriza en medio Essential 8 (E8) recubierto con Matrigel™ o vitronectina. Se individualizaron las iPSC y se sembraron en placas de 6 pocillos recubiertos con PureCoat Amine (Corning Inc.) a una densidad de 25.000/cm² en presencia de medio definido sin suero (SFD) suplementado con blebistatina de 5 μ M. Por ejemplo, el medio puede ser medio basal SFD que contiene 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES+P/S 25 mM), 25 % medio de Ham-F12 (Mediatech 10-080-CV), suplemento de N₂ al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y monioglicerol 4,5x10⁻⁴ M suplementado con 50 ng/ml de BMP-4, VEGF y bFGF.

Se inició la inducción de la diferenciación hematopoyética el día 1 mediante cultivo en medio basal SF que contenía 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES+P/S 25 mM), 25 % medio de Ham-F12 (Mediatech 10-080-CV), suplemento de N₂ al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 50 µg/ml de ácido ascórbico y monotioglicerol 4,5x10⁻⁴ M suplementado con 50 ng/ml de BMP-4, VEGF y bFGF. El día 2, se aspiró el medio y se añadieron las células a medio EB 1 nuevo. (medio basal SFD que contiene 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES+P/S 25 mM), 25 % medio de Ham-F12 (Mediatech 10-080-CV), suplemento de N₂ al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 50 µg/ml de ácido ascórbico y monotioglicerol 4,5x10⁻⁴ M suplementado con 50 ng/ml de BMP-4, VEGF y bFGF, durante 48 h adicionales.

Los días 5 a 10, se aspiró el medio y las células se añadieron a medio EB2 durante las siguientes 48 h. El medio EB2 comprendía medio basal SFD nuevo que contenía 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES+P/S 25 mM), 25 % de medio de Ham-F12 (Mediatech 10-080-CV), suplemento de N₂ al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 50 µg/ml de ácido ascórbico y monotioglicerol 4,5x10⁻⁴ M suplementado con 50 ng/ml de ligando de Flt-3, IL3, IL6, SCF y TPO cada uno a 50 ng/ml y 5.000 U/ml de heparina. Las células se recolectaron los días 7, 8, 9, 10 de la diferenciación utilizando TrypLE y se tiñeron para la presencia de marcadores de HPC y progenitores linfoides.

Para la diferenciación en células T, se sembraron las HPC en placas de cultivo tisular no tratadas y recubiertas con RetroNectin y Notch DLL4 a razón de 0,5 µg/cm², a una densidad celular de entre aproximadamente 5.000 y aproximadamente 25.000 células/cm². Se cultivaron las HPC en medio de expansión II sin suero StemSpan (SFEM; StemCell Technologies) p SFD suplementado con GlutaMax al 1 %, penicilina-estreptomina al 1 %, ácido ascórbico 95 µM (laboratorios WAKO), así como 50 ng/ml de IL-7, SCF, Flt-3 y TPO (Peprotech). Los medios se repusieron cada 48 horas y a las 2 semanas, las células se dividieron no enzimáticamente en nuevas placas recubiertas de ligando. Además, transcurridas entre 2 y 3 semanas, se analizaron las células para detectar la presencia de células pre-T mediante los marcadores de superficie celular CD5 y CD7. A las 4 semanas, se analizaron las células para la presencia de células T a partir de los marcadores de superficie celular CD3, CD4 y CD8. A las 6-8 semanas, se analizaron las células para detectar la presencia de células T y NK utilizando los marcadores de superficie celular CD4, CD8, CD3, CD94 y CD56.

Ejemplo 8. Efecto de la disrupción de MeCP2 sobre la diferenciación linfóide

Para determinar el papel de MeCP2 en el proceso de diferenciación hematopoyética, se generó una línea celular iPSC *knockout* de MeCP2. La línea de células iPSC 01279 masculina de tipo salvaje (WT) fue diseñada para inactivar MeCP2 y crear la línea celular MyCell® 01279.107.3902. Utilizando la nucleasa TAL, se insertó una serie de codones de parada antes del dominio de unión metil-CpG (FIG. 17B) de MeCP2 mediante transfección de TALEN para MeCP2 y el plásmido donante que contenía la inserción del codón de parada seguido por la inserción de LoxP flanqueado, PGKp-Puromicina-SV40pA en la orientación inversa. Las iPSC 0.1279 se transfectaron con TALEN MeCP2 y plásmido donante p1553 que expresa EBNA1 de tipo salvaje.

Las células positivas para la inserción se seleccionaron con selección de puromicina, y las colonias se seleccionaron y se cribaron mediante PCR de integración. De las colonias examinadas, el 96 % fueron positivas para la inserción mediante dos reacciones de cribado por PCR. Se expandieron y examinaron catorce de los clones en la etapa 3, y se encontró que ocho de los clones eran negativos para la integración del plásmido de esqueleto. De esta manera, tres de los clones restantes se secuenciaron a través del inserto y se encontró que dos eran policlonales. Se seleccionó la línea monoclonal 0.1279.107.302 y se caracterizó totalmente para estudios posteriores. También se obtuvieron clones adicionales y se caracterizaron como correctamente diseñados. La alineación de aminoácidos de las variantes 001, 002, 005 y 008 de MeCP2 se ilustran en la FIG. 17C. La variante 008 no codifica un dominio de enlace MetilCpG.

Las células *knockout* de MeCP2 01279.107.3902 del Ejemplo 1 y células 01279 WT se sometieron al protocolo de diferenciación 3D para la producción de HPC (FIG. 17A). En primer lugar, las PSCs se aclimataron a condiciones hipóxicas durante 5 a 10 pases, bajo condiciones libres de células nodriza en medio Essential 8 (E8) recubierto con Matrigel™ o vitronectina. Se prepararon agregados a partir de células iPSC subconfluentes a una densidad de entre 0,25 y 0,5 millones de células por ml en presencia de medios definidos sin suero (SFD) suplementados con blebbistatina 5 µM. El procedimiento se llevó a cabo en placas de adherencia ultrabaja (ULA) o matraces de agitación en medio SFD basal que contenía 75 % de IMDM (Invitrogen 12200-069) (con glutamina y HEPES+P/S 25 mM), 25 % de solución de Ham-F12 (Mediatech 10-080-CV), suplemento de N₂ al 0,5 % (Invitrogen 17502-048), suplemento B27 al 1 % sin ácido retinoico (Invitrogen 12587-010), BSA al 0,05 %, 50 µg/ml de ácido ascórbico GlutaMAX, pen/estrep y 4,5x10⁻⁴ M de monotioglicerol.

Una vez formadas las CE, se inició la diferenciación mediante suplementación del medio SFD basal con 50 ng/ml de BMP-4, VEGF y bFGF durante los primeros 4 días. En el quinto día, los cultivos de CE se sometieron a la presencia de ligando de Flt-3, IL3, IL6, SCF, heparina y TPO, cada uno a 50 ng/ml. Los cultivos de CE se suplementaron con la mitad del volumen de medio de diferenciación nuevo que contenía citoquinas cada 2 días durante el proceso de diferenciación hasta el día 12-16 de la diferenciación bajo condiciones hipóxicas.

Para la diferenciación en linfoides, se sembraron las HPC en placas de cultivo tisular no tratadas y recubiertas con RetroNectin y Notch DLL4 a razón de 0,5 µg/cm², a una densidad celular de entre aproximadamente 5.000 y aproximadamente 25.000 células/cm². Se cultivaron las HPC en medio de expansión II sin suero StemSpan (SFEM; StemCell Technologies) suplementado con GlutaMax al 1 %, penicilina-estreptomycin al 1 %, ácido ascórbico 95 µM (laboratorios WAKO), así como 50 ng/ml de IL-7, SCF, Flt-3 y TPO (Peprotech). Los medios se repusieron cada 48 horas y a las 2 semanas, las células se dividieron no enzimáticamente en nuevas placas recubiertas de ligando. Además, transcurridas entre 2 y 3 semanas, se analizaron las células para detectar la presencia de células pre-T mediante los marcadores de superficie celular CD5 y CD7. A las 4 semanas, se analizaron las células para la presencia de células T a partir de los marcadores de superficie celular CD3, CD4 y CD8. A las 6-8 semanas, se analizaron las células para detectar la presencia de células T y NK utilizando los marcadores de superficie celular CD4, CD8, CD3, CD94 y CD56.

La eficiencia de los clones *knockout* para MeCP2 en la diferenciación en linajes linfoides se analizó mediante recolección de los clones 01279.107.3902, 01279.107.3905, 01279.107.3906, 01279.107.3907 y 01279.107.3908 los días 5, 7, 9 y 11 de la diferenciación de HPC. Las células de HPC se descongelaron después de haber sido conservadas criogénicamente en el momento descrito anteriormente y se sembraron en placas recubiertas con RetroNectin y DLL4. Las células se alimentaron con medio nuevo cada 2 días y se analizaron para marcadores de células pre-T a las 2 semanas (FIG. 18A, 18B), marcadores de células T y NK a las 4 semanas después de la descongelación de las células HPC. En el análisis de los marcadores de células pre-T, todas las células excepto las células de tipo salvaje 01279.107.0904 presentaban la presencia de células pre-T identificadas como CD5⁺CD7⁺, CD7⁺CD45⁺ y CD5⁺CD45⁺. Las células se tiñeron para la expresión superficial de CD45, CD7 y CD5 (FIG. 19) y CD56, CD8 y CD3 (FIG. 20) y se cuantificó la presencia de células T, NK y NK/T.

Dado que se conocía el número de células de entrada, se determinó el número absoluto de células T (CD3⁺/CD8⁺), NK (CD3⁺/CD56⁺) y NK/T (CD3⁺/CD56⁺). La eficiencia del procedimiento se calculó como la relación de número absoluto de un tipo de célula (T, NK o NK/T)/número de entrada de células totales o por la relación de número absoluto de un tipo de célula/número de entrada de HPC. El porcentaje de células T (CD3⁺/CD8⁺) (FIG. 17) y el porcentaje de células NK (CD3⁺/CD56⁺) (FIG. 21) se cuantificaron mediante citometría de flujo bajo la agrupación de FSC-SSC y la agrupación de dispersión linfóide. También se determinó la cantidad de células emergentes NK/T (CD3⁺/CD56⁺), (CD3⁺/CD8⁺), NK/T (CD3⁺/CD56⁺) y NK (CD3⁺/CD56⁺). El análisis posterior mostró que la expresión de CD235/CD7, CD144/D114⁺ y Flk-1⁺/CD34⁺ cae el día 11 de la diferenciación. Dada la ausencia de células linfoides el día 11 de la diferenciación, se infiere que un determinado nivel umbral de expresión de estos marcadores resulta esencial para preparar las células hacia la diferenciación linfóide en presencia de DLL4.

El análisis de los marcadores de células T mostró que las líneas celulares KO de MeCP2, pero no la línea celular WT de MeCP2, presentaban el potencial de diferenciación linfóide. Los progenitores de HPC del día 9 de las células WT de MeCP2 esencialmente no presentaban células T CD3⁺CD8⁺, mientras que los otros progenitores de HPC sometidos a ensayo se diferenciaron en una población de células T CD3⁺CD8⁺. De esta manera, la inactivación del dominio de unión a metilo de MeCP2 incrementó el potencial de los progenitores de HPC para producir células T y NK.

Ejemplo 9. Diferenciación de líneas celulares de superdonante de HLA

Tal como se ha comentado anteriormente, la compatibilidad del CMH entre un donante y un receptor se incrementa significativamente si las células del donante son homocigóticas para HLA, es decir, contienen alelos idénticos para cada proteína presentadora de antígeno. La mayoría de los individuos son heterocigóticos para los genes de CMH de clase I y II, aunque determinados individuos son homocigóticos para estos genes. Estos individuos homocigóticos pueden servir como superdonantes y los injertos generados a partir de sus células pueden trasplantarse en todos los individuos que sean homocigóticos o heterocigóticos para ese haplotipo.

En consecuencia, se determinó el potencial de diferenciación en T/NK de las líneas PSC de superdonante de HLA. Se evaluó el potencial de diferenciación en T/NK de las líneas H, K, L y O de superdonante de HLA derivadas del método episómico libre de transgenes de PBMC y se comparó con TiPSC 1C altamente productivas de T/NK (p. ej., descritas en los Ejemplos 1 a 4) reprogramadas por retrovirus. Utilizando el protocolo establecido para la diferenciación de PSC en células progenitoras hematopoyéticas linfoides T/NK CD34⁺ (HPC), 3 de 4 líneas de PSC de superdonante de HLA (H, K y O) se diferenciaron en HPC CD34⁺ con una eficiencia comparable a TiPSC 1C (FIG. 23A). La diferenciación en T/NK de las HPC CD34⁺ derivadas de líneas de PSC de superdonante de HLA demostró un potencial linfóide T/NK relativamente alto en todas las HPC sometidas a ensayo (100-200 T/NK por 1 HPC CD34⁺ de entrada); sin embargo, en contraste con las HPC 1C, que produjeron principalmente células T, las HPC de superdonantes de HLA generaron más células NK que células T. Sin embargo, a pesar de esta tendencia, entre 4 líneas de PSC de superdonante de HLA sometidas a ensayo, se identificó una línea H productiva relativamente eficiente de células T (>30 T/HPC) (FIG. 23A).

BIBLIOGRAFÍA

Abboud et al., Blood, 58:1148-1154, 1981.

- Akkina et al., J. Virol., 70:2581-2585, 1996.
 Alexander et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5092-5096, 1988.
 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., MA, 1996.
 5 Biswas et al., Annals NY Acad. Sci., 590:582-583, 1990.
 Biswas, et al., J. Clin. Microbiol., 29:2228-2233, 1991.
 Blomer et al., J. Virol., 71(9):6641-6649, 1997.
 Chen y Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987.
 Doulatov et al., Cell Stem Cell. 10:120-36, 2012.
 10 Ercolani et al., J. Biol. Chem., 263:15335-15341, 1988.
 Evans, et al., en: Cancer Principles y Practice of Oncology, Devita et al. (Eds.), Lippincot-Raven, NY, 1054-1087, 1997.
 Fauser et al., Stem Cells, 1:73-80, 1981
 Fechheimer et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.
 15 Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.
 Frisan et al., Epstein-Barr Virus Protocols, Part III, 125-127, 2001
 Furie y Furie, Cell 53: 505-518, 1988.
 Golde et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:593-596, 1980.
 Graham y Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.
 20 Haddada et al., in Current Topics in Microbiology y Immunology, 1995.
 International Publication No. WO 94/09699
 International Publication No. WO 95/06128
 International Publication No. WO 96/39487
 Jaenisch, Science 240:1468-1474, 1988.
 25 Kaeppler et al., Plant Cell Reports 9: 415-418, 1990.
 Karin et al. Cell, 36:371-379, 1989.
 Kato et al, J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.
 Kim et al., J. Virol., 66:3879-3882, 1992.
 Knust et al, EMBO J. 761-766, 1987.
 30 Ladi et al., Nature Immunology, 7: 338 - 343, 2006.
 Langle-Rouault et al., J. Virol., 72(7):6181-6185, 1998.
 Levitskaya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23):12616-12621, 1997.
 Lusi, Blood, 57:13-21, 1981.
 Macejak y Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991.
 35 Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
 Mann et al., Cell, 33:153-159, 1983.
 Minskaia y Ryan, 2013
 Nabel et al., Science, 244(4910):1342-1344, 1989.
 40 Naldini et al., Science, 272(5259):263-267, 1996. Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15(9):871-875, 1997.
 Ng, Nuc. Acid Res., 17:601-615, 1989.
 Nicola, et al., Blood, 54:614-627, 1979.
 Nicolas y Rubenstein, en: Vectors: A survey of molecular cloning vectors y their uses, Rodriguez y Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.
 45 Nicolau y Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982.
 Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176, 1987.
 Notta et al., Science, 218-221, 2011.
 Okabe, J. Cell. Phys., 110:43-49, 1982.
 Paskind et al., Virology, 67:242-248, 1975.
 50 Patent Publication No. EP1507865
 Pelletier y Sonenberg, Nature, 334(6180):320-325, 1988.
 Potrykus et al., Mol. Gen. Genet., 199(2):169-177, 1985.
 Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7161-7165, 1984.
 Quitsche et al., J. Biol. Chem., 264:9539-9545, 1989.
 55 Richards et al., Cell, 37:263-272, 1984.
 Rippe, et al., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990.
 Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
 Suzuki et al, EMBO J. 6:1891-1897, 1987.
 Temin, In: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
 60 Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6:716-718, 1986.
 Solicitud de patente US n.º 12/715.136
 Solicitud de patente US n.º 08/464.599
 Solicitud de patente US n.º 61/088.054
 Patente US n.º 4.683.202
 65 Patente US n.º 5.030.015
 Patente US n.º 5.302.523

Patente US n.º 5.322.783
 Patente US n.º 5.384.253
 Patente US n.º 5.464.765
 Patente US n.º 5.486.359
 5 Patente US n.º 5.538.877
 Patente US n.º 5.538.880
 Patente US n.º 5.550.318
 Patente US n.º 5.556.954
 Patente US n.º 5.563.055
 10 Patente US n.º 5.580.859
 Patente US n.º 5.589.466
 Patente US n.º 5.591.616
 Patente US n.º 5.610.042
 Patente US n.º 5.656.610
 15 Patente US n.º 5.702.932
 Patente US n.º 5.736.524
 Patente US n.º 5.780.448
 Patente US n.º 5.789.215
 Patente US n.º 5.928.906
 20 Patente US n.º 5.945.100
 Patente US n.º 5.981.274
 Patente US n.º 5.994.136
 Patente US n.º 5.994.624
 Patente US n.º 6.013.516
 25 Patente US n.º 8.372.642
 Publicación de patente US n.º 20020055144
 Publicación de patente US n.º 20090148425
 Wilson et al., Nature Reviews Immunology, 9: 91-105, 2009.
 Wilson et al., Science, 244:1344-1346, 1989.
 30 Wong et al., Gene, 10:87-94, 1980. Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989.
 Wynn, Nature Immunology, 6:1069 - 1070, 2005.
 Yamanaka et al., Cell, 131(5):861-72, 2007.

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de células inmunitarias homocigóticas para HLA, que comprende:

(A) la obtención de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), en donde las iPSC se reprograman a partir de una población de células sanguíneas homocigóticas para HLA,
 (B) la diferenciación de las iPSC en células precursoras hematopoyéticas (HPC),
 (C) el aislamiento de las HPC que expresan los marcadores de superficie celular CD144, CD34, CD45 y CD7, y
 (D) el cultivo de las HPC bajo condiciones que promueven la diferenciación en células inmunitarias,

produciendo de esta manera células inmunitarias homocigóticas para HLA, en el que:

I) las células inmunitarias homocigóticas para HLA son células linfoides, y
 II) el cultivo de las células para promover la diferenciación linfoide comprende:

(i) el cultivo de HPC en medio definido sobre una superficie recubierta con matriz y un ligando de Notch, y
 (ii) el mantenimiento del cultivo en presencia de una o más citoquinas, produciendo de esta manera células linfoides.

2. Método según la reivindicación 1, en el que las células sanguíneas homocigóticas para HLA son homocigóticas para uno o más de los alelos de loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP o HLA-DQ, particularmente en el que:

1) las células sanguíneas homocigóticas para HLA son homocigóticas para dos de los alelos de loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ, especialmente en donde las células sanguíneas homocigóticas para HLA son homocigóticas para HLA-A y HLA-B, o
 2) en donde las células sanguíneas homocigóticas para HLA son homocigóticas para HLA-A, HLA-B, y HLA-C.

3. Método según la reivindicación 1, en el que:

I) las células linfoides son células T, células B y/o células NK, o
 II) la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA comprende células T, células B y/o células NK.

4. Método según la reivindicación 1, en el que la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA es humana.

5. Método según la reivindicación 1, en el que:

I) la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA se define adicionalmente como células sanguíneas progenitoras, células mononucleares de sangre periférica o células linfoblastoides, o
 II) la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA se aísla a partir de sangre periférica, sangre del cordón umbilical o tejido linfoide, particularmente en donde el tejido linfoide comprende médula ósea, ganglios linfáticos o hígado fetal, o
 III) la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA comprende células T, particularmente en donde las células T son células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T ayudantes 1 (TH1), células T ayudantes 2 (TH2), células TH17, células T citotóxicas, células T reguladoras, células T asesinas naturales, células T nunca expuestas, células T de memoria, o células T gamma-delta.

6. Método según la reivindicación 1, en el que la reprogramación comprende la introducción de factores de reprogramación en la población de células sanguíneas homocigóticas para HLA, particularmente en donde los factores de reprogramación están codificados por uno o más casetes de expresión comprendidos en un vector de reprogramación seleccionado del grupo que consiste en un vector vírico, un vector episómico y un transposón, especialmente en el que: I) el vector vírico se define adicionalmente como un vector retrovírico, o II) el vector episómico se define adicionalmente como un vector episómico basado en el virus de Epstein-Barr (VEB).

