

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 925**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074	(2010.01) A61P 35/02	(2006.01)
C12N 5/078	(2010.01) C12N 9/22	(2006.01)
C12N 5/0783	(2010.01)	
C12N 15/85	(2006.01)	
C07K 14/725	(2006.01)	
C07K 16/28	(2006.01)	
C12N 15/62	(2006.01)	
C12N 15/63	(2006.01)	
A61K 35/17	(2015.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016 PCT/US2016/060699**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17079673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016 E 16863113 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2023 EP 3371314**

54 Título: **Ingeniería genómica de células pluripotentes**

30 Prioridad:

04.11.2015 US 201562251032 P
16.05.2016 US 201662337258 P
25.07.2016 US 201662366503 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.11.2023

73 Titular/es:

FATE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
Suite 200, 3535 General Atomics Court
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es:

VALAMEHR, BAHRAM;
ABUJAROUR, RAMZEY;
LEE, TOM TONG;
LAN, WEIJIE;
CLARKE, RAEDUN y
BJORDAHL, RYAN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 953 925 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

Ingeniería genómica de células pluripotentes

5 Solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica la prioridad para la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º de serie 62/251.032, presentada el 4 de noviembre de 2015; la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º de serie 62/337.258, presentada el 16 de mayo de 2016; y la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º de serie 62/366.503, presentada el 25 de julio de 2016.

10 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere ampliamente al campo de la edición genética y la ingeniería genómica de células madre. Más particularmente, la presente divulgación se refiere al uso de la modulación genética de células madre pluripotentes clonales con estrategias moleculares que se dirigen a loci específicos y aseguran la retención continua y/o el funcionamiento de material genético editado.

Antecedentes de la invención

Como el campo de la investigación de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) continúa avanzando (véase, por ejemplo, Themeli y col., Nat Biotechnol. oct. de 2013; 31(10):928-933; Themeli y col., Cell Stem Cell. 2 de abr. de 2015;16(4):357-366) y como la investigación clínica de las terapias celulares derivadas de hiPSC genéticamente modificadas comienza a emerger, las preocupaciones de seguridad relacionadas con la administración de células genéticamente alteradas deben abordarse y mitigarse. Para abordar estos problemas de seguridad, se ha explorado una serie de estrategias que incluyen péptidos recombinantes, anticuerpos monoclonales, actividad enzimática modulada por moléculas pequeñas y modificaciones específicas de genes para facilitar la eliminación selectiva de células aberrantes. En general, los estudios previos han empleado vectores víricos, tales como lentivirus, y promotores cortos para introducir de forma estable genes suicidas, que incluyen la timidina quinasa del virus complejo del herpes o la caspasa-9 inducible (iCasp9), en células humanas. Sin embargo, el uso de vectores víricos puede conducir a eventos de integración aleatoria que pueden alterar o activar genes relacionados con la enfermedad, lo que potencialmente provoca efectos perjudiciales. Otros problemas en los métodos usados actualmente incluyen, pero no se limitan a, tasa de inserción baja; inserciones aleatorias; mutaciones; alto número de copias de inserción; y laboriosa clasificación celular para seleccionar contra una población heterogénea de células con inserciones en número de copias variadas debido a inserciones aleatorias. Además, para la modificación por ingeniería genética del genoma de iPSC, muchos promotores artificiales y regiones genómicas son propensos a un silenciamiento de la expresión génica epigenética en los estados tanto pluripotenciales como diferenciados, lo que da como resultado que los promotores o los genes insertados no respondan con eventos tales como expansión celular, pases, reprogramación, diferenciación y/o desdiferenciación. Por lo tanto, es de gran importancia identificar la estrategia óptima de edición del genoma, los sitios de integración, los promotores y otros factores para mantener las respuestas de las modalidades funcionales insertadas sin comprometer la seguridad, especialmente cuando se desarrollan células inmunitarias genéticamente modificadas para uso terapéutico.

Sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos y composiciones para generar líneas clonales de iPSC derivadas de células individuales, o células derivadas de las mismas, que comprenden una o varias modificaciones genéticas en sitios seleccionados, que incluyen inserción, delección y sustitución de polinucleótidos, y que las modificaciones se retienen y permanecen funcionales en células derivadas posteriormente después de la diferenciación, desdiferenciación, reprogramación, expansión, pases y/o trasplante.

Es un objeto de la presente invención generar líneas clonales de iPSC derivadas de células individuales que comprenden una o varias modificaciones genéticas en sitios seleccionados a través de la reprogramación de células no pluripotentes que comprenden las mismas modificaciones genéticas, que incluyen integración dirigida y/o in/dels marcados como diana. Específicamente, es un objeto de la presente invención reprogramar células no pluripotentes antes de la ingeniería genómica de las células reprogramadas, ya que tales iPSC o células menos diferenciadas se obtienen primero para la posterior edición del genoma. También es un objeto de la presente invención reprogramar células no pluripotentes después de la ingeniería genómica de las células no pluripotentes, ya que tales células no pluripotentes de ingeniería genómica se obtienen primero para la posterior reprogramación celular. Es un objeto adicional de la presente invención reprogramar células no pluripotentes simultáneamente con la ingeniería genómica de las células no pluripotentes, ya que tales células intermedias no se aíslan de, o para, la reprogramación o ingeniería genómica, y los dos procesos tienen lugar simultáneamente en el grupo individual de células.