7. Método según la reivindicación 1, en el que:

I) la reprogramación comprende el cultivo de las células bajo condiciones definidas, libres de células nodriza, o
 II) las iPSC están esencialmente libres de elementos víricos exógenos integrados, o

III) las HPC se diferencian en por lo menos 20 células inmunitarias homocigóticas para HLA por cada HPC, o

IV) las HPC se diferencian en por lo menos 50 células inmunitarias homocigóticas para HLA por cada HPC, o

V) las HPC se diferencian en por lo menos 100 células inmunitarias homocigóticas para HLA por cada HPC.

8. Método según la reivindicación 1, en el que la diferenciación de las iPSC en HPC comprende las etapas secuenciales de:

(a) cultivar las iPSC en un primer medio definido que comprende por lo menos un factor de crecimiento, (b) incubar las células en un segundo medio definido que está libre o esencialmente libre de IL-3, ligando de Flt3 y GM-CSF,

(c) cultivar las células en un tercer medio definido que comprende BMP4, FGF2 y VEGF en la medida suficiente para expandir o promover la diferenciación en una pluralidad de células, y

(d) cultivar las células en un cuarto medio definido que comprende IL-3 y ligando de Flt3, en la medida suficiente para expandir o promover la diferenciación en una pluralidad de las células, en donde una pluralidad de PSC se diferencian en células HPC.

9. Método según la reivindicación 8, en el que:

I) el segundo medio definido comprende blebistatina y/o un inhibidor Rock, particularmente en el que: I-1) el segundo medio definido comprende adicionalmente un inhibidor de GSK3, especialmente en el que el inhibidor de GSK3 es CHIR99021, o I-2) el segundo medio definido comprende adicionalmente VEGF y FGF2, o

II) el segundo medio definido comprende adicionalmente BMP4, VEGF y FGF2, particularmente en el que las células se individualizan antes de la etapa (b), especialmente en el que las etapas (b) a (d) se llevan a cabo utilizando placas de cultivo recubiertas de aminas, o

III) el cuarto medio definido comprende adicionalmente una o más de las citoquinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-3, IL-6, SCF, TPO y BMP4, o

IV) el cuarto medio definido comprende heparina, o

V) el método comprende cultivar las células a una presión atmosférica inferior a 5 % de oxígeno.

10. Método según la reivindicación 1, en el que:

I) la matriz es proteína de matriz extracelular, o

II) en donde el aislamiento en la etapa (C) comprende, además, la clasificación celular activada magnéticamente (MACS), o

IV) las células se cultivan a una presión atmosférica inferior a 5 % de oxígeno.

11. Método según la reivindicación 1, en el que el medio definido comprende ácido ascórbico y/o nicotinamida, particularmente en el que: 1) el ácido ascórbico está presente en una concentración de 50 μ M a 1 mM o 2) el ácido ascórbico está presente en una concentración de entre 90 μ M y 100 μ M, o 3) la nicotinamida está presente en una concentración de entre 0,1 mM y 5 mM.

12. Método según la reivindicación 1, en el que:

I) la matriz es retronectina, o

II) el ligando de Notch es DLL4, particularmente DLL4 es proteína quimérica DLL4:Fc, o

III) la citoquina o citoquinas se seleccionan del grupo que consiste en SCF, TPO, IL-7 y Flt-3, o

IV) la etapa (ii) dura una a seis semanas, o

V) la etapa (ii) dura dos a cuatro semanas.

13. Método según la reivindicación 1, en el que las células linfoides expresan uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD8, CD7, CD45, CD5, CD4 y CD3, particularmente en el que:

I) más de 5 % de las células linfoides son positivas para como mínimo dos de los marcadores, o

II) más de 10 % de las células linfoides son positivas para como mínimo dos de los marcadores, o

III) las células linfoides son células T y/o células NK, especialmente en donde: III-1) las células T producen IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL17A y TNF, o III-2) las células T producen granzima A, granzima B, perforina, granulisina, IFN γ , SFAS y sFasL.

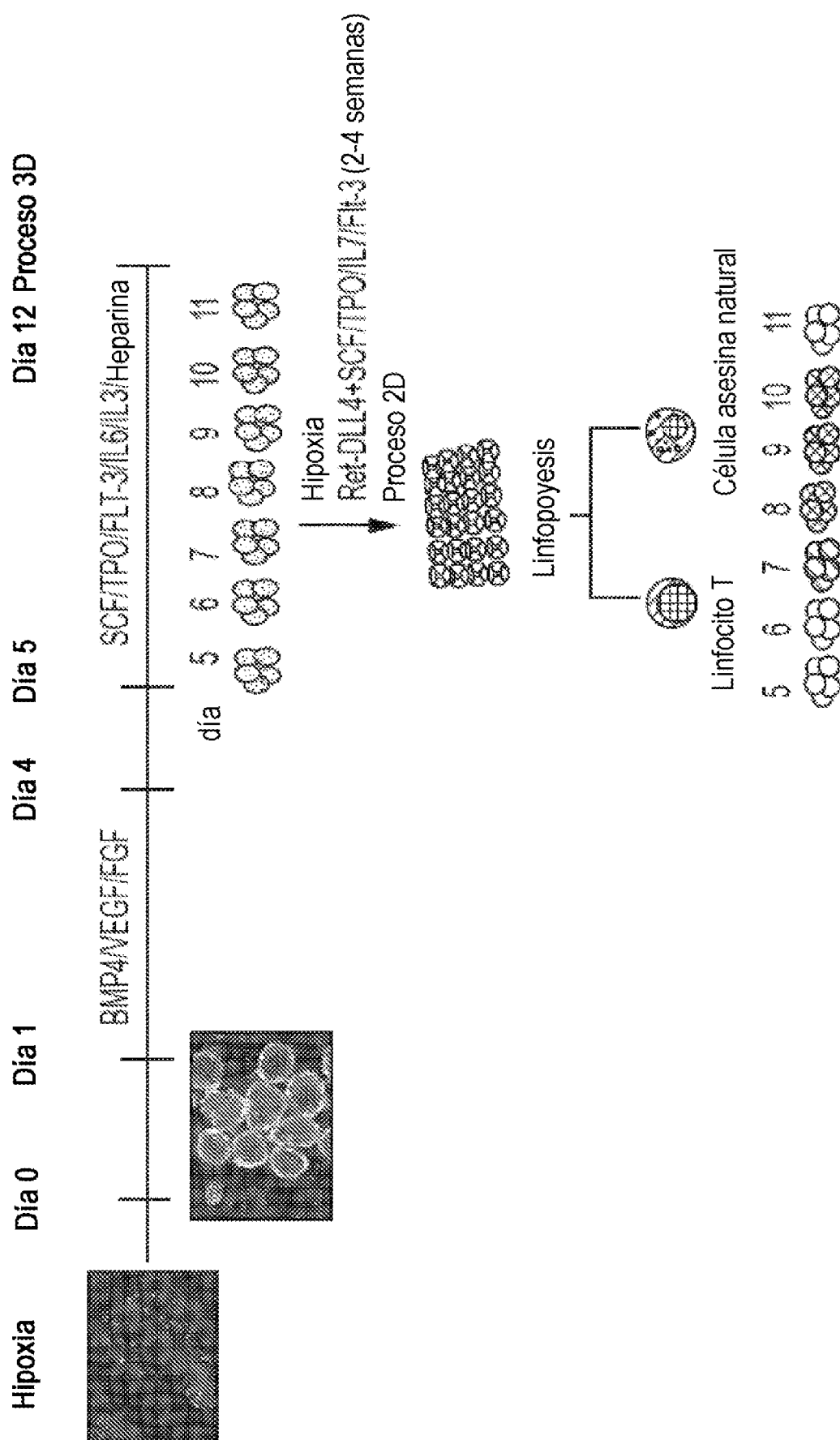


FIG. 1A

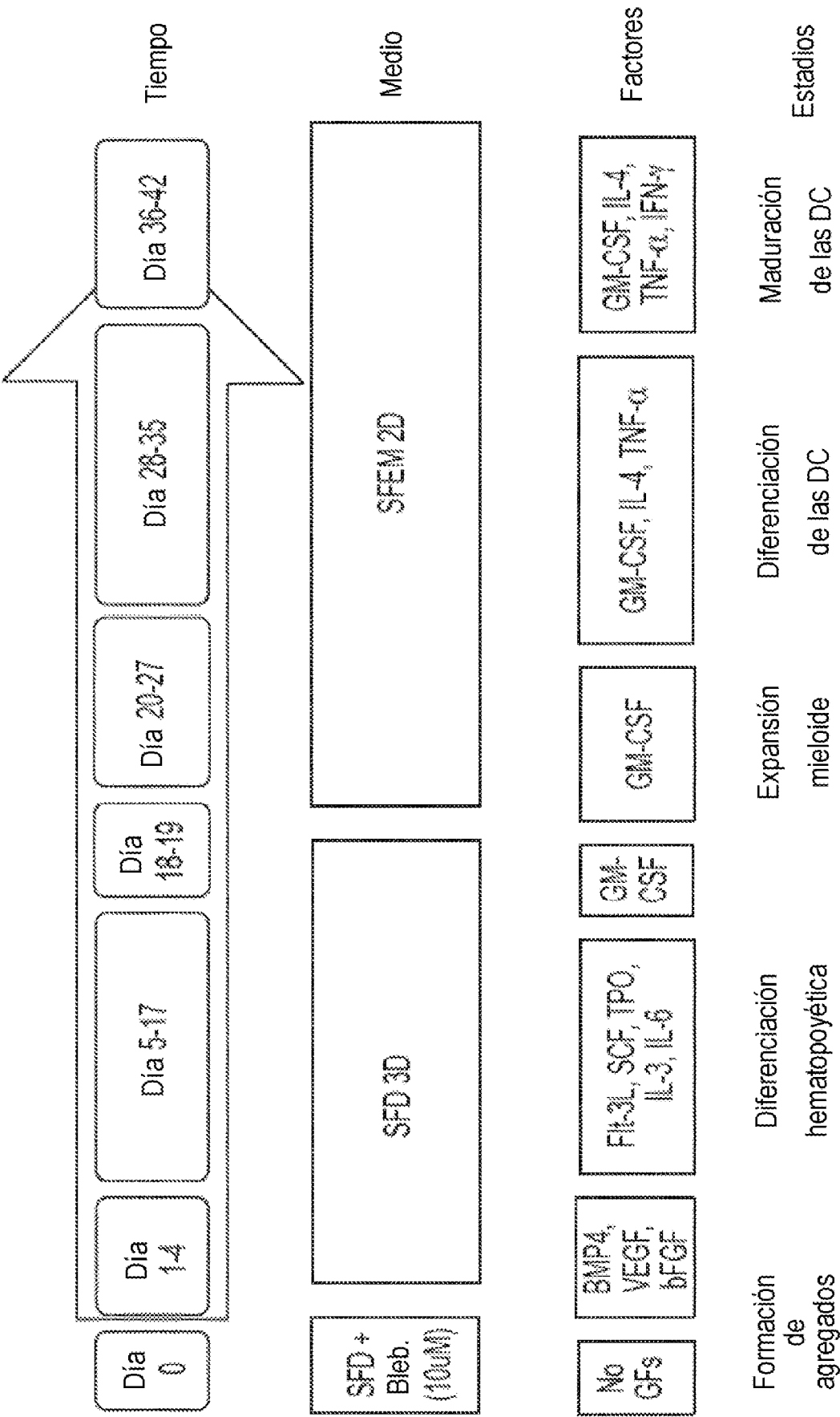


FIG. 1B

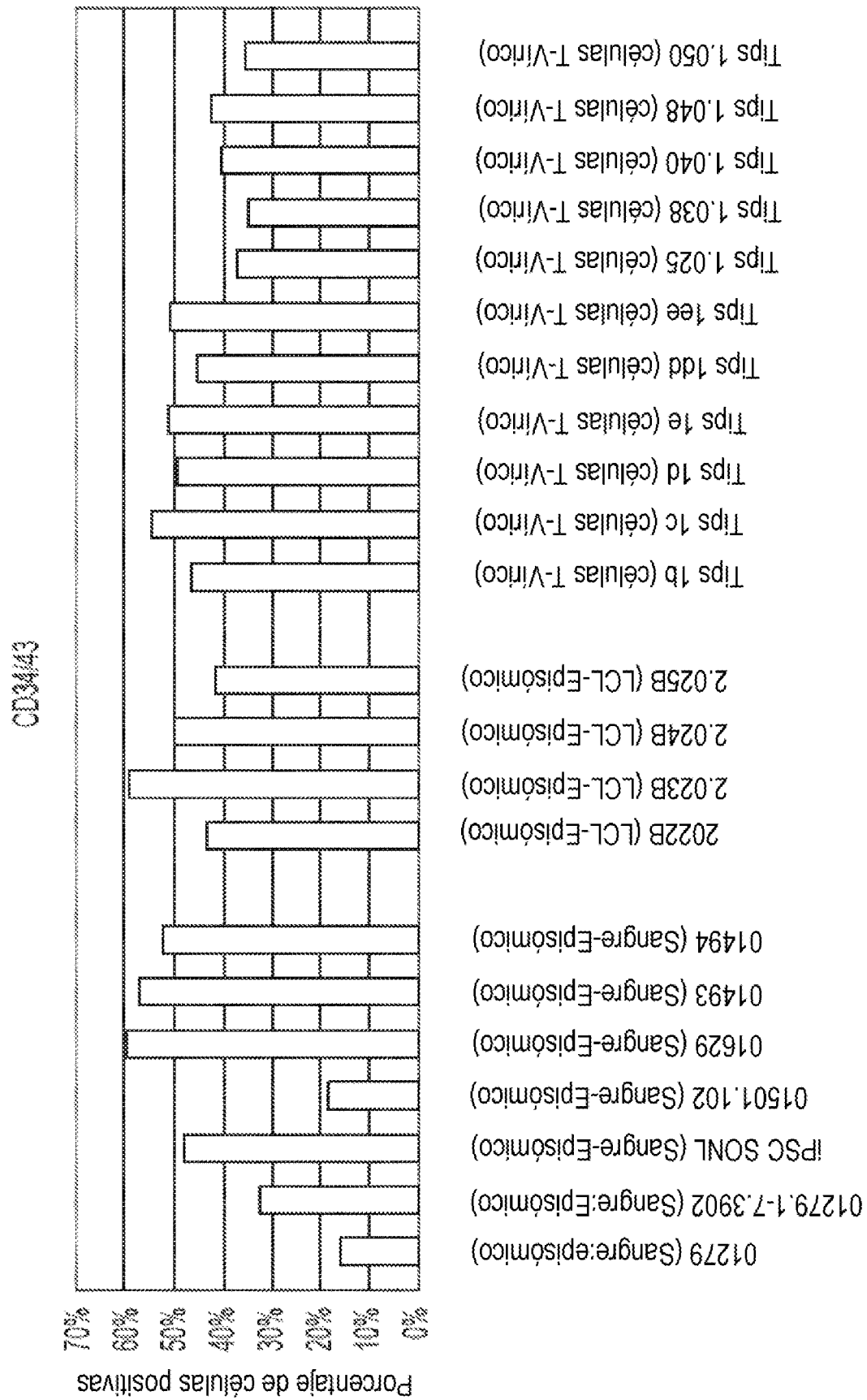
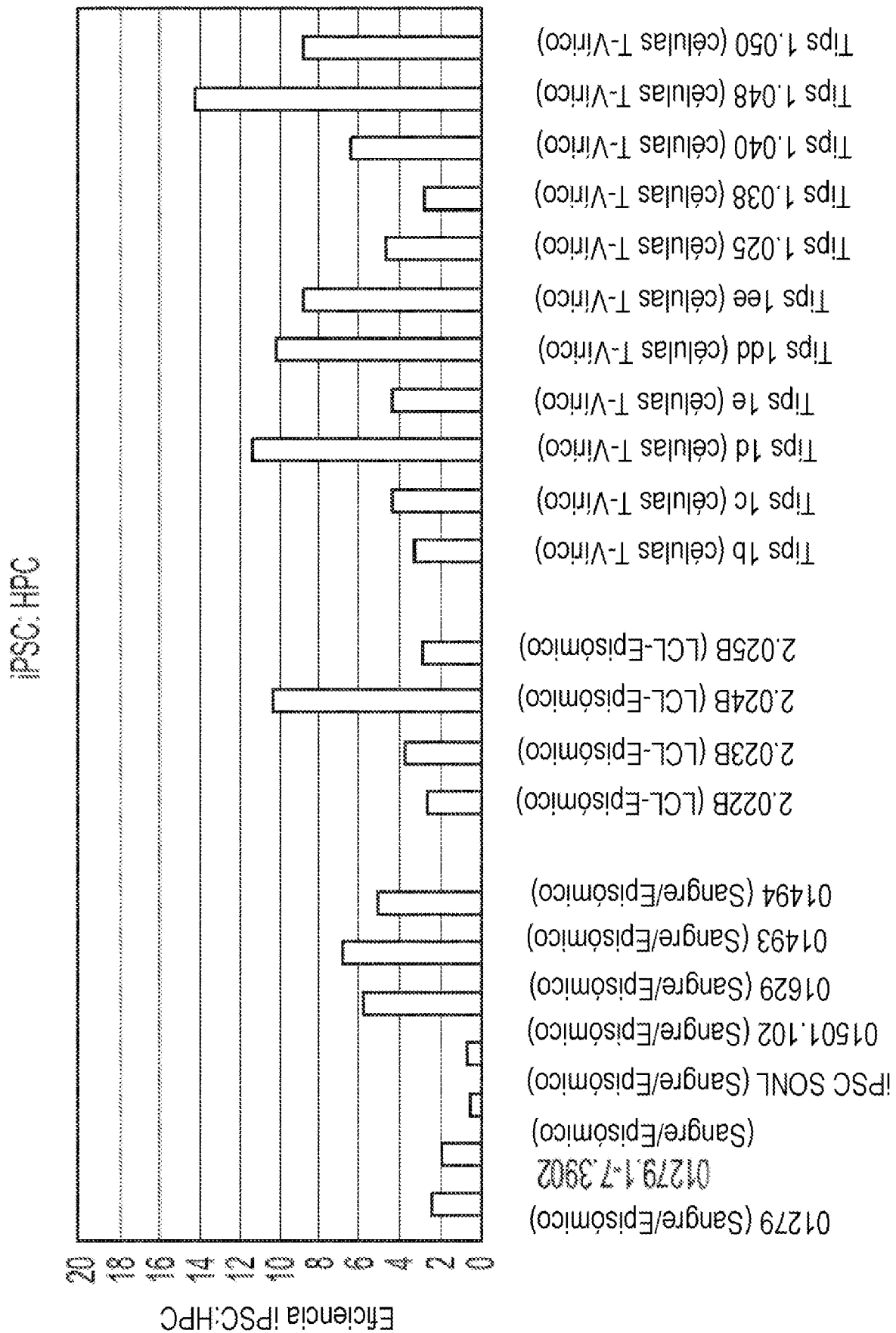


FIG. 1C



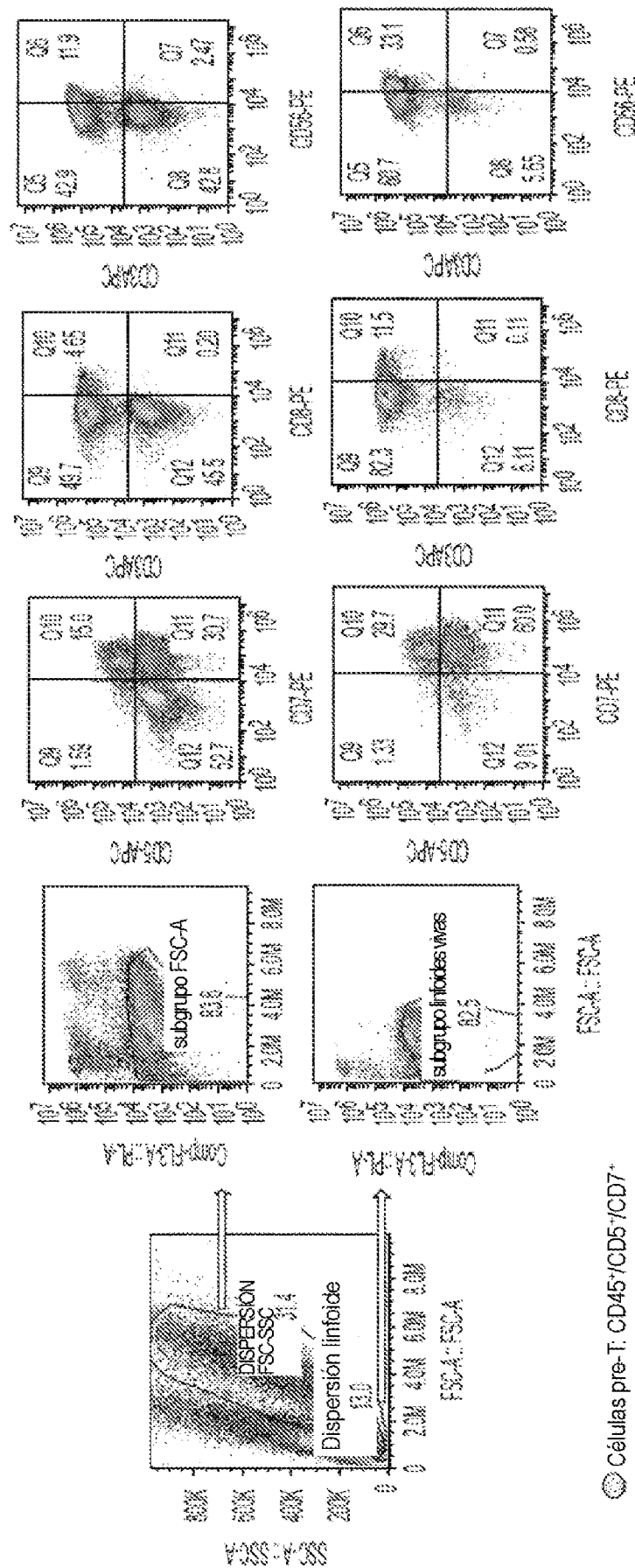


FIG. 2

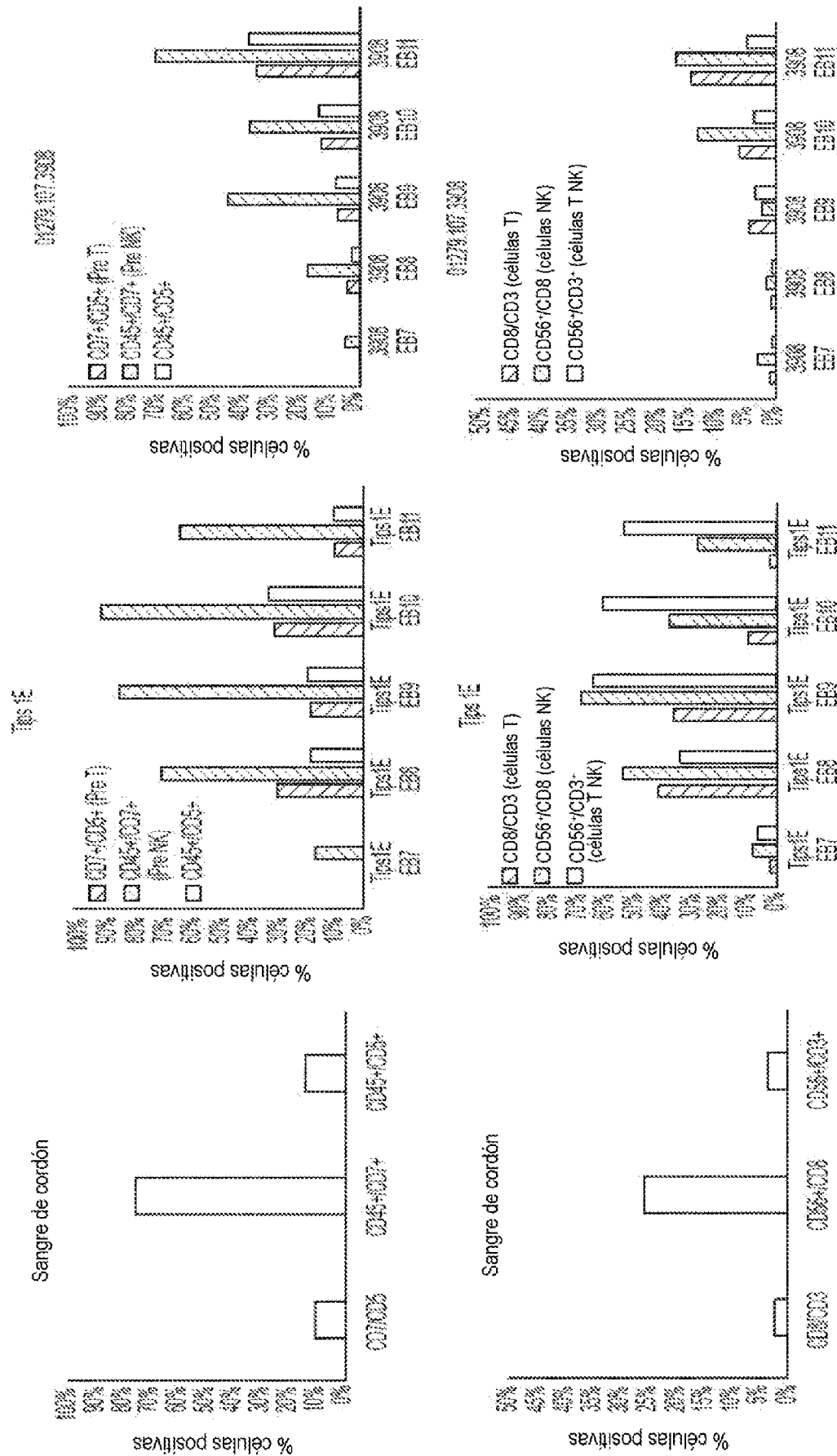


FIG. 3A

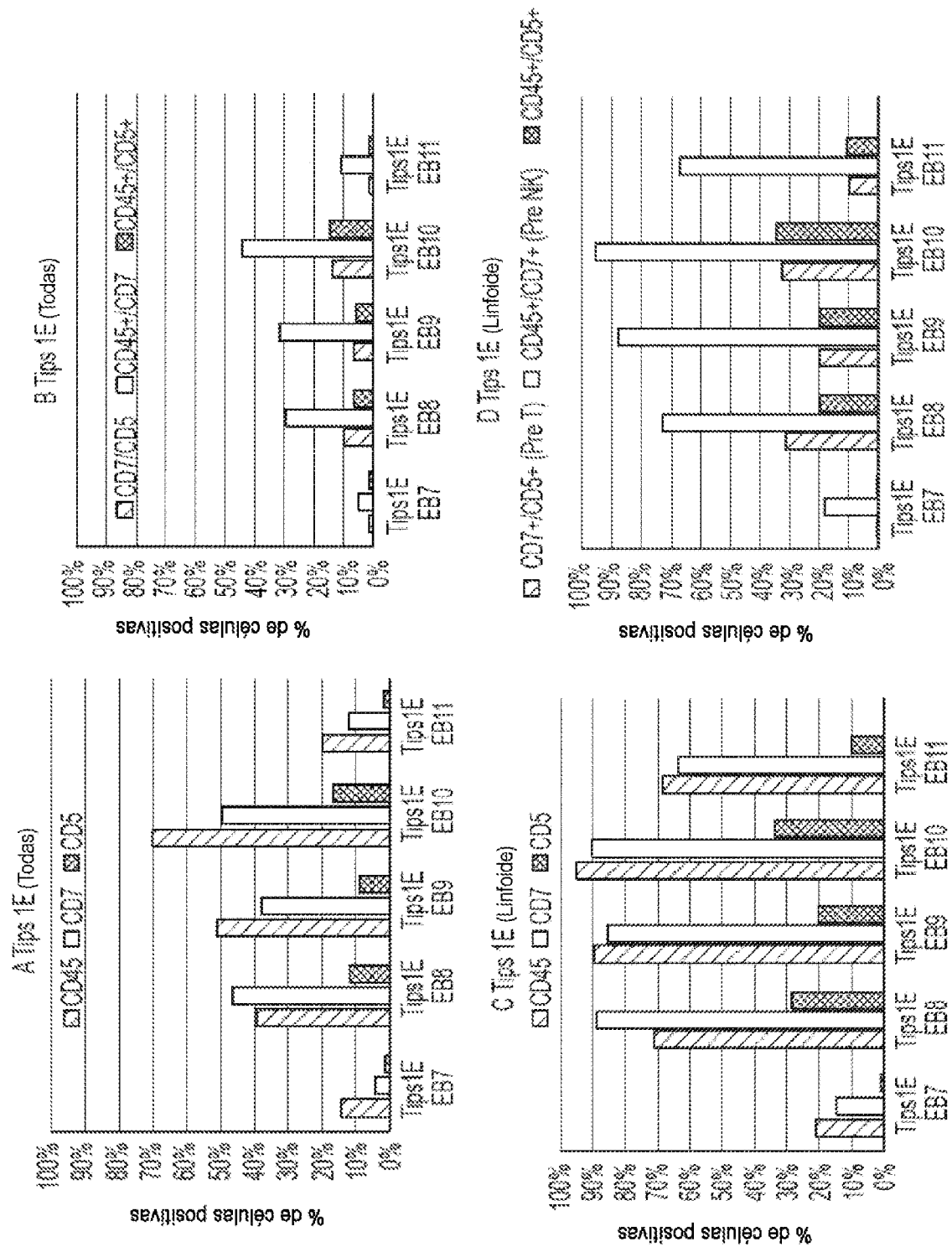


FIG. 3B

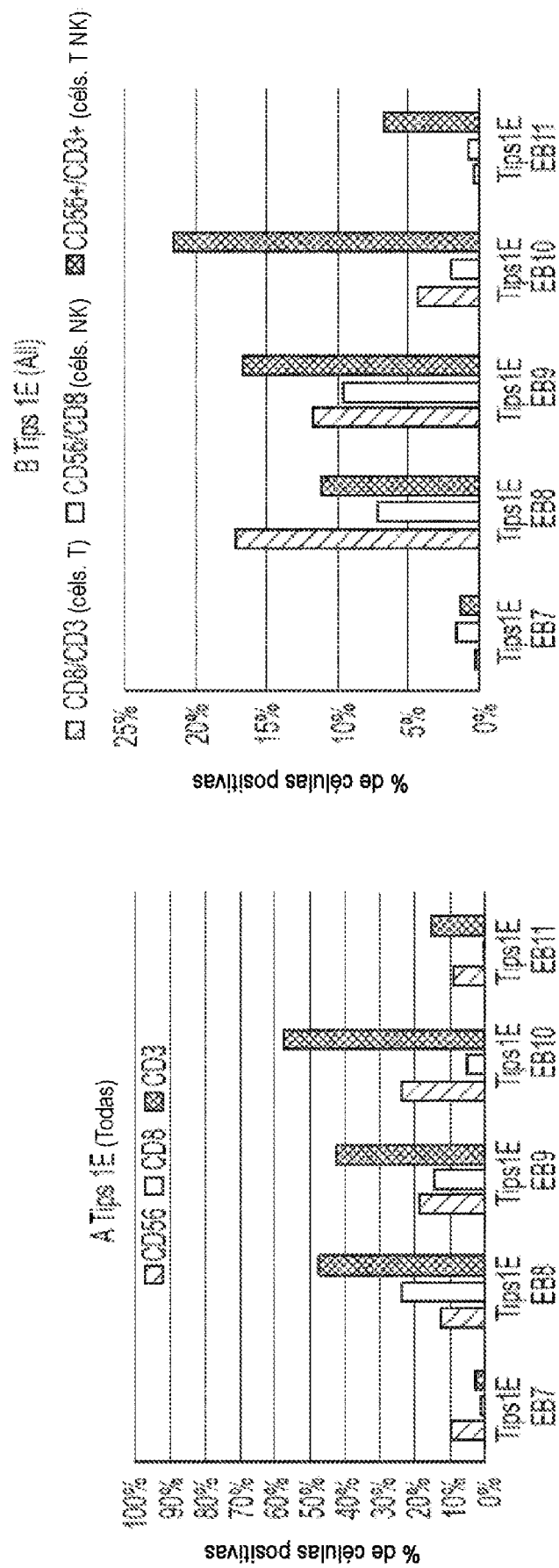


FIG. 3C

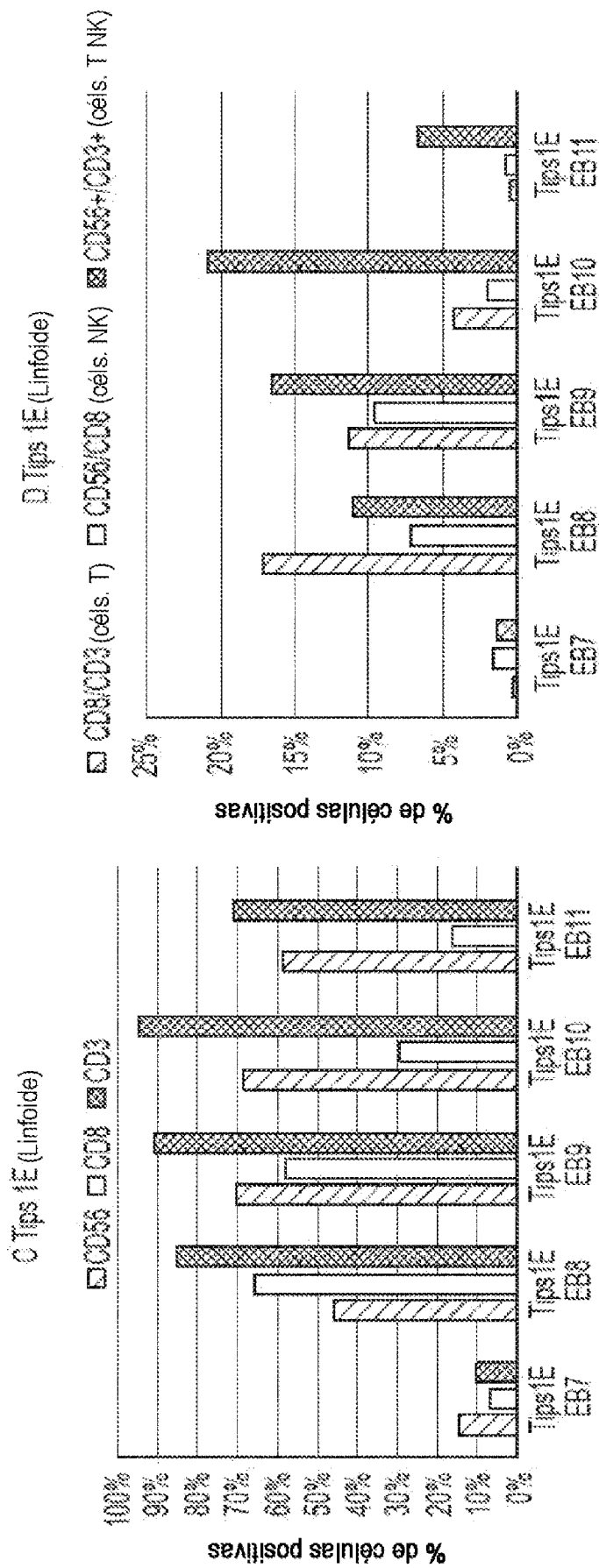


FIG. 3C cont.