Es un objeto de la presente invención generar células no pluripotentes derivadas de iPSC (o células menos diferenciadas) que incluyen, pero no se limitan a, células CD34, células endoteliales homogénicas, HSC (células madre y progenitoras hematopoyéticas), células progenitoras multipotentes hematopoyéticas, progenitores de

linfocitos T, progenitores de células NK, linfocitos T, células NKT, células NK y linfocitos B que comprenden una o varias modificaciones genéticas en sitios seleccionados a través de iPSC en diferenciación o células menos diferenciadas que comprenden las mismas modificaciones genéticas en los mismos sitios seleccionados. Específicamente, es un objeto de la presente invención diferenciar células menos diferenciadas que incluyen células progenitoras y pluripotentes después de la ingeniería genómica de las células menos diferenciadas, ya que tales células modificadas por ingeniería genómica se obtienen primero para la posterior diferenciación celular. Es un objetivo adicional de la presente invención diferenciar células menos diferenciadas simultáneamente con la ingeniería genómica de las células menos diferenciadas, ya que tales células no intermedias se aíslan de, o para, la diferenciación o ingeniería genómica, y los dos procesos tienen lugar simultáneamente en el grupo individual de células.

La invención se dirige a un método para generar una célula madre pluripotente inducida (iPSC) modificada genómicamente capaz de diferenciarse en una célula de linaje hematopoyético que deriva de iPSC, o una población celular de la misma, comprendiendo el método:

(i) reprogramar un linfocito T a una célula madre pluripotente inducida (iPSC); y

(ii) modificar genómicamente la iPSC para

(a) inactivar un receptor de linfocitos T (TCR) interrumpiendo un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa (TRAC); y

(b) insertar un polinucleótido que codifica al menos un receptor quimérico para el antígeno (CAR) en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa; en donde el polinucleótido que codifica el al menos un CAR se expresa bajo el control de un promotor de TCR endógeno de la región constante de TCR alfa,

obteniendo de esta manera una iPSC modificada genómicamente.

La invención también se dirige a un método para generar una célula madre pluripotente inducida (iPSC) modificada genómicamente capaz de diferenciarse en una célula de linaje hematopoyético que deriva de iPSC, o una población celular de la misma, comprendiendo el método:

(i) modificar genómicamente un linfocito T para

(a) inactivar un receptor de linfocitos T (TCR) interrumpiendo un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa (TRAC); y

(b) insertar un polinucleótido que codifica al menos un receptor quimérico para el antígeno (CAR) en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa; en donde el polinucleótido que codifica el al menos un CAR se expresa bajo el control de un promotor de TCR endógeno de la región constante de TCR alfa,

obteniendo de este modo un linfocito T modificado genómicamente;

(ii) reprogramar el linfocito T modificado genómicamente de la etapa (i) a una célula madre pluripotente inducida (iPSC), en donde la iPSC comprende la misma ingeniería genómica que el linfocito T de la etapa (i).

En algunas realizaciones, el al menos un CAR comprende un CAR relacionado con CD 19. En algunas realizaciones adicionales o alternativas, las células son HLA de clase I y/o de clase II deficientes. En algunas realizaciones adicionales o alternativas, la célula de linaje hematopoyético derivada de iPSC es una célula endotelial hemogénica definitiva, un progenitor de linfocitos T, un linfocito T, un progenitor de células NK, una célula NK o un linfocito B. En algunas realizaciones adicionales o alternativas, la célula de linaje hematopoyético derivada de iPSC es un linfocito T, un progenitor de linfocitos T o una célula clonal de los mismos.

La invención también se dirige a un método para generar una célula de linaje hematopoyético o una población de la misma, que comprende: generar una iPSC modificada genómicamente o una población de la misma según los métodos de la invención reivindicada, y dirigir además la diferenciación de la iPSC modificada genómicamente *in vitro* a una célula de linaje hematopoyético o una población de la misma.

En algunas realizaciones, la célula de linaje hematopoyético derivada de iPSC comprende una célula endotelial hemogénica definitiva, un progenitor de linfocitos T, un linfocito T, un progenitor de células NK, una célula NK o un linfocito B; y en donde la célula de linaje hematopoyético diferenciada de iPSC comprende una longitud de telómero más larga que una célula del mismo tipo que no deriva de una iPSC.

En algunas realizaciones adicionales o alternativas, la célula de linaje hematopoyético derivada de iPSC es un linfocito T, un progenitor de linfocitos T o una célula clonal de los mismos, y el linfocito T o el progenitor de linfocitos T que deriva de iPSC tiene al menos una de las siguientes características:

- (i) no requiere que el HLA coincida en las terapias celulares; y
- (ii) comprende una longitud de telómero más larga que una célula del mismo tipo que no deriva de una iPSC.

La invención también se dirige a una iPSC modificada genómicamente o una iPSC clonal, o una población de las mismas, obtenible mediante los métodos de la invención reivindicada.

La invención también se dirige a una composición farmacéutica que comprende un medio farmacéuticamente aceptable y la célula o la población de la misma de la invención reivindicada.

La invención también se dirige a la composición farmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento de: un trastorno autoinmunitario; una neoplasia hemática; un tumor sólido; cáncer o una infección asociada a VIH, VRS, VEB, CMV, adenovirus o BK poliomavirus, comprendiendo el uso introducir la composición en un sujeto que necesita terapia celular adoptiva.

Otro aspecto de la presente invención proporciona iPSC modificadas genómicamente generadas a partir de uno cualquiera de los métodos de la invención reivindicada. En una realización, las iPSC modificadas genómicamente generadas comprenden uno o más polinucleótidos exógenos introducidos usando una construcción y el polinucleótido exógeno está integrado en uno o más sitios seleccionados en las iPSC, que en el caso de la invención reivindicada incluye una región constante de TCR alfa. En algunas realizaciones, las iPSC modificadas genómicamente son HLA de clase I y/o de clase II deficientes. En alguna realización, las iPSC modificadas genómicamente comprenden B2M nulo o bajo, TAP1 nulo o bajo y/o TAP2 nulo o bajo.