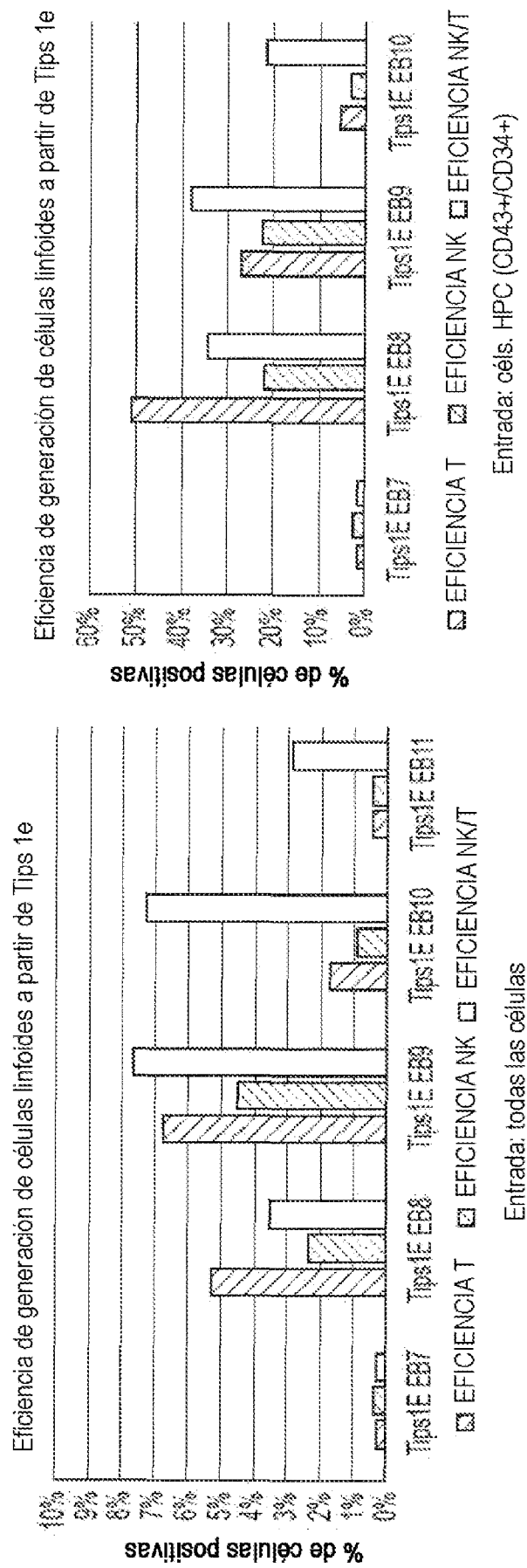


FIG. 3D

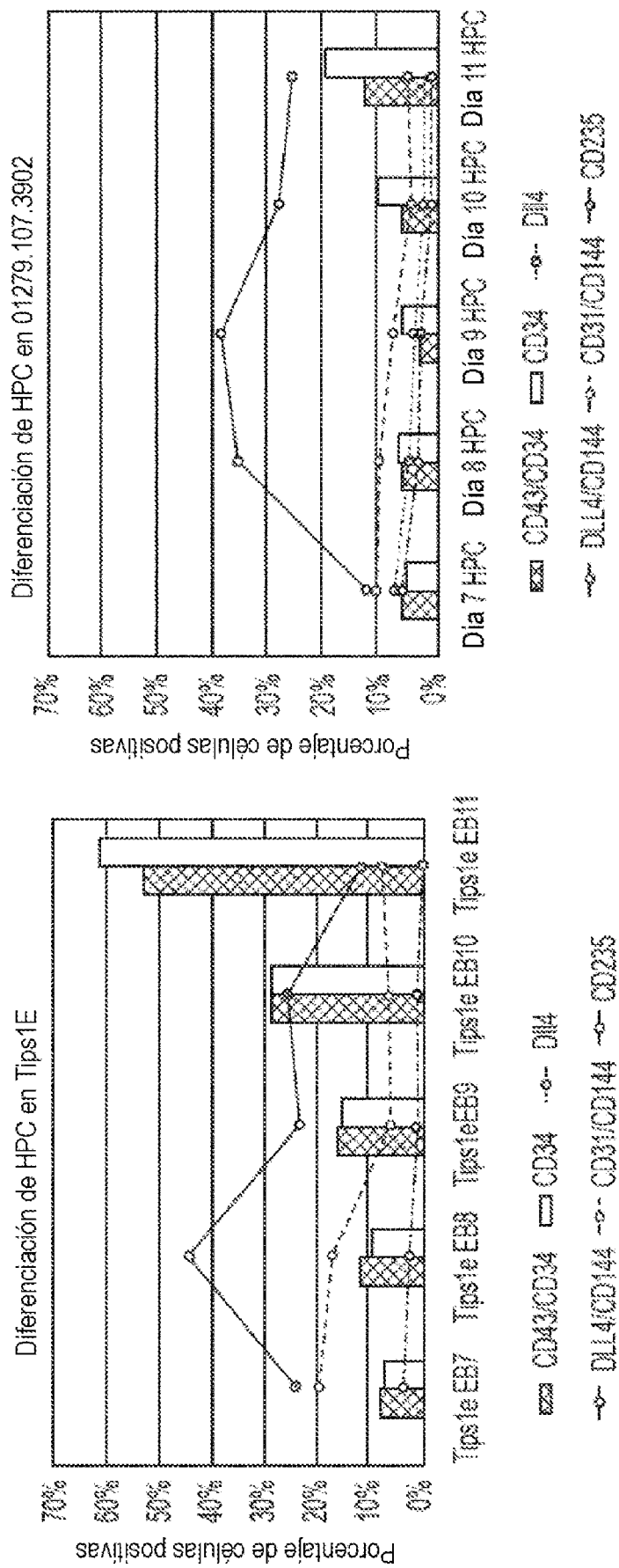


FIG. 4

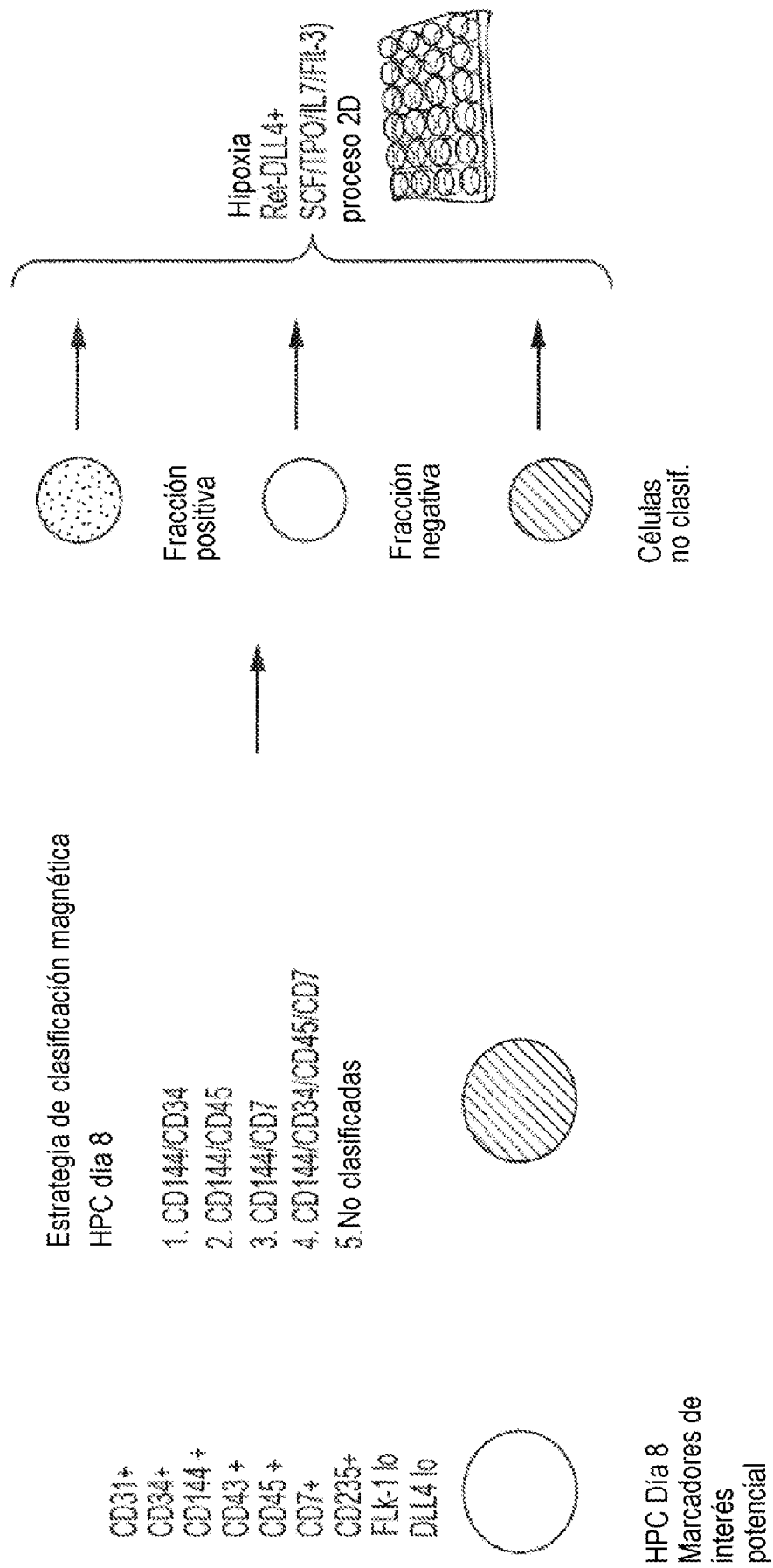


FIG. 5

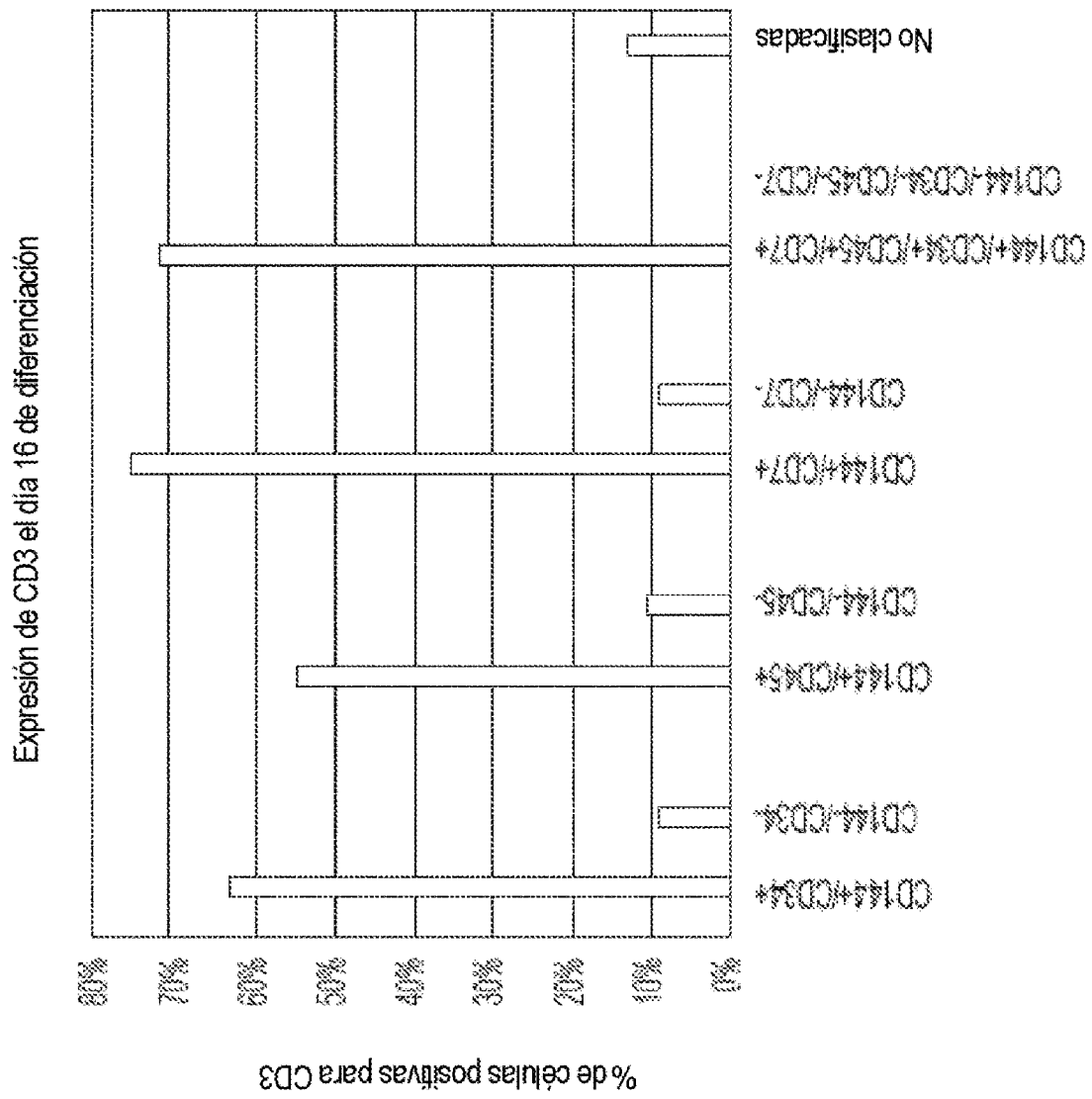


FIG. 6A

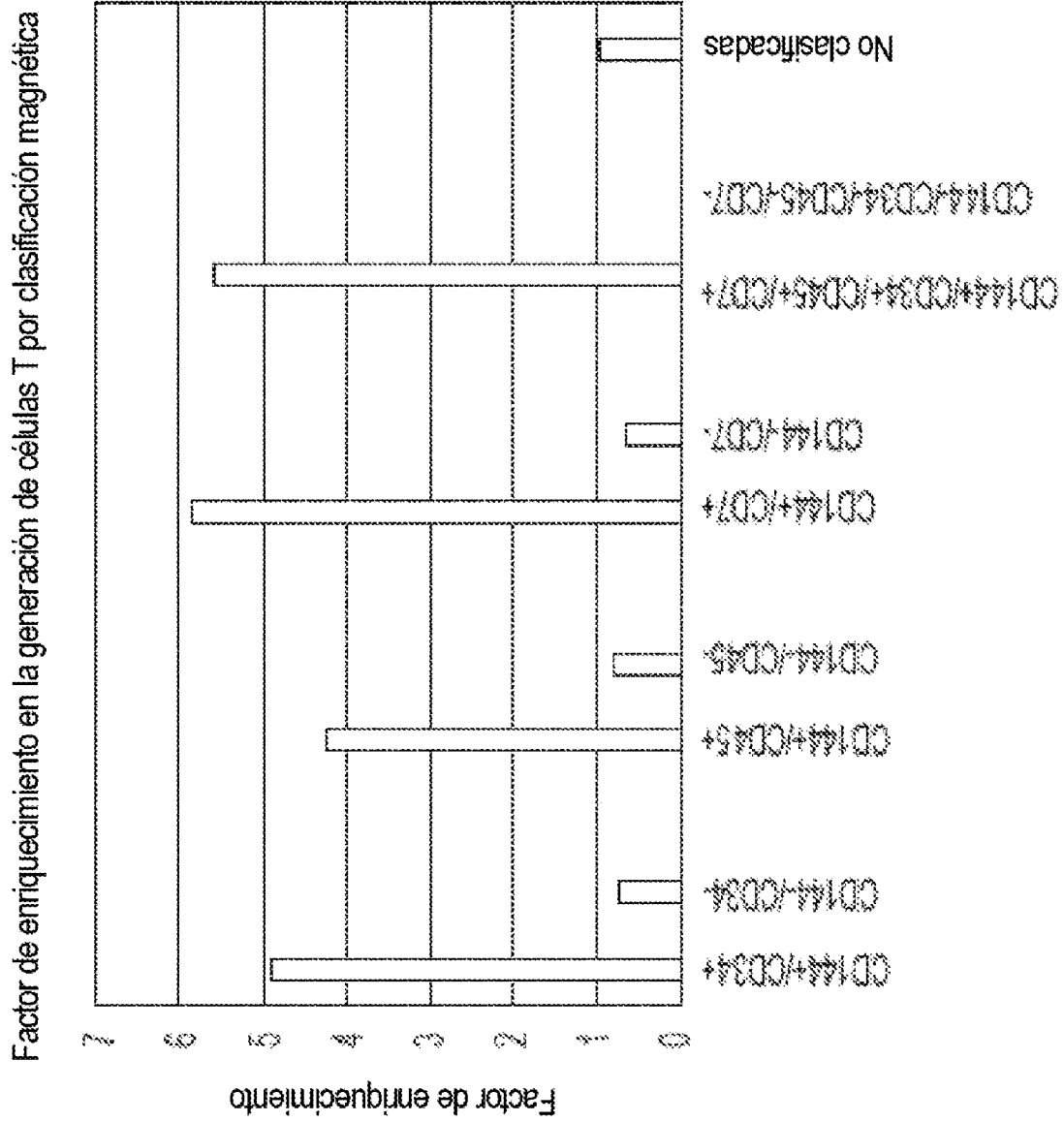


FIG. 6B

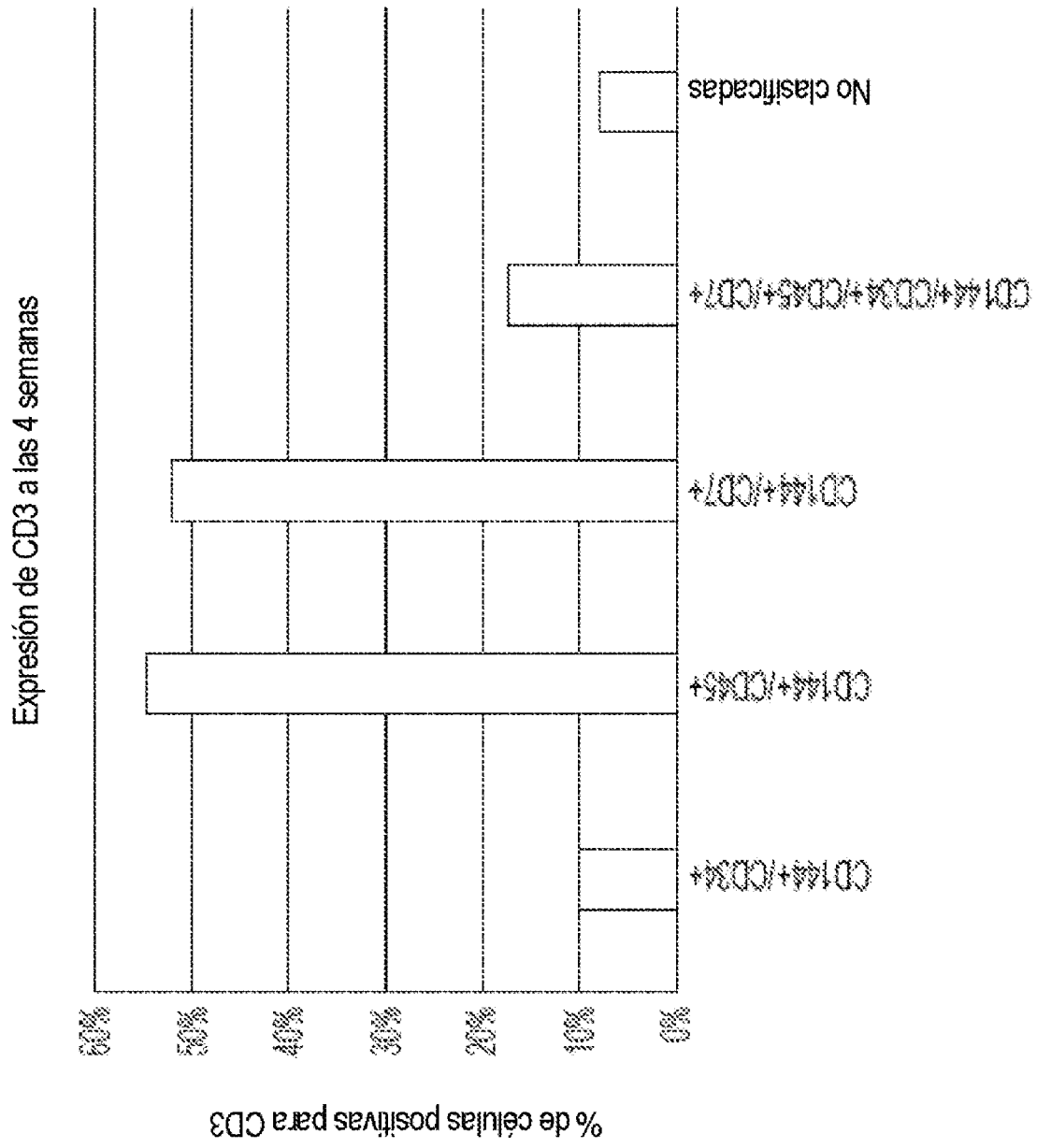


FIG. 7A

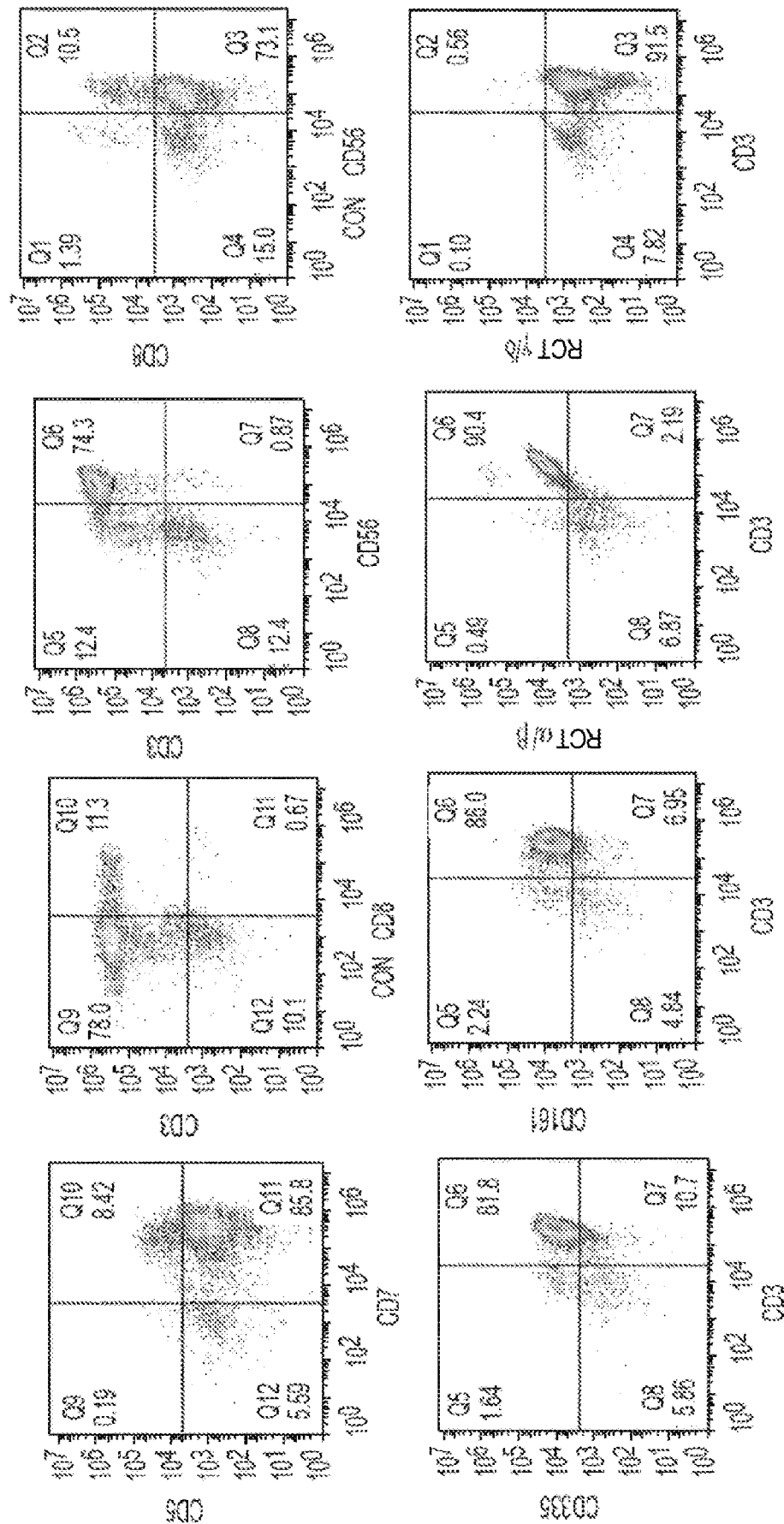


FIG. 7B

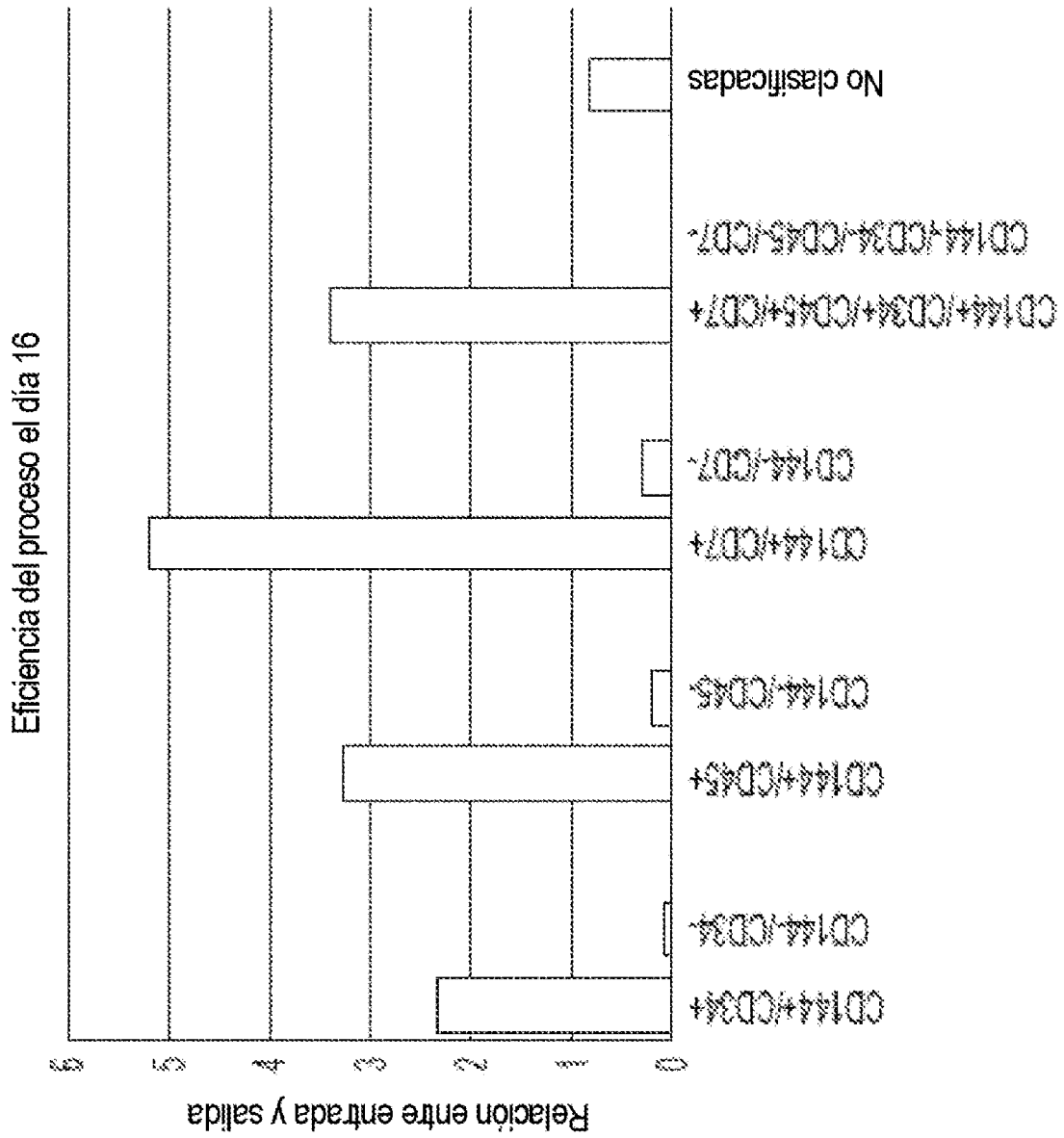


FIG. 8A

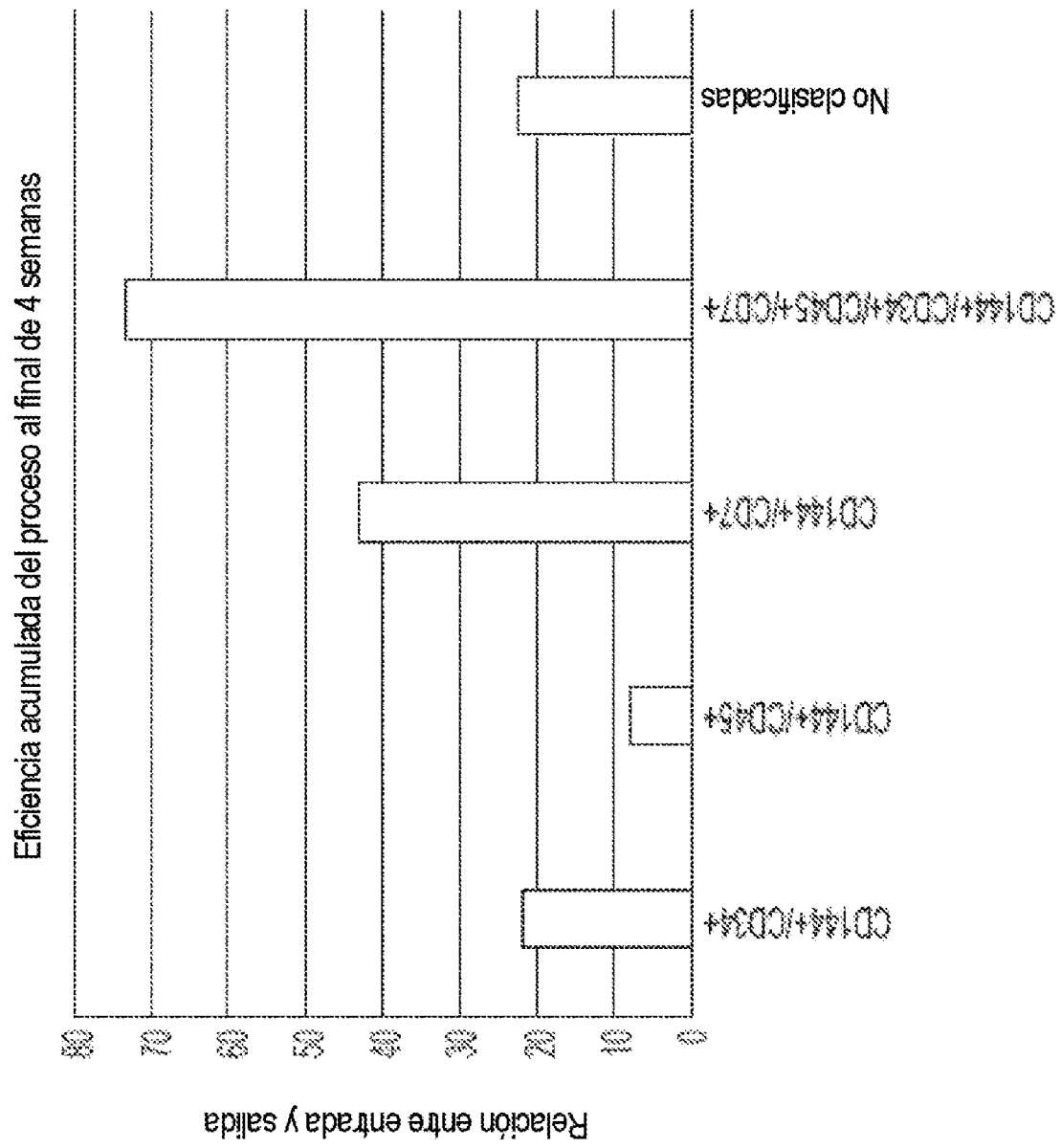


FIG. 8B

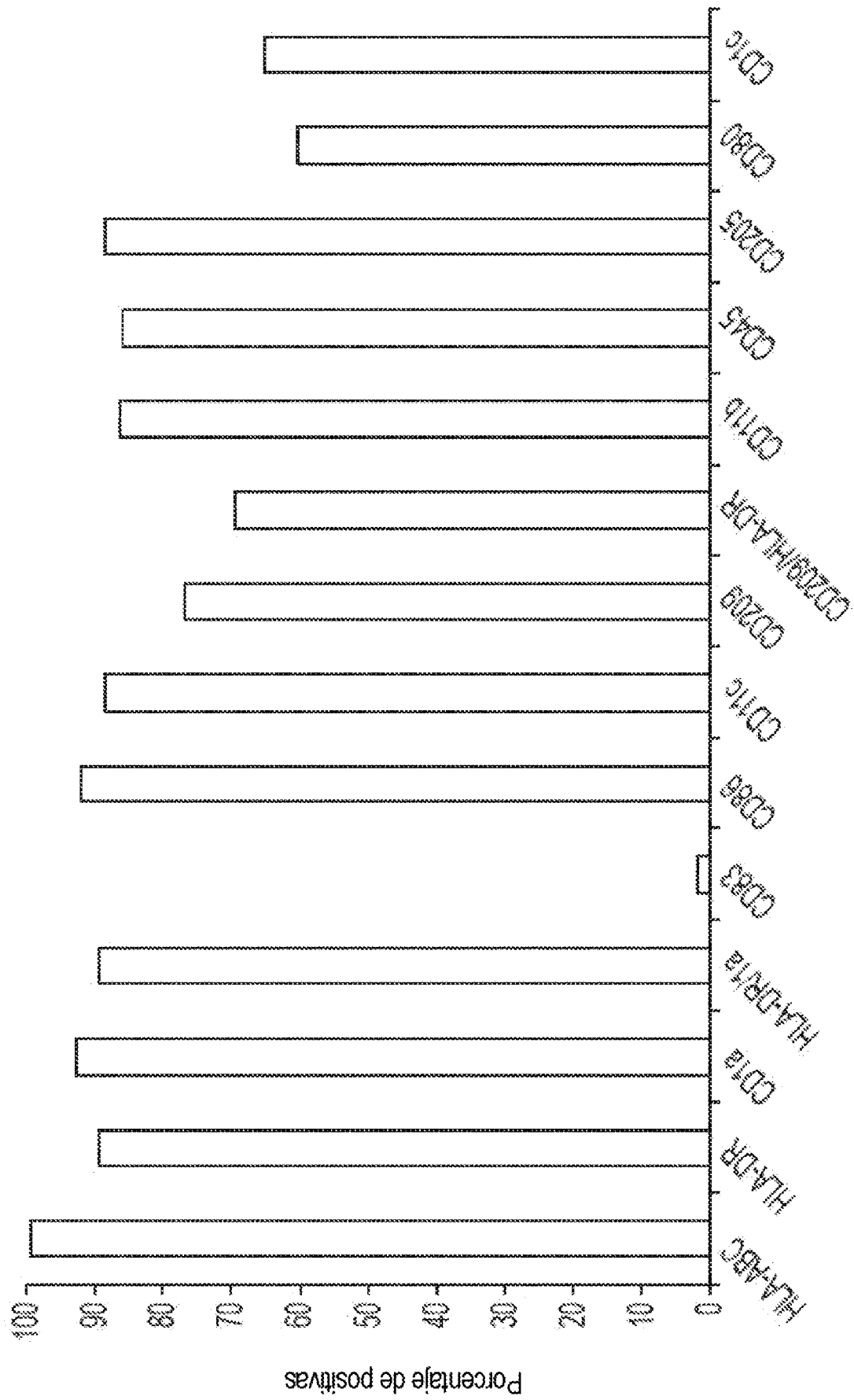


FIG. 9A

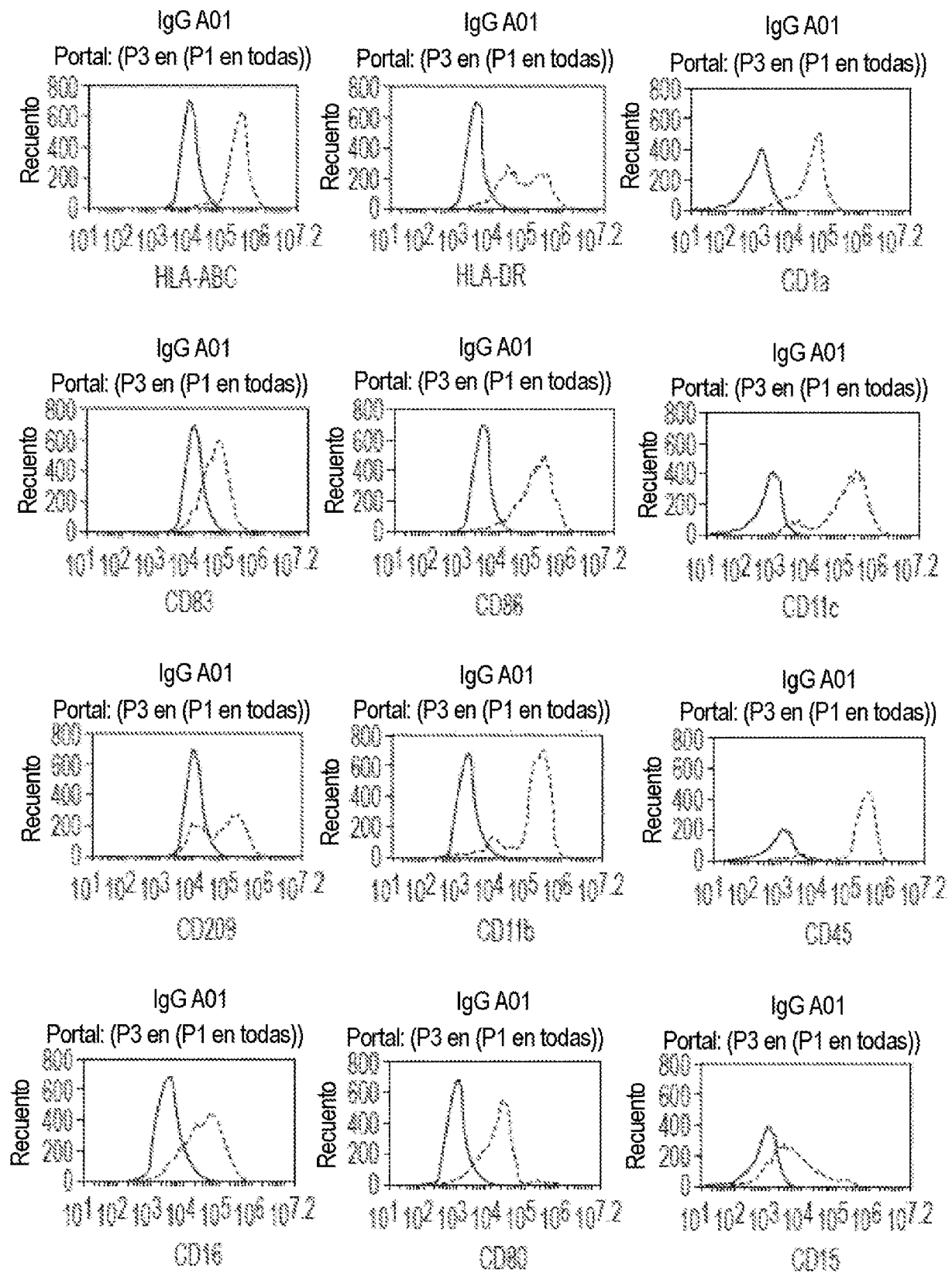


FIG. 9B

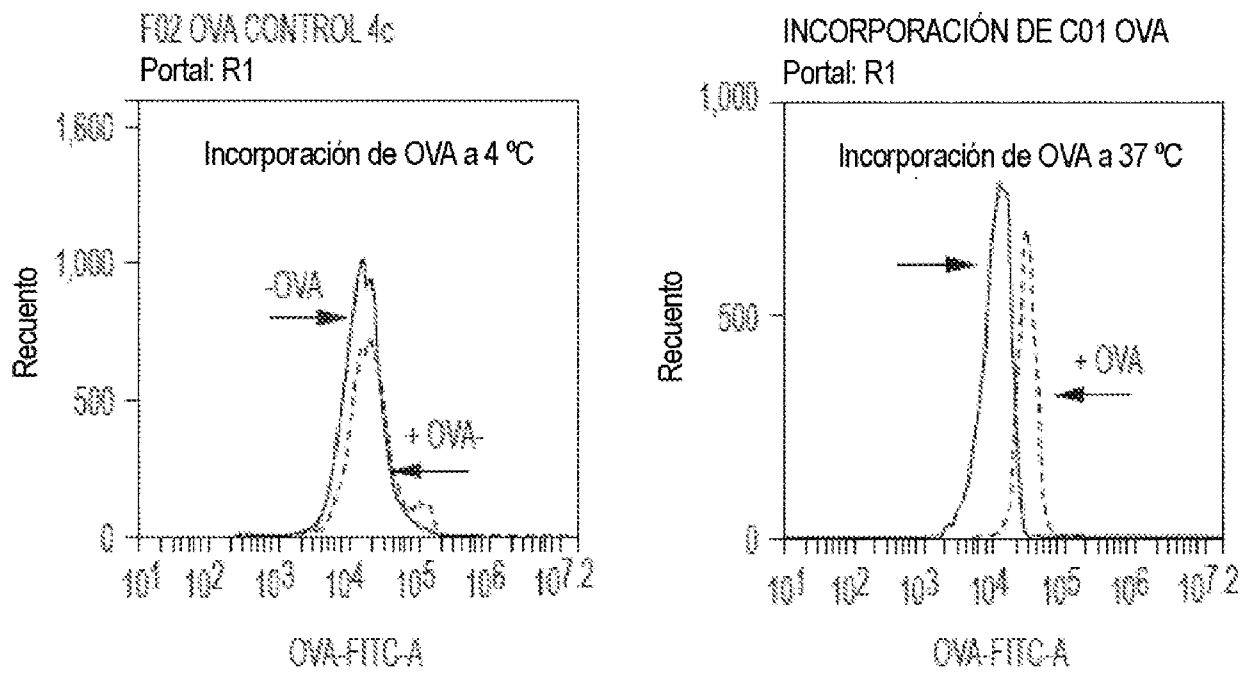


FIG. 10

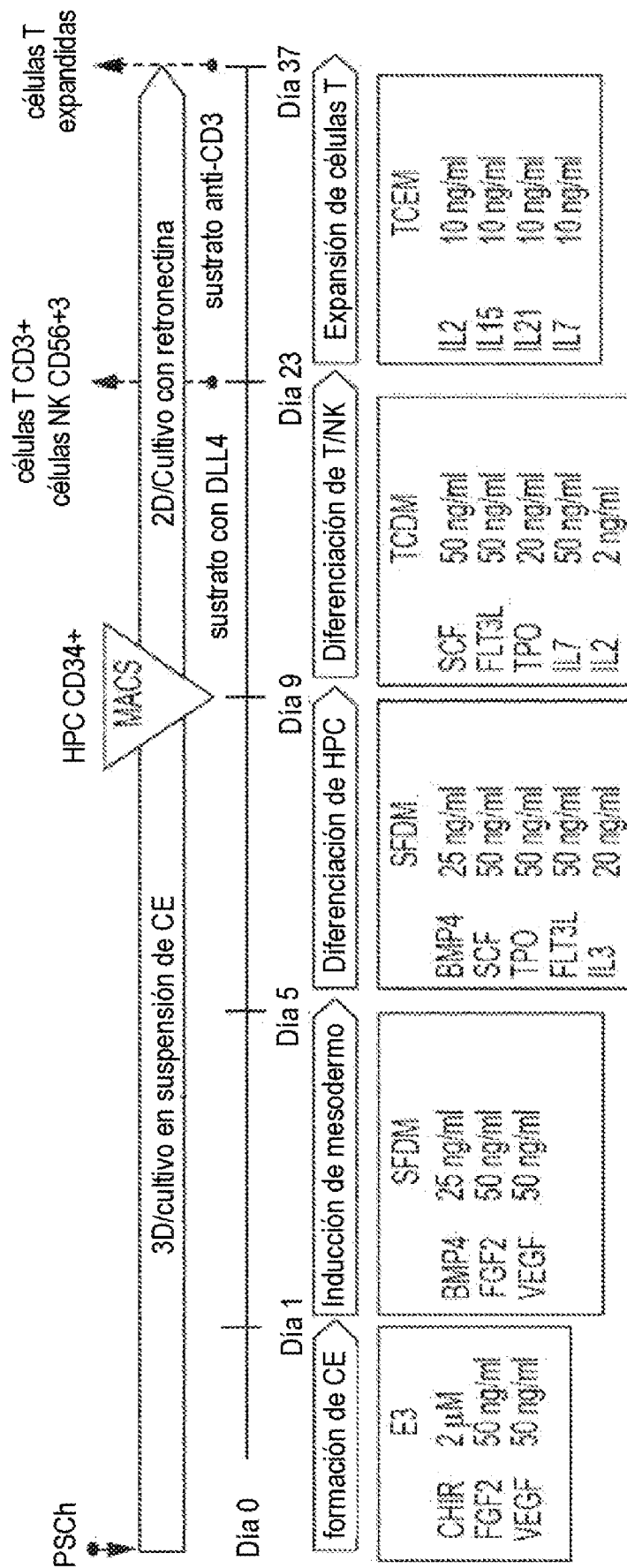


FIG. 11

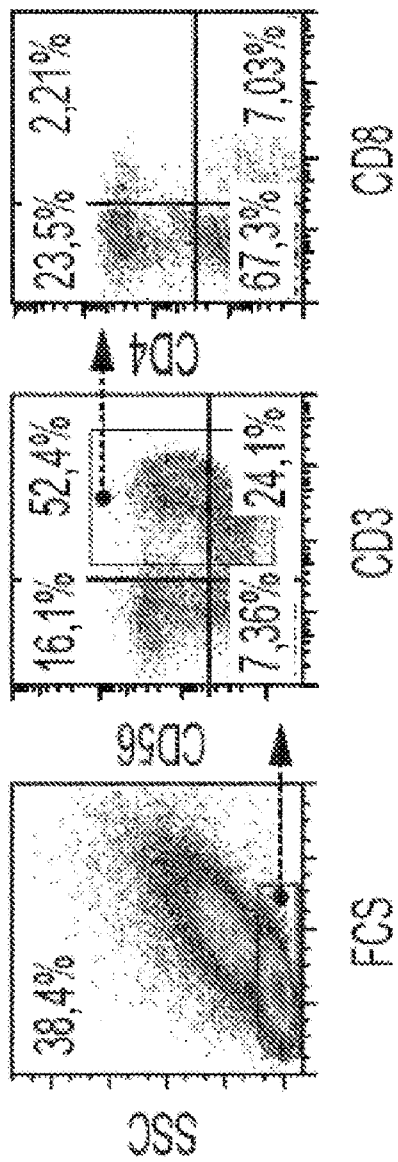


FIG. 12

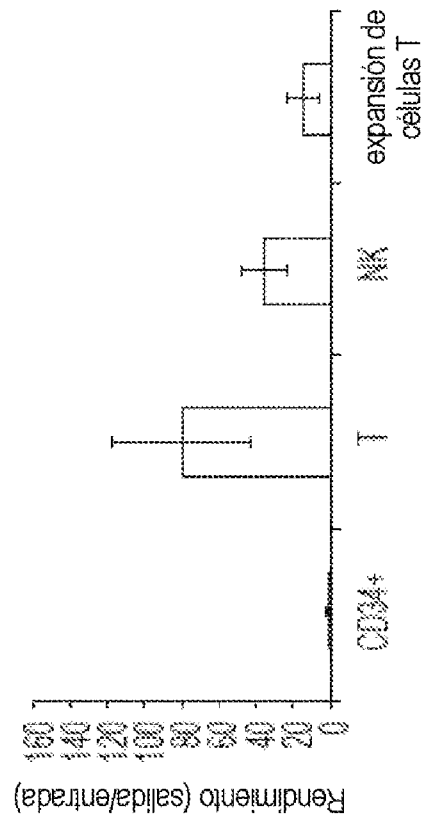


FIG. 13

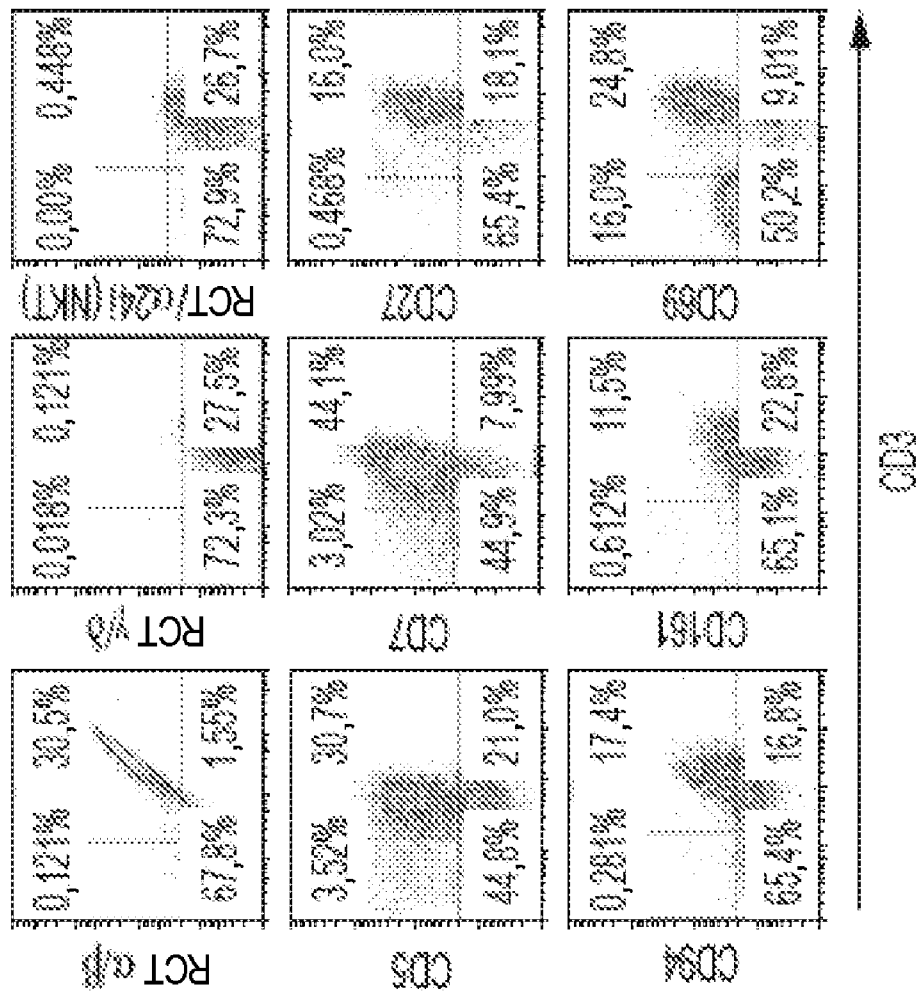


FIG. 14

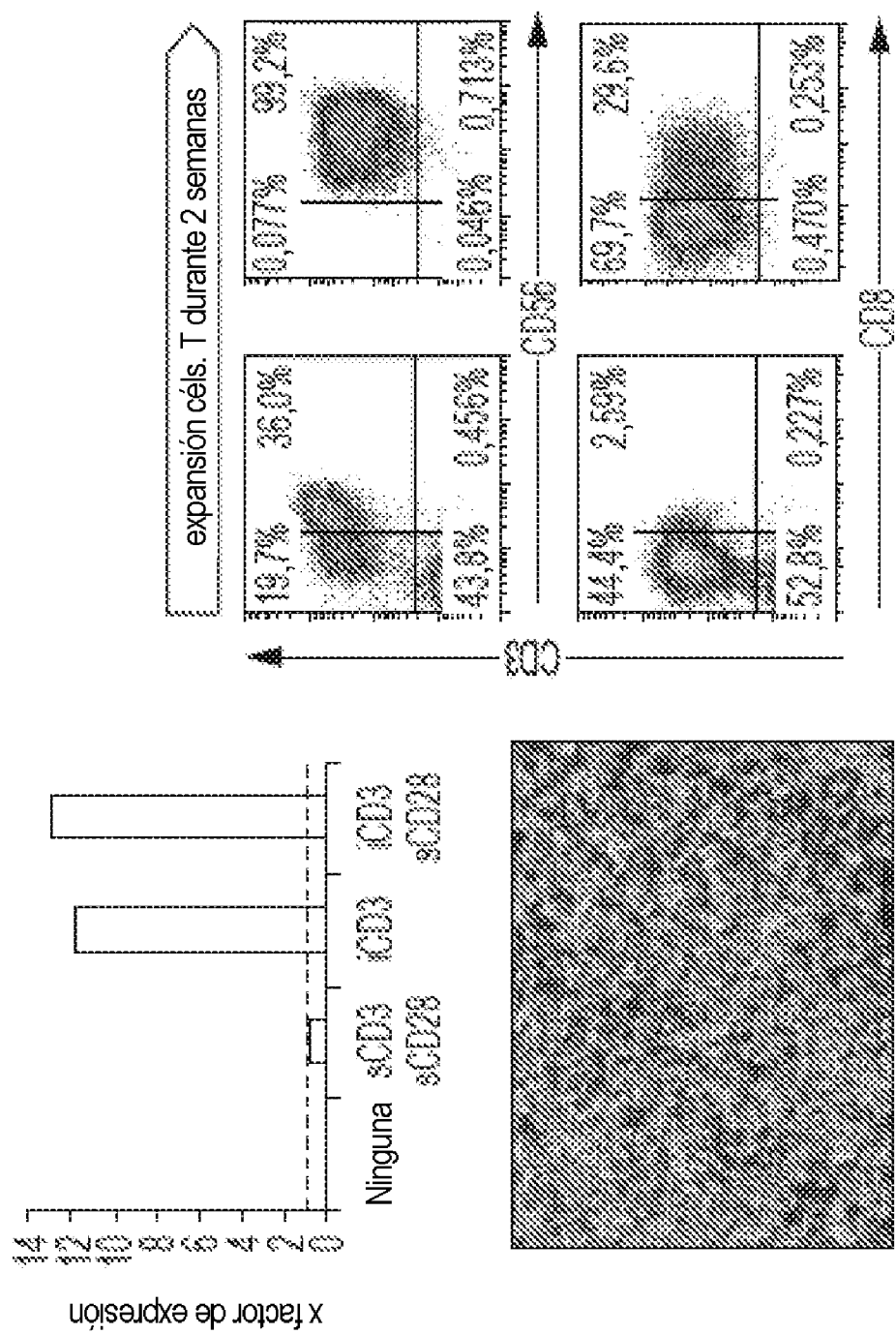


FIG. 15

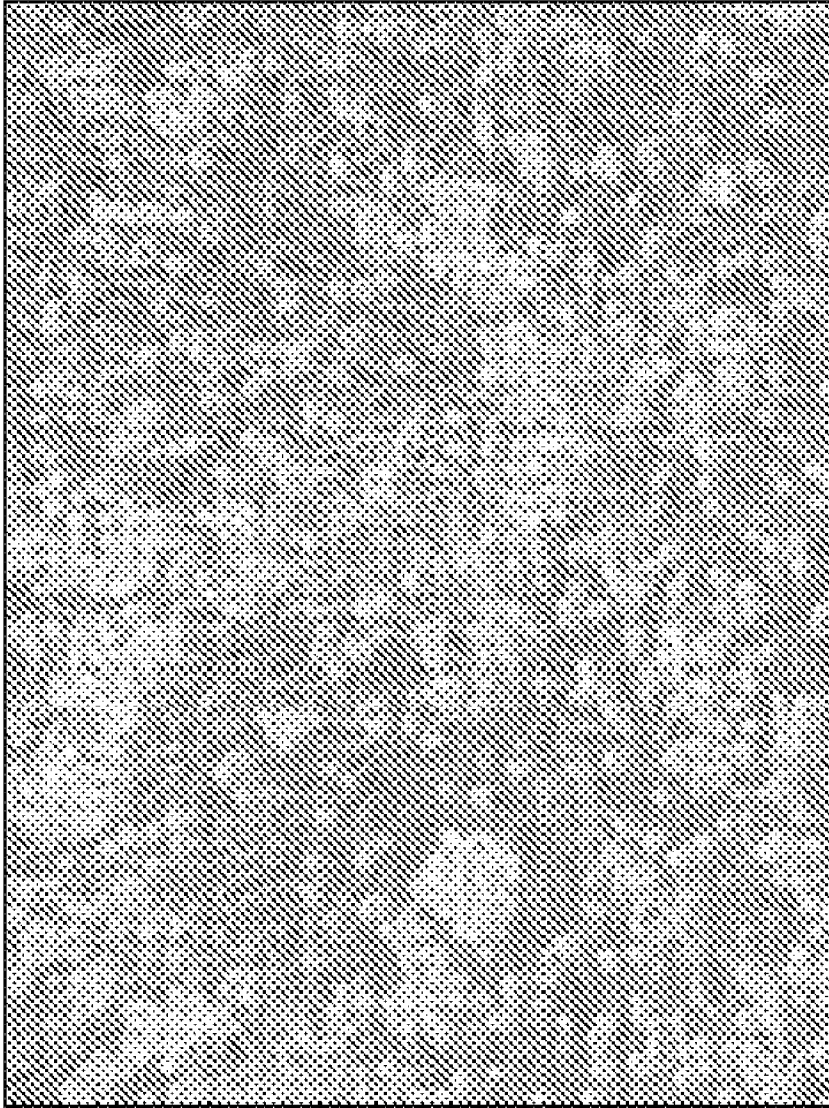