En una realización, las iPSC modificadas genómicamente por ingeniería genómica generadas son capaces de diferenciarse en células de linaje hematopoyético, incluyendo células mesodérmicas, células CD34, células endoteliales hemogénicas, células madre y progenitoras hematopoyéticas, células progenitoras multipotentes hematopoyéticas, progenitores de linfocitos T, progenitores de células NK; linfocitos T, células NKT, células NK o linfocitos B.

Otro aspecto de la invención proporciona iPSC modificadas genómicamente que comprenden un receptor quimérico para el antígeno (CAR) insertado en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa. En algunas realizaciones, el CAR es inducible.

Se proporciona adicionalmente en la presente invención una composición farmacéutica que comprende (i) una o más poblaciones de iPSC modificadas genómicamente o iPSC de HLA deficiente modificadas, como se proporciona por los métodos y la composición de la invención reivindicada y (ii) un medio farmacéuticamente aceptable.

Se proporciona además el uso terapéutico de la composición farmacéutica anterior mediante la introducción de la composición a un sujeto adecuado para la terapia celular adoptiva, en donde el sujeto tiene un trastorno autoinmunitario; una neoplasia hemática; un tumor sólido; cáncer o una infección asociada a VIH, VRS, VEB, CMV, adenovirus o BK poliomavirus.

Diversos objetos y ventajas de este uso resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos en donde se exponen, a modo de ilustración y ejemplo, determinadas realizaciones de esta invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación gráfica de la inserción marcada como diana a un puerto seguro AAVS1 de un gen suicida iCasp9 impulsado por el promotor de CMV y la respuesta celular cuando el gen suicida se activó por AP1903. **A.** Una ilustración de una construcción donadora, AAVS1-G1,0, diseñada para dirigirse al locus AAVS1. **B.** Citometría de flujo para la expresión de GFP en células 293T seleccionadas con puromicinatransfectadas con ZFN específicas para el locus AAVS1 y la construcción donadora. **C.** Las células 293T seleccionadas con Puro se sometieron a tratamiento con AP1903 (o control DMSO) durante 24 h. Las células tratadas se recogieron y se tiñeron con 7AAD (tiñe células moribundas con la membrana comprometida) y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células negativas para 7AAD (presumiblemente células vivas) se representó gráficamente para cada tratamiento (n=2). Se detectó la muerte celular significativa después del tratamiento con AP1903. **D.** La PCR de unión del ADN genómico de células 293T que se seleccionaron con puro mostró la inserción dirigida de vectores donadores en el locus AAVS 1. **E.** Las hiPSC se transfectaron con ZFN específicas para el locus AAVS 1 y una construcción donadora que abarca iCasp9 impulsada por CMV (AAVS1-G1,0). Las células resistentes a puro se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión de GFP. Tres poblaciones basadas en la intensidad de GFP se clasificaron y se expandieron para un análisis adicional. **F.** Las poblaciones GFP (neg), GFP (bajo) y GFP (alto) clasificadas y expandidas se sometieron a tratamiento con AP1903 (o control de DMSO) durante 24 h. Las células tratadas se recogieron y se tiñeron con 7AAD y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células negativas para 7AAD (células vivas) se representó gráficamente para cada tratamiento. **G.** La PCR de unión del

ADN genómico de las hiPSC seleccionadas y clasificadas mostró la inserción dirigida de vectores donadores en el locus AAVS1 en GFP (bajo) pero no en poblaciones GFP (neg) o GFP (alto).

La Figura 2 es una representación gráfica de la inserción dirigida de loci de puertos seguros de iCasp9 bajo diversos promotores endógenos y exógenos en hiPSC. **A.** Ilustración de la construcción diseñada para dirigirse al locus AAVS1 con el promotor AAVS1 que dirige la expresión génica. **B.** Las hiPSC se transfectaron con ZFN específicas para el locus AAVS 1 y una construcción donadora que abarca iCasp9 bajo el control de promotores endógenos AAVS 1; las células resistentes a puro se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión de GFP. **C.** Las iPSC resistentes a Puro expandidas se sometieron a tratamiento con AP1903 (o control DMSO) durante 24 h. Las células tratadas se recogieron y se tiñeron con 7AAD. El porcentaje de células negativas para 7AAD se representó gráficamente para cada tratamiento. **D.** La PCR de unión del ADN genómico del grupo resistente a puro mostró la inserción dirigida de vectores donadores en el locus AAVS1 en estas poblaciones. **E.** Ilustración de la construcción diseñada para dirigirse al locus AAVs1 con diversos promotores. **F.** Las hiPSC se transfectaron con ZFN específicas para el locus AAVS 1 y una construcción donadora que abarca iCasp9 bajo el control de diversos promotores endógenos y exógenos y las células resistentes a puro se analizaron por citometría de flujo para la expresión de GFP.

La Figura 3 es una representación gráfica de la inserción dirigida de iCasp9 impulsada por el promotor EF1 α en el puerto seguro AAVS 1 en iPSC. **A.** Las hiPSC transfectadas con ZFN específicas para el locus AAVS1 y una construcción donadora que abarca la iCasp9 impulsada por EF1 α (véase la Figura 2) se seleccionaron con puromicina seguido de tratamiento por AP1903. El área seleccionada destaca las células positivas para GFP en respuesta a la inducción de muerte celular AP1903. **B.** Las hiPSC positivas para TRA181 y GFP se clasificaron de forma global o individualmente en placas de 96 pocillos. **C.** Las hiPSC positivas para GFP clasificadas de forma global se mantuvieron en medio libre de puromicina en el tiempo para determinar el perfil de población a lo largo del tiempo. **D.** Imagen presentada clara de una hiPSC clonal derivada de linfocitos TRA181 y GFP clasificadas por células individuales. **E.** Las hiPSC clonales se expandieron y la expresión de GFP se perdió en diversos grados después de la expansión.

La Figura 4 es una representación gráfica de la inserción dirigida de iCasp9 impulsada por el promotor CAG en el puerto seguro AAVS 1 en hiPSC. **A.** Las hiPSC se transfectaron con ZFN específicas para el locus AAVS1 y una construcción donadora que abarca iCasp9 impulsada por CAG (véase la Figura 2). Las células resistentes a puro se clasificaron de forma global o individualmente en placas de 96 pocillos. **B.** Las iPSC clasificadas de forma global GFP+ se mantuvieron en medio sin puromicina durante 21 días antes de analizarse mediante citometría de flujo para la expresión de GFP. **C.** Cuando se tratan con AP1903, las células positivas para GFP se convierten positivas a tinción con 7AAD. **D.** Imagen presentada clara de una colonia típica después de la clasificación individual. **E.** Las colonias originadas a partir de una célula individual se expandieron y la evaluación de citometría de flujo mostró una alta expresión de GFP y TRA181. **F.** Intensidad de fluorescencia media de clones seleccionados. **G.** PCR de unión del ADN genómico para detectar la recombinación homóloga de la construcción donadora y el locus AAVS 1 tanto en células hiPSC parentales como en grupos de población CAG hiPSC.

La Figura 5 es una representación gráfica de la caracterización de pluripotencia de los clones CAG-hiPSC. **A.** Imagen representativa del clon CAG C38 mantenido en cultivo sin alimentador. **B.** Tinción de inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia NANOG y OCT4. **C.** RT-PCR cuantitativa para la expresión de diversos marcadores endógenos de pluripotencia. **D.** Los clones CAG seleccionados se dirigieron a la diferenciación específica de linaje y se evaluaron para marcadores de linaje. Nestina, ectodermo; α SMA, mesodermo, SOX17, endodermo. **E.** CAG-C38 se evaluó por su potencial para dar lugar a un teratoma que consiste en diversos linajes. El teratoma se recolectó 6 semanas después de la inyección.

La Figura 6 es una representación gráfica de la destrucción inducida por el gen suicida de los clones hiPSC en estados tanto pluripotentes como diferenciados con iCasp9 impulsada por CAG marcada como diana en el locus AAVS 1. **A.** Se trataron veinte clones de hiPSC CAG-iCasp9 marcados como diana con AP1903 (o control de DMSO) durante 24 horas y después se analizaron para determinar la tinción de GFP y 7AAD mediante citometría de flujo. Los gráficos de citometría de flujo de los clones CAG-C5 y -C38 también se mostraron en esta figura. **B.** Uno de los quince clones de iPSC CAG-iCasp9 marcados como diana sobrevivieron después del tratamiento con AP1903 (10 nM). **C.** Cinética de cobertura de células vivas CAG-C5 en una placa de 10 cm después del tratamiento con AP1903 (10 nM). **D.** Se indujeron clones de hiPSC CAG-iCasp9 marcados como diana para diferenciarse en células de endodermo, mesodermo o ectodermo y cada una se trató con AP1903, antes de recuperarse y diferenciarse. Los pocillos replicados antes del tratamiento y después de la recuperación se tiñeron con cristal violeta y se obtuvieron imágenes. Las imágenes del clon CAG-C5 se mostraron como una representación. **E.** Se indujo que los clones de hiPSC CAG-iCasp9 marcados como diana se diferenciaron en células CD34+, que se trataron con AP1903 durante 48 horas y se analizaron por citometría de flujo para la muerte celular.

La Figura 7 es una representación gráfica de la regresión inducida por AP1903 *in vivo* de teratomas derivados de clones iCasp9-iPSC. **A.** Ilustración del posicionamiento de inyección subcutánea en los estudios de ratones NSG. **B.** Imagen de teratomas recolectados en el día 34 después de que la línea hiPSC parental y el clon CAG-C38 se trataran con AP1903 (i.p. 200 μ g total) en los días 7-11. **C.** Se midió el volumen de teratomas recolectados. **D.** Los

teratomas recolectados derivados de líneas parentales hiPSC o CAG-C38 teñidos con hematoxilina y eosina. Si bien la línea hiPSC parental muestra la mayoría de los tipos celulares diferenciados de trilineaje, CAG-C38 parece consistir en células similares a grasas altamente organizadas. **E.** La línea de hiPSC parental y los clones de CAG se inyectaron en 4E6 células y se trataron con AP1903 (i.p. 200 µg total) en los días 40-46. Todos los tumores se midieron rutinariamente para su volumen.

La Figura 8 es una representación gráfica de la caracterización de clones escapados. **A.** Ilustración del método para seleccionar clones que sobreviven al tratamiento con AP 1903. **B.** Amplificación por PCR del transgén iCasp9, seguido de purificación y secuenciación genómica para determinar si hay alguna alteración de secuencia. **C.** La evaluación de citometría de flujo del clon escapado mostró una alta expresión de GFP y TRA181. **D.** Identificación de una única mutación puntual K189E en todos los clones secuenciados. **E.** Para identificar si K189E es la razón directa de los clones refractarios, se creó y se probó la forma mutante de iCasp9. **F.** El transgén mutante iCasp9 se confirmó como la razón para sobrevivir al tratamiento con AP1903.