FIG. 16A

Día 0	Días 1-4	Días 5-12	Duración
SFD + Bleb. (6 μ M)	SFD 2D	SFD 2D	Medio
BMP4, VEGF, bFGF	BMP4, VEGF, bFGF	Flt-3L, SCF, TPO, IL-3, IL-6	Factores

FIG. 16B

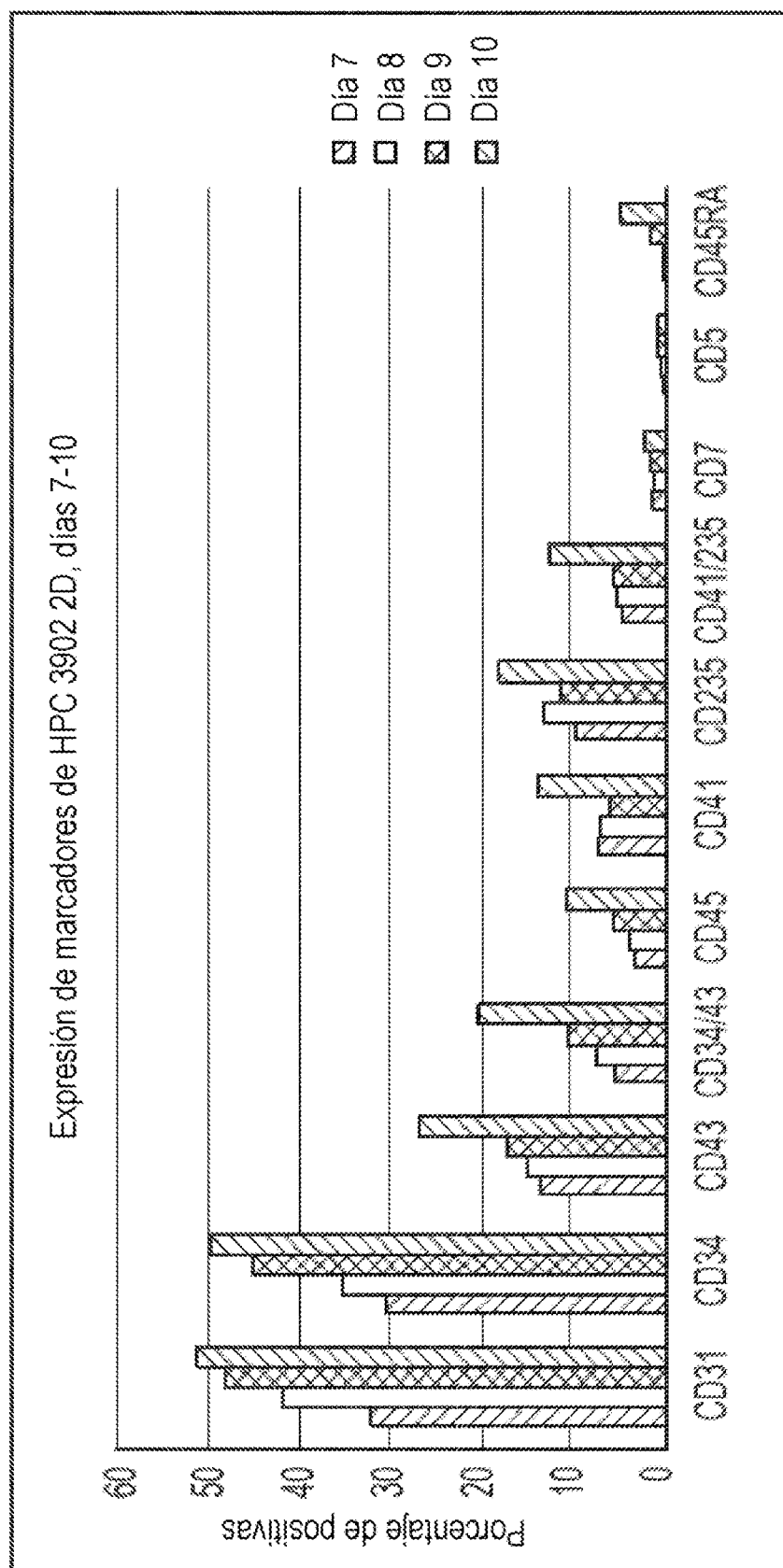


FIG. 16C

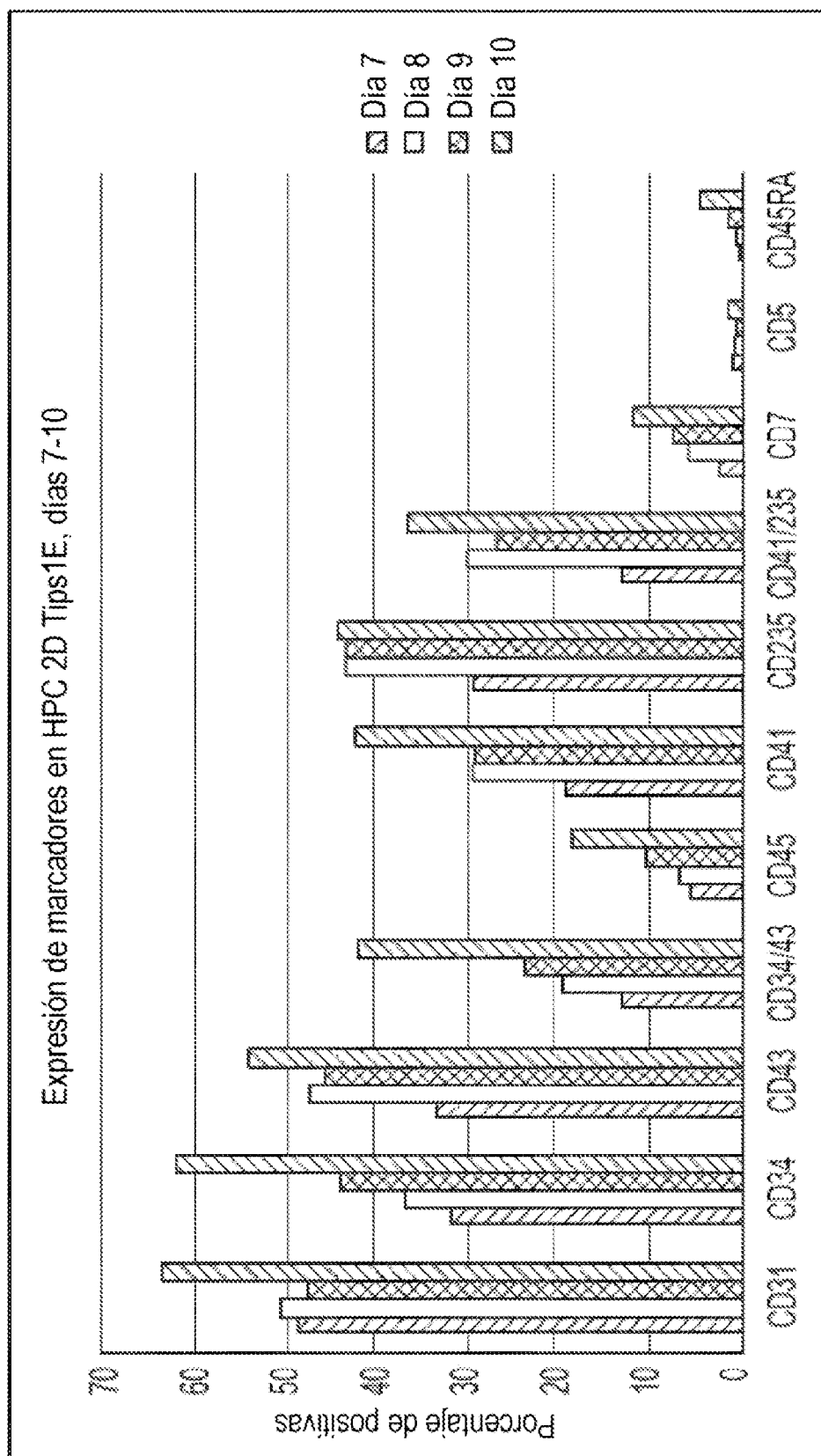


FIG. 16D

302		Entrada:Salida
		CD4304+
Día 7		1:054
Día 8		1:107
Día 9		1:115
Día 10		1:379
Type		Entrada:Salida
		CD4304+
Día 7		1:084
Día 8		1:251
Día 9		1:313
Día 10		1:939

FIG. 16E

Expresión de marcadores de células T 3902 2D, 2 semanas

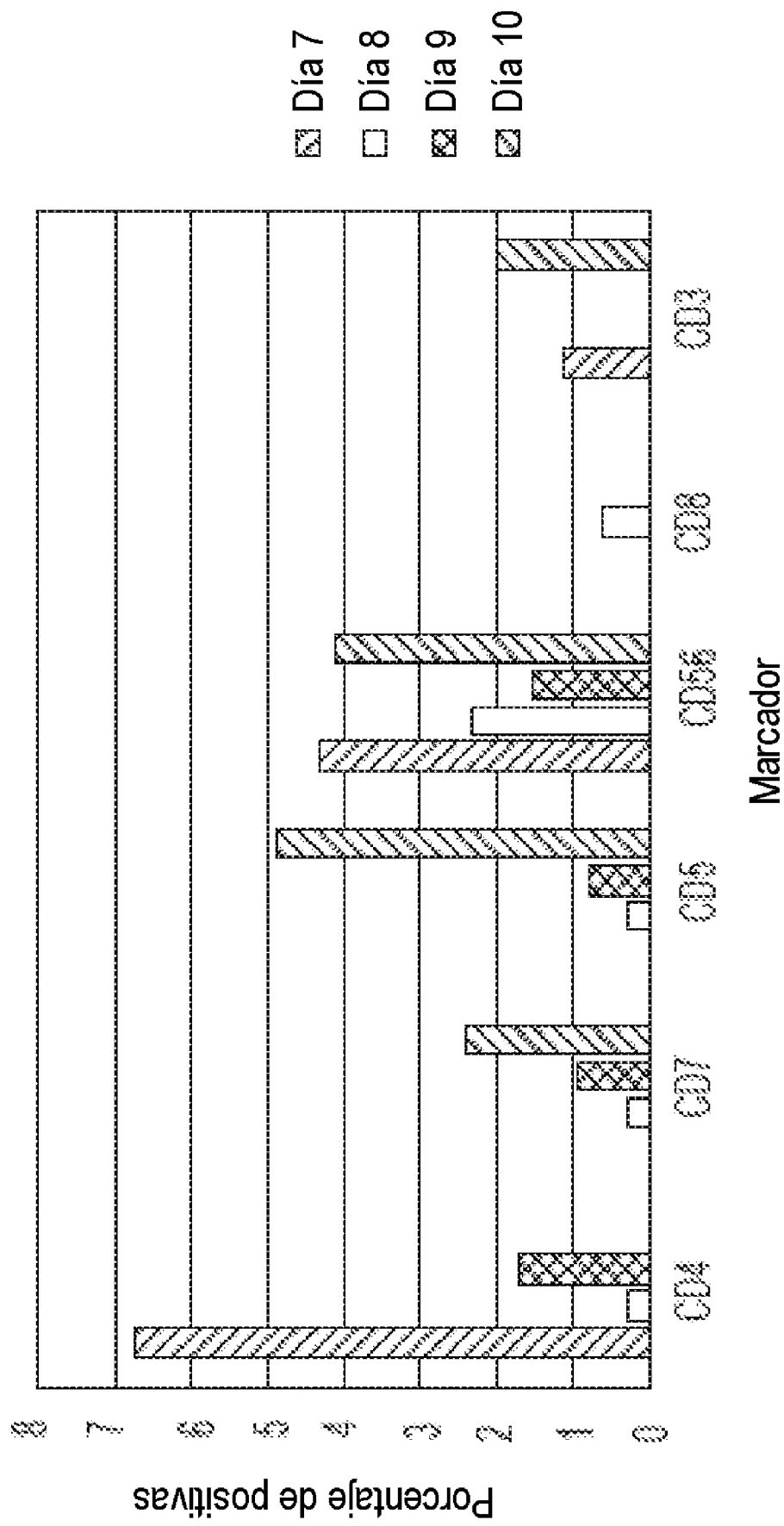


FIG. 16F

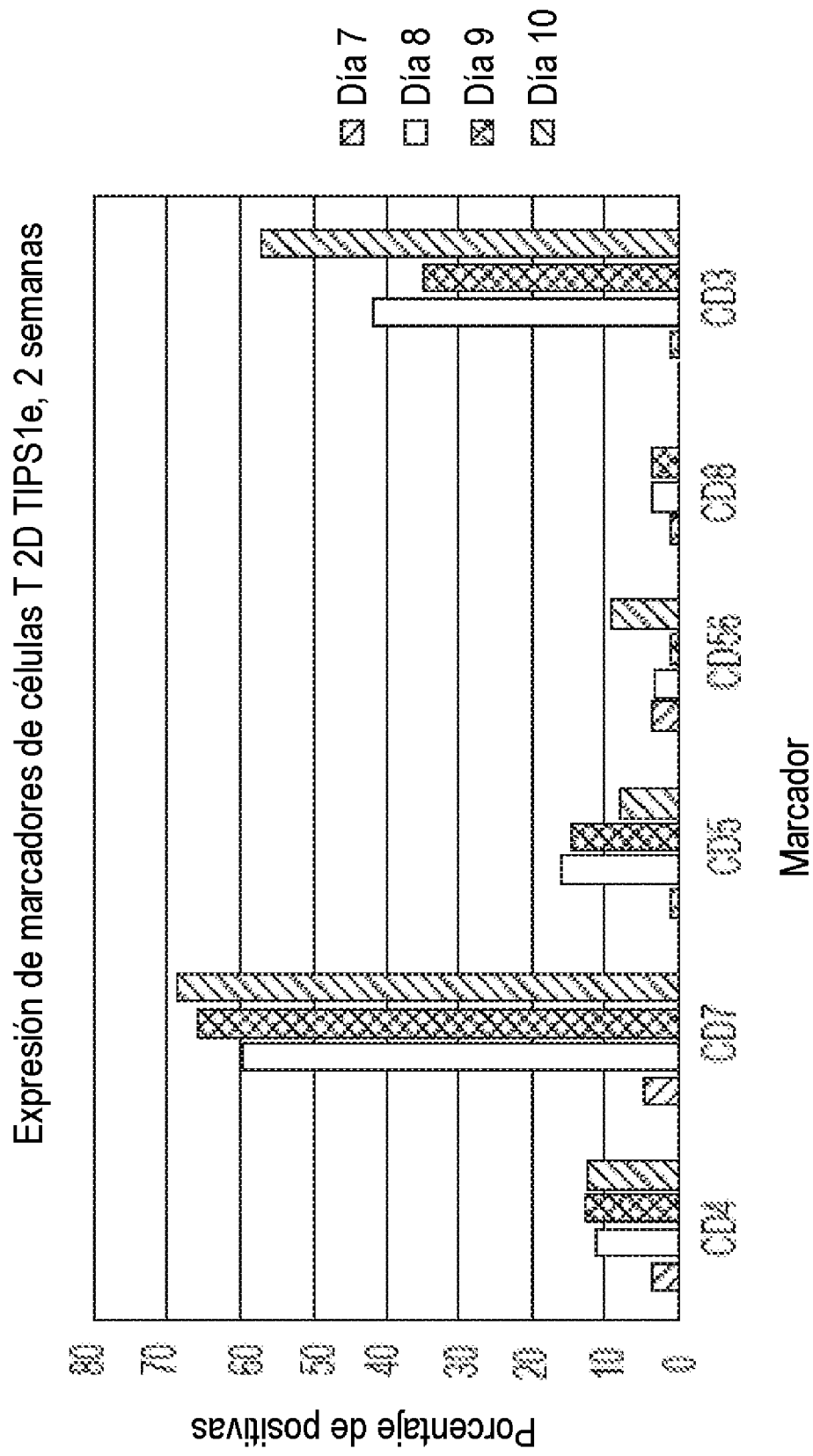


FIG. 16G

Dos semanas	
2012	Entrada, HPC; Salida, CD3+
Día 7	1:0,11
Día 8	1:0
Día 9	1:0
Día 10	1:0,53
Tipos de	
Entrada HPC: Salida CD3+	
Día 7	1:0,091
Día 8	1:3,88
Día 9	1:2,73
Día 10	1:12

FIG. 16H

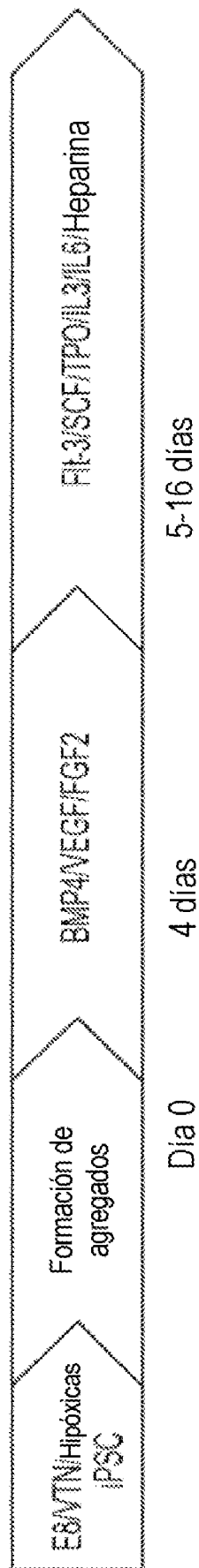


FIG. 17A

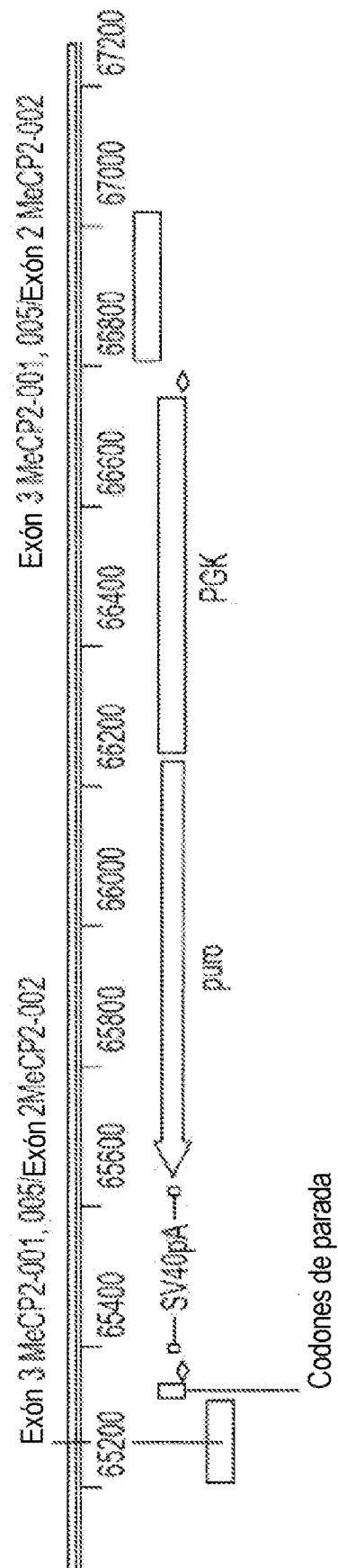


FIG. 17B

Metil-CpG	Dom. de unión
Sitio de manipul.	
MECP2-002	MSAAAAAPSGGGGGEEERLEEESEIQILQGLMDPLKFKYVKKDKKEEKEGKHEPVQP
MECP2-005	-----MVAGMLGLREEKSELQILQGLMDPLKFKYVKKDKKEEKEGKHEPVQP
MECP2-001	-----MVAGMLGLREEKSELQILQGLMDPLKFKYVKKDKKEEKEGKHEPVQP
MECP2-008	-----MVAGMLGLREEKSELQILQGLMDPLKFKYVKKDKKEEKEGKHEPVQP
MECP2-002	SKYLAHHSAEPAEAGKAETSEGSGSAPAVPEASASPQRRAIIRDRGMYDDPTLPFGWTKL
MECP2-005	SKYLAHNSAEPAEAGKAETSEGSGSAPAVPEASASPQRRAIIRDRGMYDDPTLPFGWTKL
MECP2-001	SKYLAHNSAEPAEAGKAETSEGSGSAPAVPEASASPQRRAIIRDRGMYDDPTLPFGWTKL
MECP2-008	SKYLA-----
MECP2-002	KQKSGRSAGKYDVLINPQGAFRSKVELIAYFEKVGDTSLDNDFTETVTGRCSPSR
MECP2-005	KQKSGRSAGKYDVLINPQGAFRSKVELIAYFEKVGDTSLDNDFTETVTGRCSPSR
MECP2-001	KQKSGRSAGKYDVLINPQGAFRSKVELIAYFEKVGDTSLDNDFTETVTGRCSPSR
MECP2-008	KQKSGRSAGKYDVLINPQGAFRSKVELIAYFEKVGDTSLDNDFTETVTGRCSPSR
MECP2-002	EQKPKKPKNSPKADGTGRGGRPGSGOTTRPKAATSECVQVKEVLEKSPCKLLVNMPTQT
MECP2-005	-----EQKPKKPKNSPKADGTGRGGRPGSGOTTRPKAATSECVQVKEVLEKSPCKLLVNMPTQT
MECP2-001	-----EQKPKKPKNSPKADGTGRGGRPGSGOTTRPKAATSECVQVKEVLEKSPCKLLVNMPTQT
MECP2-008	-----EQKPKKPKNSPKADGTGRGGRPGSGOTTRPKAATSECVQVKEVLEKSPCKLLVNMPTQT
MECP2-002	SPGGKALGGGATTSTQVWIKRPGKPKAEADPQAIPEKKGKPGSGVVAALAEAKKAV
MECP2-005	-----SPGGKALGGGATTSTQVWIKRPGKPKAEADPQAIPEKKGKPGSGVVAALAEAKKAV
MECP2-001	-----SPGGKALGGGATTSTQVWIKRPGKPKAEADPQAIPEKKGKPGSGVVAALAEAKKAV
MECP2-008	-----SPGGKALGGGATTSTQVWIKRPGKPKAEADPQAIPEKKGKPGSGVVAALAEAKKAV
MECP2-002	KESIRSVQETVLPKPKKKTRETYSIEVKEVVEPLIVSTLGEKSGKGLTKCKSPGRKKE
MECP2-005	-----KESIRSVQETVLPKPKKKTRETYSIEVKEVVEPLIVSTLGEKSGKGLTKCKSPGRKKE
MECP2-001	-----KESIRSVQETVLPKPKKKTRETYSIEVKEVVEPLIVSTLGEKSGKGLTKCKSPGRKKE
MECP2-008	-----KESIRSVQETVLPKPKKKTRETYSIEVKEVVEPLIVSTLGEKSGKGLTKCKSPGRKKE
MECP2-002	SSPKGRSSASSPFKKHKKHHHHSSESPKAPVPLLPPLPPPPPEPESSEDPTSPPPEQDL
MECP2-005	-----SSPKGRSSASSPFKKHKKHHHHSSESPKAPVPLLPPLPPPPPEPESSEDPTSPPPEQDL
MECP2-001	-----SSPKGRSSASSPFKKHKKHHHHSSESPKAPVPLLPPLPPPPPEPESSEDPTSPPPEQDL
MECP2-008	-----SSPKGRSSASSPFKKHKKHHHHSSESPKAPVPLLPPLPPPPPEPESSEDPTSPPPEQDL
MECP2-002	SSSVCKEKKNPRGGSLSSGCPKEPAKTQPAVRIAATAAEKTKHRCGERKDIVSSCNFR
MECP2-005	-----SSSVCKEKKNPRGGSLSSGCPKEPAKTQPAVRIAATAAEKTKHRCGERKDIVSSCNFR
MECP2-001	-----SSSVCKEKKNPRGGSLSSGCPKEPAKTQPAVRIAATAAEKTKHRCGERKDIVSSCNFR
MECP2-008	-----SSSVCKEKKNPRGGSLSSGCPKEPAKTQPAVRIAATAAEKTKHRCGERKDIVSSCNFR
MECP2-002	PNREEPVDSKTPVTERVS
MECP2-005	-----PNREEPVDSKTPVTERVS
MECP2-001	-----PNREEPVDSKTPVTERVS
MECP2-008	-----PNREEPVDSKTPVTERVS

FIG. 17C

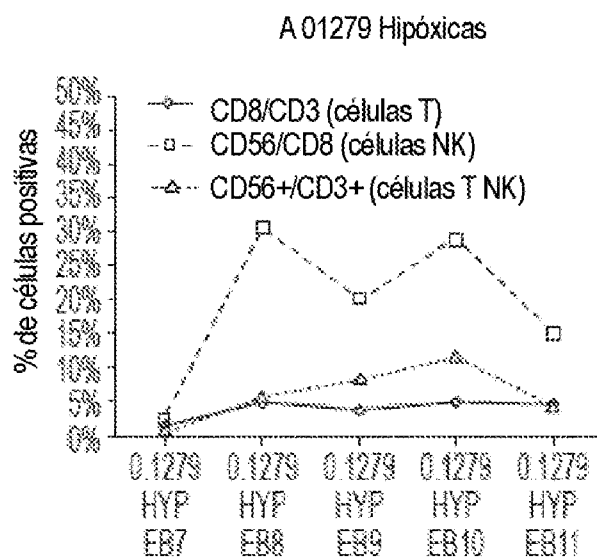


FIG. 18A

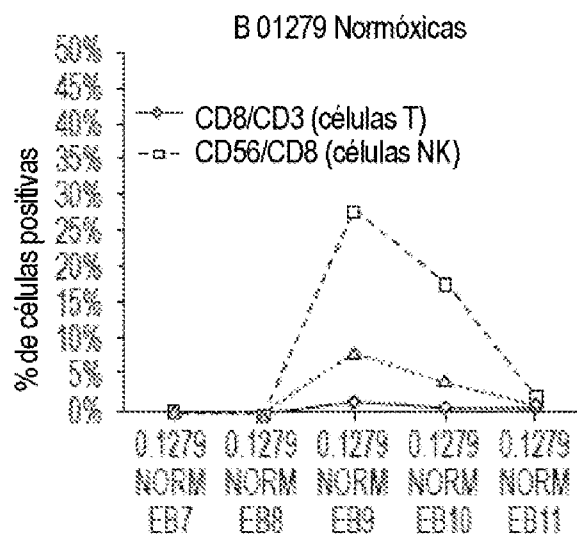


FIG. 18B

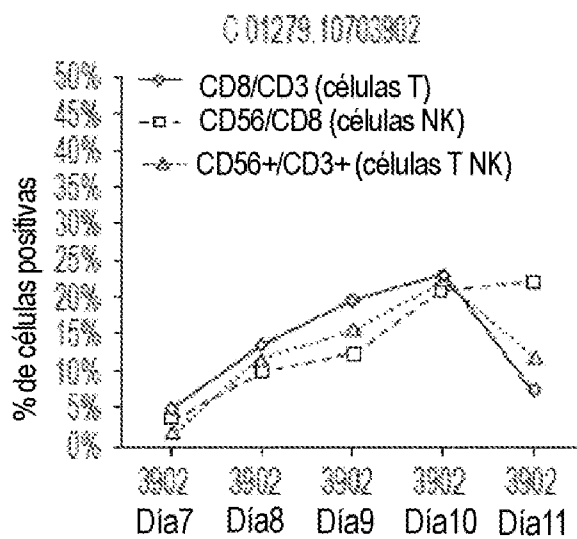


FIG. 18C

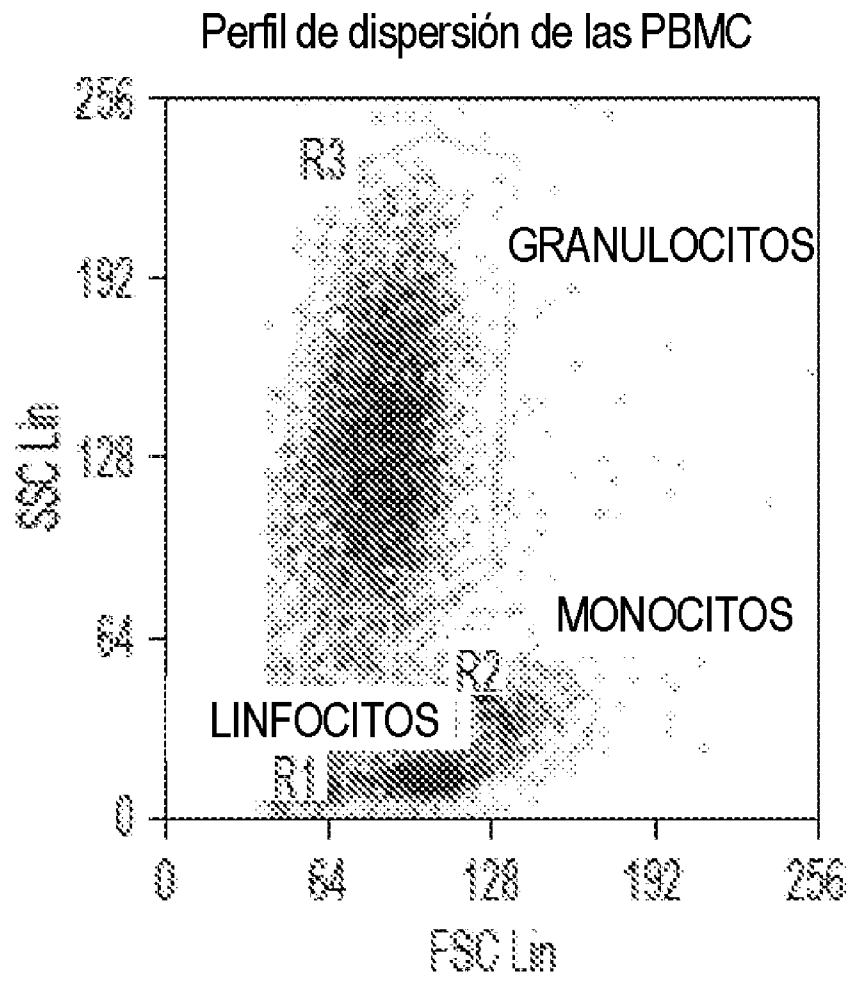
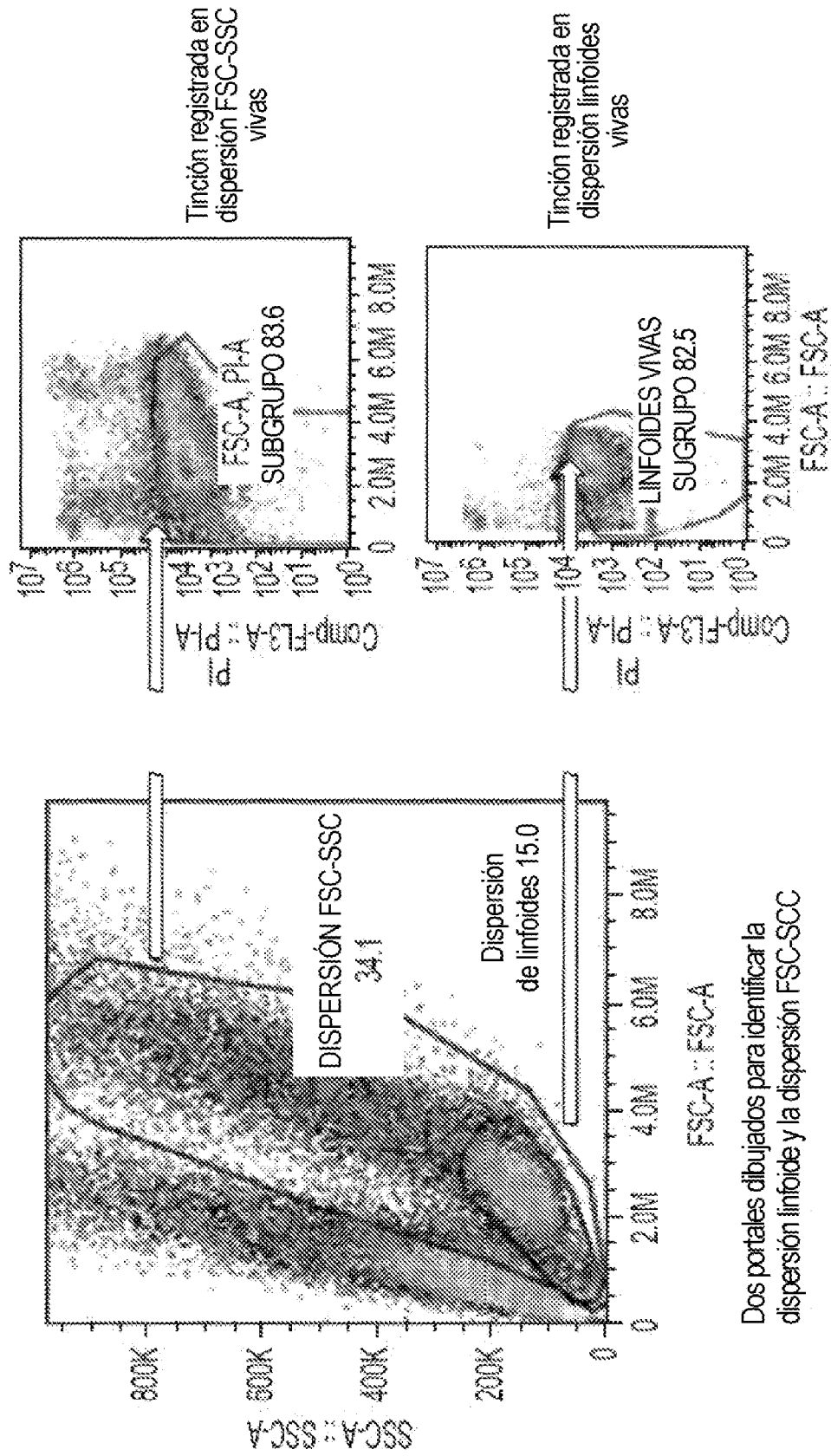