La Figura 9 es una representación gráfica de la edición genómica del locus ROSA26 humano usando CRISPR/Cas9 para la inserción dirigida o independiente de nucleasas de iCasp9. **A.** Ilustración de diseño de construcción para dirigirse al locus ROSA26 con CRISPR/Cas9. **B.** Las hiPSC se transfectaron con plásmido ARNg/Cas9-RFP específico para el locus ROSA26 y una construcción donadora que abarca la iCasp9 impulsada por CAG como se muestra en **A.** Dos días después de la transfección, la población celular se analizó por citometría de flujo para determinar la expresión de GFP para determinar la eficiencia de transfección (~89 %). Las células resistentes a Puro se analizaron por citometría de flujo para la expresión de GFP 20 días después de la transfección. **C.** AP1903 indujo el análisis de muerte celular en células 293 T transfectadas con construcción. **D.** Inserción dirigida de construcción en células 293 T. **E.** hiPSC transfectadas con la construcción y la puromicina seleccionadas para enriquecer las células diana.

La Figura 10 es una representación gráfica de la generación de clones de iPSC con integración dirigida a iCasp9 mono-alélica y bi-alélica. **A.** Evaluación basada en PCR cuantitativa del número de copias del transgén (iCasp9-GFP) en los clones iCasp9 impulsados por el promotor CAG indicados. **B.** La intensidad de fluorescencia media (MFI) de iCasp9-GFP en cultivo agrupado (negro) o en clones con inserciones diana de iCasp9 monoalélica (gris claro) o bialélica (gris oscuro) según lo determinado por citometría de flujo. **C.** Análisis por PCR de integración transgénica mediante el uso de cebadores que se superponen a la unión del transgén AAVS1 en células y clones agrupados dirigidos. **D.** Evaluación del número de integraciones dirigidas en alelos AAVS 1 usando un método basado en PCR y cebadores específicos para el sitio de integración AAVS1. **E.** Evaluación de la cobertura de la superficie de la placa mediante células de la agrupación dirigida no clasificadas, células de la agrupación marcadas como diana clasificadas para las líneas celulares iCasp9-GFP y CAG-C38 y CAG-C5 clonales inmediatamente después de la adición de AP1903 10 nM usando obtención de imágenes de células vivas.

La Figura 11 es una representación gráfica que muestra que el promotor CAG exógeno permitió la eliminación mediada por iCasp9 de teratomas establecidos derivados de iPSC. **A.** Descripción esquemática del diseño del estudio. **B.** Obtención de imágenes por bioluminiscencia de 3 grupos de ratones NSG (n=2) antes (paneles superiores) y 3 días después del final de la administración AP1903 (125 µg i.p. desde el día 19-25, paneles inferiores). **C.** Flujo Total (fotones/s) para teratomas a partir de tipos de células indicados que se muestran como promedio y SD. **D.** Relación de flujo total después del tratamiento a la anterior (promedio $\pm$ SD) para los tipos de células indicados. **E.** Los resultados para los ratones inyectados con células agrupadas de CAG-C38 y CAG clonales. **F.** Mediciones de volumen terminal de teratomas derivados de tipos de células indicados (día 28). **G.** Formación de imágenes de teratomas el día 28. No se detectaron teratomas a partir de los lados inyectados con el clon CAG-C38 o células agrupadas CAG-iCasp9. *valor de $p < 0,05$ medido por prueba T no apareada. ns; no significativo.

La Figura 12 es una representación gráfica que muestra que la destrucción inducible más eficaz de clon iCasp9 bialélico trasplantado que el del clon de iCasp9 monoalélico. **A.** Descripción esquemática del diseño del estudio. **B.** Obtención de imágenes por bioluminiscencia de ratones NSG trasplantados con tipos de células indicados (clon CAG-C5 bialélico, clon CAG-C38 monoalélico e iPSC parentales) el día 7, 14 y 42 después del trasplante de iPSC. La obtención de imágenes en el día 7 se realizó inmediatamente antes de la administración AP1903 (125 µg i.p.; día 7-13). **C.** Los paneles inferiores muestran imágenes de teratomas recolectados, si se encuentran, el día 42. **D.** Flujo Total (fotones/s) para teratomas a partir de grupos indicados que se muestran como promedio y SD. * valor de $p < 0,05$; ** valor de $p < 0,01$; ***** valor de $p < 0,001$ medido por prueba T no apareada. ns; no significativo.

La Figura 13 es una representación gráfica que muestra la generación de un sistema de guardia segura con genes suicidas dobles dirigidos a loci de puertos seguros separados. **A.** Análisis por PCR de la integración genómica específica de sr39TK en el locus de puerto seguro H11 mediante el uso de cebadores específicos para sr39TK, la unión de sr39TK-blasticidina (Bsd) o la unión de secuencia de H11 endógena-transgén. GAPDH se usa como un control de carga. **B.** Clon de iPSC CAG-C38 iCasp9 con inserción dirigida de sr39TK en el locus H11 (i) creciendo sin tratamiento GCV o AP1903; (ii) tratado con AP1903 solo durante 2 días; (iii) tratado con GCV solo durante 9 días; y (iv) tratamiento simultáneo con AP1903 y GCV durante 2 días, después AP1903 se retiró mediante lavado, continuando el tratamiento con GCF durante 7 días más.