FIG. 19A

Perfil de dispersión de iPSC derivadas de la diferenciación linfóide



Células vivas en dispersión de linfoides y dispersión FSC-SSC

FIG. 19C

FIG. 19B

Dos portales dibujados para identificar la dispersión linfóide y la dispersión FSC-SSC

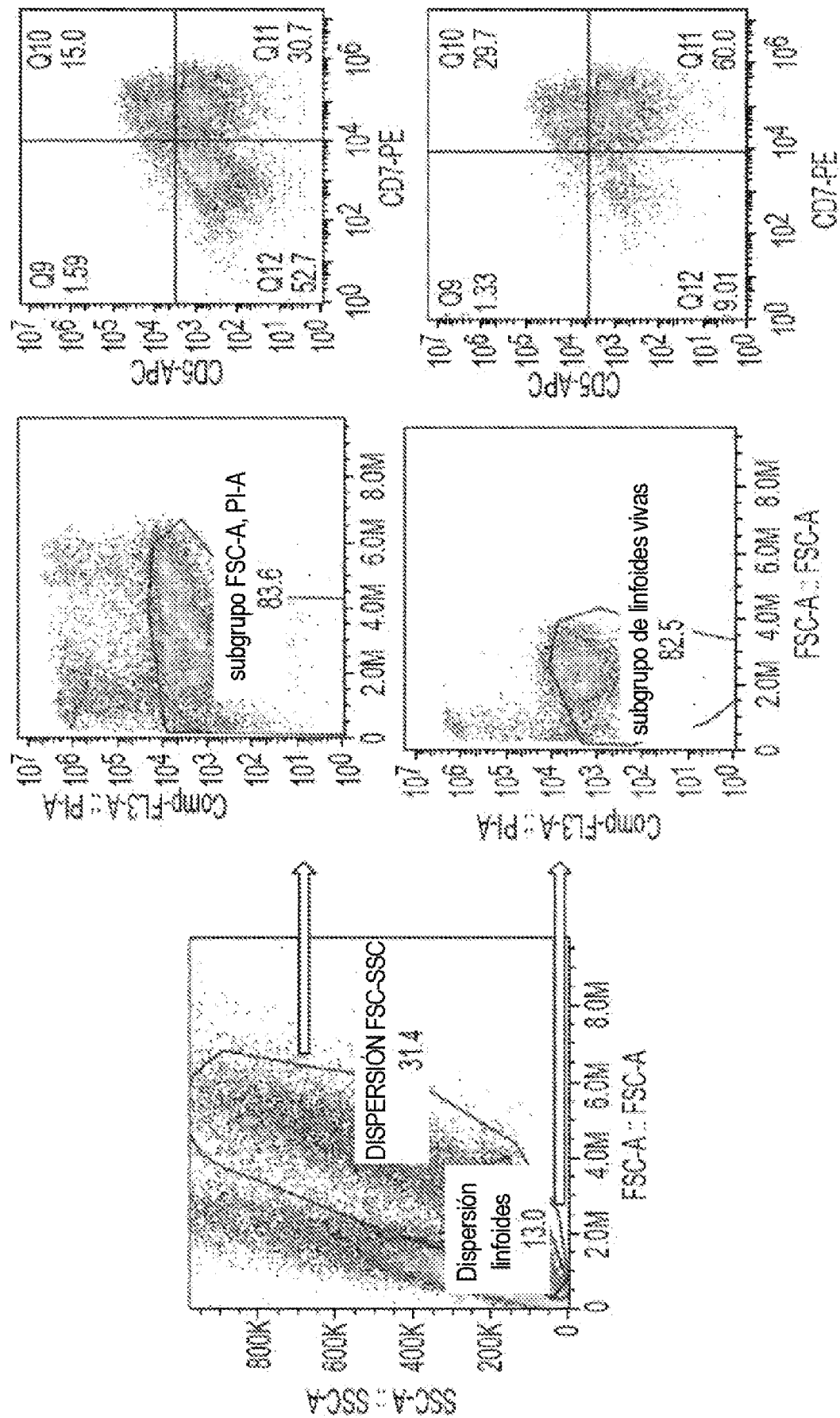


FIG. 20

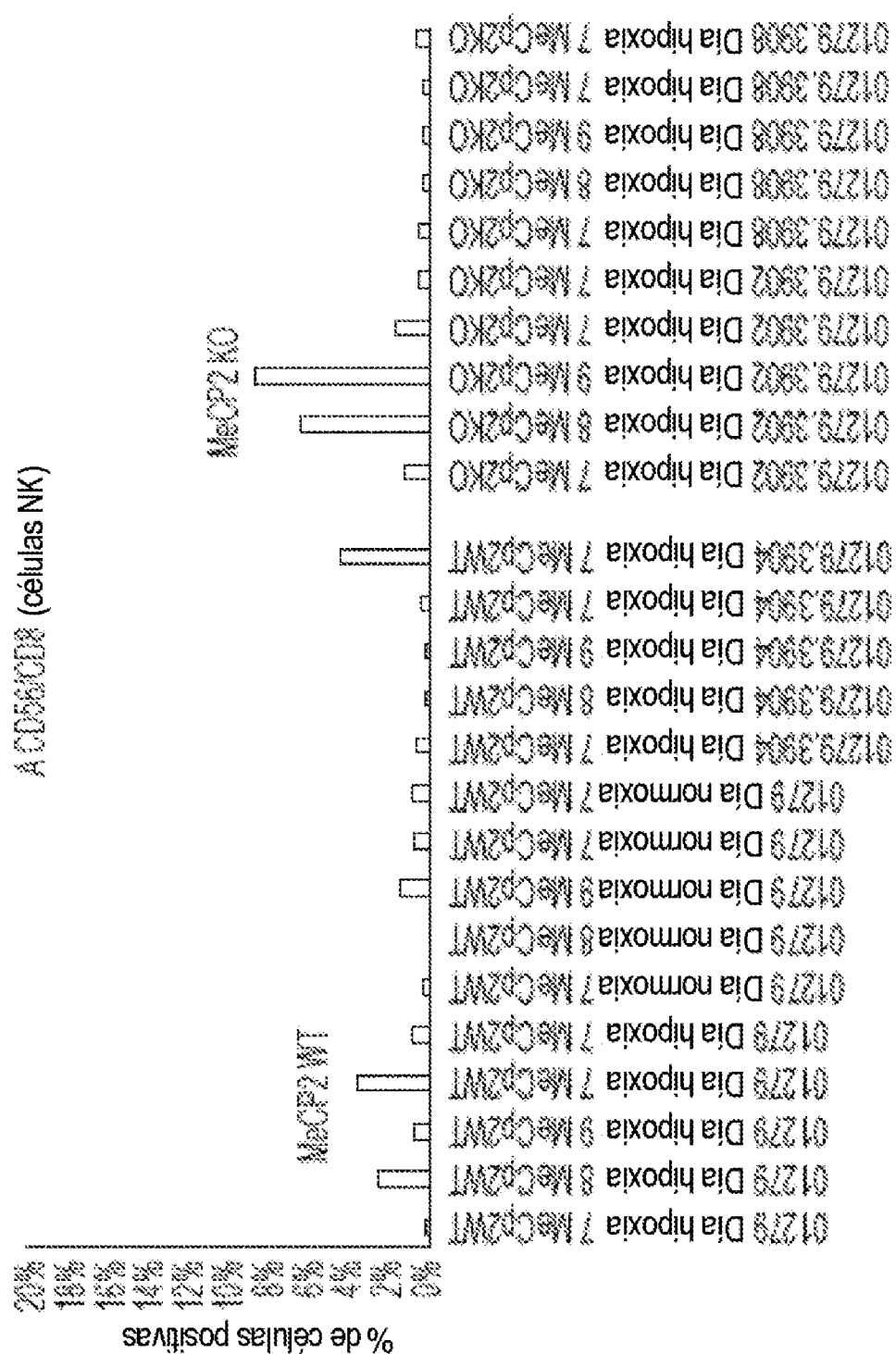


FIG. 21A

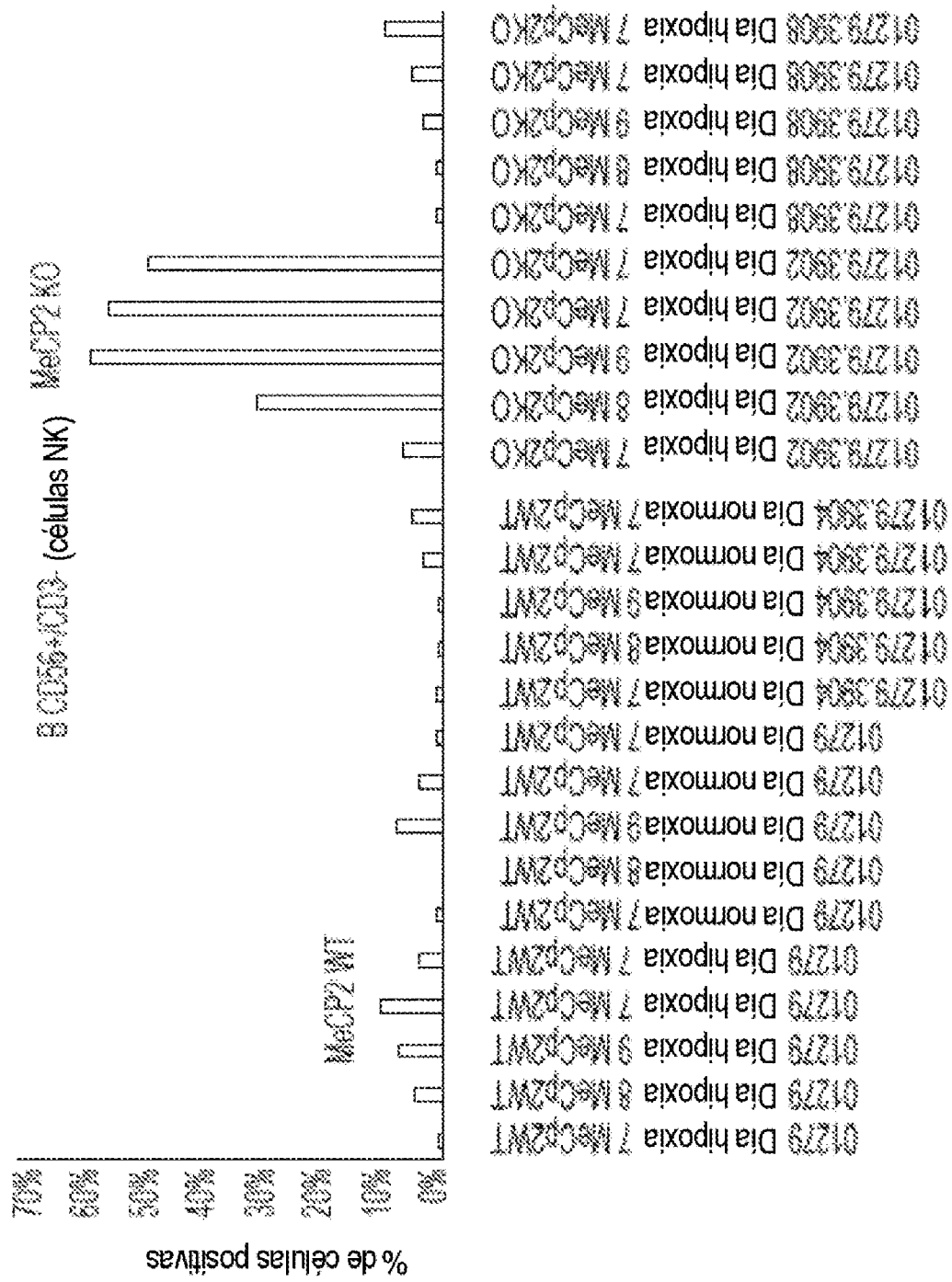


FIG. 21B

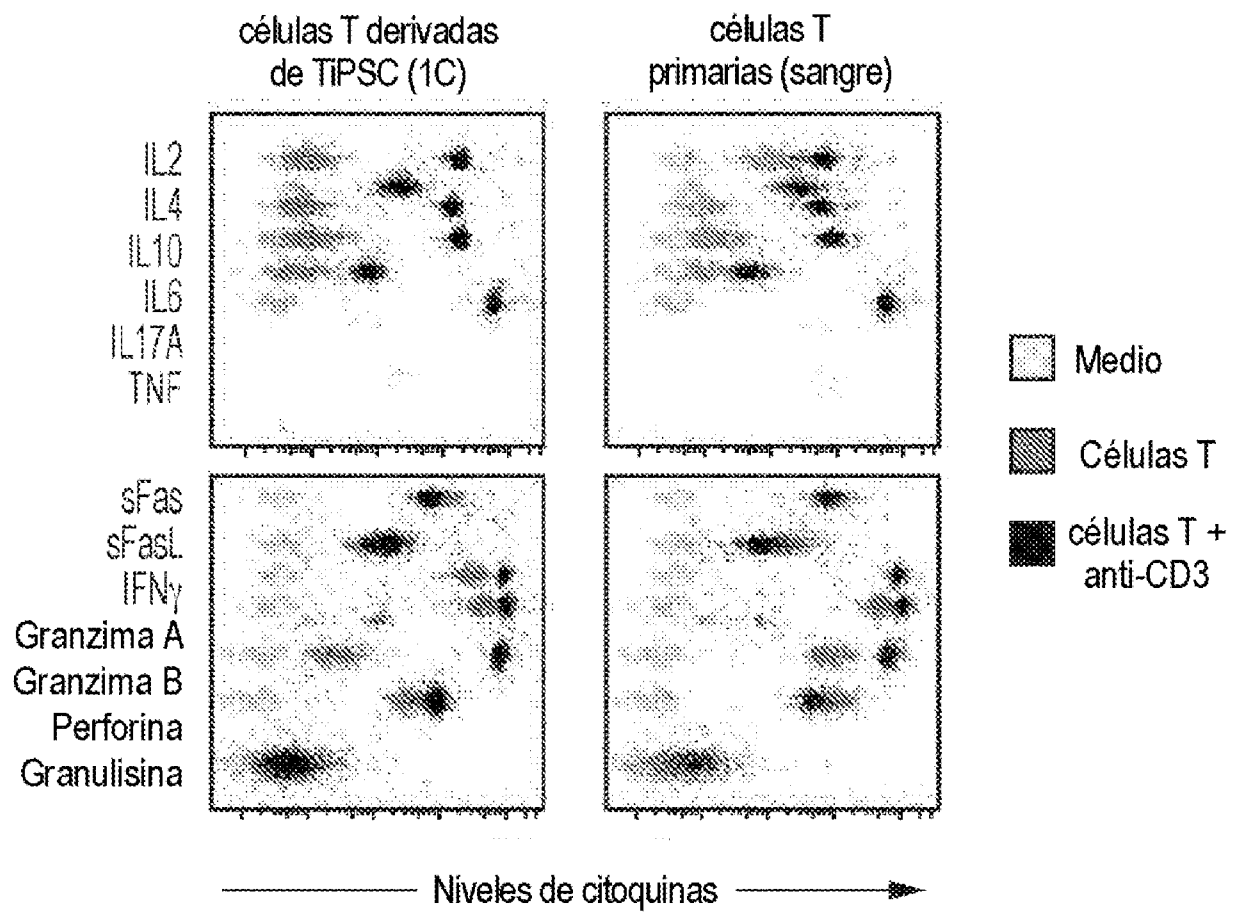
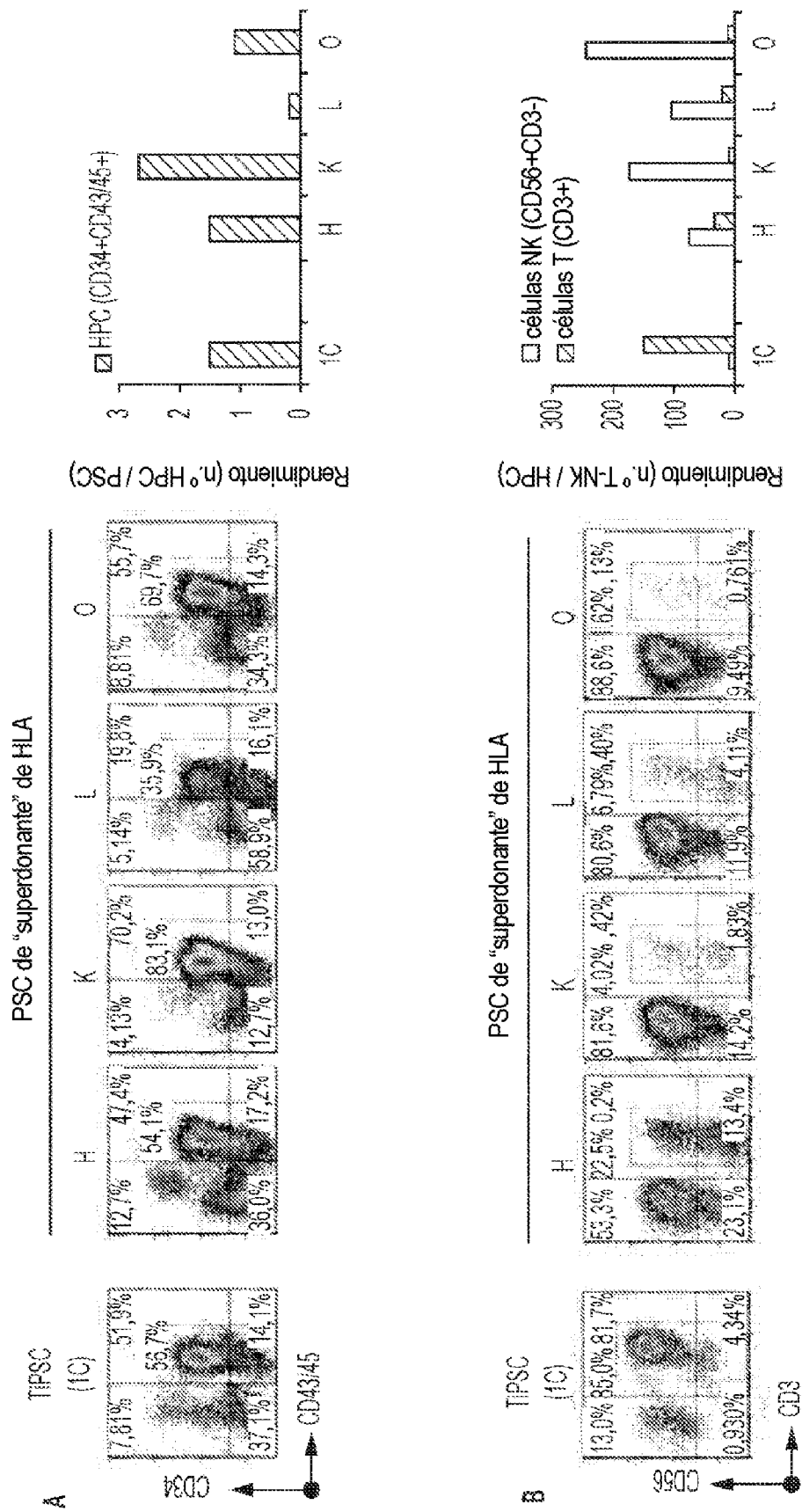


FIG. 22



FIGS. 23A-23B