La Figura 14 es una representación gráfica de la generación de iPSC B2M^{-/-} deficientes en HLA I. **A.** Análisis por citometría de flujo de GFP y B2M y la expresión de HLA-I antes (panel izquierdo) y después de la transfección (panel central). Las células negativas para B2M y HLA-I se clasificaron de forma global (panel derecho). **B.** Análisis por citometría de flujo de células B2M y HLA-I negativas clasificadas clonalmente en placas de 96 pocillos.

La Figura 15 es una representación gráfica de la persistencia mejorada de las iPSC B2M^{-/-}, deficientes en HLA I. **A.** hiPSC B2M^{-/-} no destruidas por linfocitos T cebados. **B.** hiPSC B2M^{-/-} no reconocidas en cocultivo por células NK en un pocillo individual. **C.** hiPSC B2M^{-/-} no reconocidas en cocultivo por células NK en pocillos separados. **D.** hiPSC B2M^{-/-} han ganado persistencia en ratones inmunocompetentes.

La Figura 16 muestra que la modulación de las iPSC de iones de clase HLA aumenta la persistencia de iPSC en receptores inmunocompetentes. **A.** Las iPSC modificadas por HLA genéticamente modificadas expresan HLA-E en la superficie celular y mantienen un fenotipo pluripotente. **B.** Obtención de imágenes *in vivo* de luciferina de teratomas a 72 horas después de la inyección con la iPSC B2M^{-/-}-HLAE que muestra una persistencia aumentada en comparación con iPSC de tipo silvestre.

La Figura 17 muestra que las iPSC genéticamente modificadas para expresar el receptor CD16 no escindible de alta afinidad y la molécula coestimuladora 41BBL conservan la expresión en toda la diferenciación a las células iCD34. **A.** Células indiferenciadas el día 0 **B.** Células diferenciadas el día 10.

La Figura 18 muestra la reprogramación de una célula CAR-T a las iPSC (TiPSC) que retienen la misma impronta genética del linfocito T fuente mediante el análisis por PCR de la integración de CAR (FTV106) en iPSC derivadas de linfocitos T genéticamente modificados con FTV106.

La Figura 19 muestra que las iPSC genéticamente modificadas para expresar el receptor quimérico para el antígeno (CAR) CD19 y el marcador de superficie celular LNGFR truncado como un co-identificador para el CAR retienen la expresión a través de la diferenciación a células iCD34. **A.** Células indiferenciadas el día 0 **B.** Células diferenciadas el día 10.

La Figura 20 muestra la expresión específica de tipo celular de CAR impulsada por el promotor de TCR endógeno y la expresión y la inactivación de la función del TCR debido a la inserción específica de locus de CAR.

La Figura 21 muestra que la hiPSC modificada por ingeniería genética para expresar proteínas inmunosupresoras puede generar células CD34: **A.** La expresión de HLAE, HLAG y PDL1 en la superficie celular de las iPSC deficientes para HLA I modificadas; **B.** Todas las iPSC deficientes en HLA modificadas se diferencian a la CD34⁺ HE después de 10 días de cultivo de diferenciación.

La Figura 22 muestra que la hiPSC modificada por ingeniería genética para expresar proteínas inmunosupresoras puede generar células de linaje hematopoyético.

La Figura 23 muestra que la expresión de proteínas inmunosupresoras de HLA no clásicas modificadas por ingeniería genética se regula negativamente durante la diferenciación hematopoyética de hiPSC: **A.** Las proteínas HLA-E y HLA-G están ausentes mientras que la expresión de PDL1 se mantiene; **B.** Proteínas HLA-E y HLA-G en las fracciones sobrenadantes que indican el desprendimiento de proteínas.

La Figura 24 muestra el diseño y la expresión de proteínas de fusión de HLAG no escindibles en hiPSC. **A.** El diseño de formas resistentes a la escisión de proteínas de fusión HLA-EB2M y HLA-G/B2M; **B.** La proteína HLA-G/HLA-A3 no escindible se expresa en la superficie celular sin afectar a la calidad de la iPSC.

La Figura 25 muestra la generación de TAP2^{-/-} iPSC que exhibe una expresión disminuida de HLA de clase I: **A.** Análisis de citometría de flujo de 2 clones seleccionados que presentan una disminución significativa en la expresión de HLA de clase I en comparación con FTi121; **B.** Después del tratamiento con IFN γ , los clones de TAP2^{-/-} presentan una expresión disminuida de HLA de clase I en comparación con FTi121 de tipo silvestre.

La Figura 26 muestra que las células NK hospedadoras contribuyen al rechazo de teratomas hiPSC en receptores inmunocompetentes: **A.** La ausencia de los linfocitos T CD4⁺, los linfocitos T CD8⁺ y las células NK 3 días después de la inyección de anticuerpos; **B.** Los ratones agotados en NK a las 120 horas después de la inyección de iPSC exhibieron la resistencia más alta al rechazo tumoral en comparación con los animales tratados con IgG control.

La Figura 27 muestra que las iPSC deficientes en HLA-I modificadas tienen una persistencia aumentada y resistencia *in vitro*. La expresión de proteínas inmunosupresoras sobre células derivadas de hiPSC impide el reconocimiento y la proliferación de: **A.** Linfocitos T humanos alogénicos purificados; **B.** Linfocitos T humanos alogénicos de PBMC; **C.** Células NK humanas alogénicas de PBMC.

La Figura 28 muestra que la expresión de la proteína hnCD16 no afecta al potencial de diferenciación hematopoyética de las iPSC modificadas por ingeniería genética. **A.** Células iNK modificadas por ingeniería genética con expresión en superficie de hnCD16; **B.** hnCD16 se expresa constitutivamente y se mantiene continuamente en iNK derivadas de las iPSC genéticamente modificadas.

La Figura 29 muestra la funcionalidad mejorada de las células iNK que expresan hnCD16: **A.** Producción mejorada de citocinas inducida por estimulación de CD16 en células iNK que expresan hnCD16; **B.** hnCD16 mejora la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de células iNK que expresan hnCD16.

La Figura 30 muestra la calidad de las células iNK derivadas de iPSC por medio de la expansión de células iNK.

La Figura 31 muestra que las células iNK tienen telómeros más largos en relación con las células NK adultas

La Figura 32 muestra la expresión de CAR-2A-LNGFR inducible por Tet en una línea de iPSC que se modificó genéticamente con CAR inducible por doxiciclina: **A.** Expresión inducible de CD19CAR en TetCARiPSC; **B.** La citotoxicidad mediada por iNK se evaluó mediante citometría de flujo para la expresión de Caspasa-3 en las células diana, y la citotoxicidad iNK se mejora mediante expresión inducible de CD19CAR.

La Figura 33 ilustra la expresión inducible por Cre o Doxiciclina en iPSC: **A.** Los codones de parada se eliminan y la expresión de CAR se activa tras **A.** Una inducción de la recombinasa Cre en el tiempo; **B.** Inducción de doxiciclina.

La Figura 34 ilustra la inserción del gen de interés en un locus génico elegido para la interrupción y la selección clonal de hiPSC después de la edición genética: **A.** Un diseño de construcción para el vector diana y el vector donador para insertar genes de interés en el locus B2M; **B.** La selección de hiPSC después de la edición genética para una población clonal que contiene genes de elección en el locus elegido para la inserción.

La Figura 35 muestra la conversión de iProT, la crioconservación y la expresión de CD34 y CD7 mediante citometría de flujo en células proT: **A.** Antes del aislamiento de células proT; **B.** 3 días después de la descongelación; **C.** Día 10+13 crioconservadas; **D.** Que no se crioconservaron; **E.** Las células proT son viables después de descongelar y demuestran una mayor proliferación celular cuando se cultivan en medio de diferenciación de linfocitos T.

La Figura 36 muestra la caracterización funcional de células ProT derivadas de iPSC y CB: liberación de citocinas y quimiotaxis: **A.** Las células ProT derivadas de iPSC pueden migrar con éxito hacia CCL21 y SDF; **B.** Las células proT derivadas de iPSC pueden responder para producir y secretar citocinas IFN γ y TNF α .

La Figura 37 muestra que las células ProT derivadas de iPSC tienen un porcentaje disminuido de línea germinal que permanece del locus del TCR gamma, iniciando la recombinación VDJ del locus de TCR.

Descripción detallada de la invención

La modificación genómica de células madre, tales como iPSC (células madre pluripotentes inducidas) incluye inserción, delección y sustitución de polinucleótidos. La expresión génica exógena en iPSC modificadas genómicamente a menudo presenta problemas tales como el silenciamiento génico o la expresión génica reducida después de una expansión clonal prolongada de las iPSC modificadas genómicamente originales, después de la diferenciación celular, y en tipos de células desdiferenciadas de las células derivadas de las iPSC modificadas genómicamente. La presente invención proporciona un enfoque eficiente, confiable y dirigido para integrar de manera estable uno o más genes exógenos, que incluyen genes suicidas y otras modalidades funcionales a iPSC, y mantener las respuestas funcionales del gen en las células expandidas iPSC y diferenciadas derivadas de la iPSC modificada genómicamente, en donde al menos un CAR se inactiva en una región constante del TCR alfa bajo el control de un promotor de TCR endógeno de la región constante TCR alfa. En una realización, la iPSC es una iPSC clonal derivada de células individuales. En una realización, la presente invención proporciona un sistema "suicida" inducible genéticamente codificado adecuado para la integración dirigida en uno o más sitios seleccionados, que responde al inductor químico no tóxico específico en iPSC, iPSC expandidas y células diferenciadas derivadas de las mismas. Por lo tanto, la invención representa un enfoque eficiente, fiable y dirigido para eliminar las células administradas sin dañar las células y los tejidos circundantes, adecuado para diversas terapias celulares. Además, la presente invención también proporciona un método y un sistema para obtener una iPSC clonal integrada con múltiples modalidades genéticas relacionadas con la reprogramación y la desdiferenciación, la diferenciación de iPSC, las proteínas que promueven el injerto, el tráfico, la localización, la migración, la citotoxicidad, la viabilidad, el mantenimiento, la expansión, la longevidad, la autorrenovación, la persistencia y/o la supervivencia de las iPSC o las células derivadas de las mismas, que incluyen, pero no se limitan a, HSC (célula madre y progenitora hematopoyética), células progenitoras de linfocitos T, células progenitoras de células NK, linfocitos T, células NKT, células NK.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación. Los artículos “un”, “una” y “el/la” se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

El uso de la alternativa (por ejemplo, “o”) debe entenderse que significa una, ambas o cualquier combinación de las mismas de las alternativas.

El término “y/o” debe entenderse que significa una o ambas de las alternativas.

Como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” o “de forma aproximada” se refiere a una cantidad, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, una cantidad, un peso o una longitud que varía como mucho hasta el 15 %, el 10 %, el 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 % o el 1 % en comparación con una cantidad de referencia, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, una cantidad, un peso o una longitud. En una realización, el término “aproximadamente” o “de forma aproximada” se refiere a un intervalo de una cantidad, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, una cantidad, un peso o una longitud $\pm 15 \%$, $\pm 10 \%$, $\pm 9 \%$, $\pm 8 \%$, $\pm 7 \%$, $\pm 6 \%$, $\pm 5 \%$, $\pm 4 \%$, $\pm 3 \%$, $\pm 2 \%$, o $\pm 1 \%$ aproximadamente de una cantidad de referencia, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, una cantidad, un peso o una longitud.

Como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente” o “esencialmente” se refiere a una cantidad, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, una cantidad, un peso o una longitud que es aproximadamente el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % o más alto en comparación con una cantidad de referencia, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, una cantidad, un peso o una longitud. En una realización, las expresiones “esencialmente el mismo” o “sustancialmente el mismo” se refieren a un intervalo de cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que es aproximadamente el mismo que una cantidad de referencia, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, una cantidad, un peso o una longitud.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “sustancialmente libre de” y “esencialmente libre de” se usan indistintamente, y cuando se usan para describir una composición, tal como una población celular o medios de cultivo, se refieren a una composición que está libre de una sustancia específica o su fuente de la misma, tal como, 95 % libre, 96 % libre, 97 % libre, 98 % libre, 99 % libre de la sustancia especificada o su fuente, o es indetectable como se mide por medios convencionales. La expresión “libre de” o “esencialmente libre de” un determinado ingrediente o sustancia en una composición también significa que dicho ingrediente o sustancia no está (1) incluido en la composición a cualquier concentración, o (2) incluido en la composición funcionalmente inerte, pero a una concentración baja. Puede aplicarse un significado similar a la expresión “ausencia de”, donde se refiere a la ausencia de una sustancia particular o su fuente de la misma de una composición.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que las palabras “comprender”, “comprende” y “que comprende” implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos establecidos, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. En realizaciones particulares, los términos “incluye”, “tiene”, “contiene” y “comprende” se usan como sinónimos.

Por “que consiste en” se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue a la expresión “que consiste en”. Por lo tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.

Por “que consiste esencialmente en” se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la expresión y se limita a otros elementos que no interfieren o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por lo tanto, la expresión “que consiste esencialmente en” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que ningún otro elemento es opcional y puede o no estar presente dependiendo de si afectan o no la actividad o acción de los elementos enumerados.

La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a “una realización”, “una realización particular”, “una realización relacionada”, “una determinada realización” o “una realización adicional” o combinaciones de las mismas significa que una característica, estructura o característica particular descrita en relación con la realización se incluye en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las expresiones anteriores en diversos lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, las características, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

La expresión “ex vivo” se refiere generalmente a actividades que tienen lugar fuera de un organismo, tal como experimentación o mediciones realizadas en o sobre tejido vivo en un entorno artificial fuera del organismo, preferiblemente con una alteración mínima de las condiciones naturales. En realizaciones particulares, los

procedimientos “*ex vivo*” implican células vivas o tejidos tomados de un organismo y cultivados en un aparato de laboratorio, habitualmente en condiciones estériles, y normalmente durante unas pocas horas o hasta aproximadamente 24 horas, pero que incluyen hasta 48 o 72 horas o más, dependiendo de las circunstancias. En determinadas realizaciones, dichos tejidos o células pueden recolectarse y congelarse, y después descongelarse para el tratamiento *ex vivo*. Los experimentos o procedimientos de cultivo de tejidos que duran más de unos pocos días mediante el uso de células vivas o tejidos se consideran normalmente “*in vitro*” aunque en determinadas realizaciones, este término puede usarse indistintamente con *ex vivo*.

El término “*in vivo*” se refiere generalmente a actividades que tienen lugar dentro de un organismo.

Como se usa en el presente documento, los términos “reprogramación” o “desdiferenciación” o las expresiones “aumentar la potencia celular” o “aumentar la potencia del desarrollo” se refieren a un método para aumentar la potencia de una célula o desdiferenciar la célula en un estado menos diferenciado. Por ejemplo, una célula que tiene una potencia celular aumentada tiene más plasticidad de desarrollo (es decir, puede diferenciarse en más tipos de células) en comparación con la misma célula en el estado no reprogramado. En otras palabras, una célula reprogramada es una que está en un estado menos diferenciado que la misma célula en un estado no reprogramado.

Como se usa en el presente documento, el término “diferenciación” es el proceso por el cual una célula no especializada (“no comprometida”) o menos especializada adquiere las características de una célula especializada tal como, por ejemplo, una célula sanguínea o una célula muscular. Una célula diferenciada o inducida por diferenciación es una que ha tomado una posición más especializada (“comprometida”) dentro del linaje de una célula. El término “comprometida”, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la ruta de diferenciación hasta un punto donde, en circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo de célula específico o subconjunto de tipos de células, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciada. Como se usa en el presente documento, el término “pluripotente” se refiere a la capacidad de una célula para formar todos los linajes del cuerpo o soma (es decir, el embrión apropiado). Por ejemplo, las células madre embrionarias son un tipo de células madre pluripotentes que son capaces de formar células de cada una de las tres capas germinales, el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. La pluripotencia es un continuo de potencias del desarrollo que varían desde la célula incompleta o parcialmente pluripotente (por ejemplo, una célula madre de epiblasto o EpiSC), que es incapaz de dar lugar a un organismo completo en la célula más primitiva, más pluripotente, que es capaz de dar lugar a un organismo completo (por ejemplo, una célula madre embrionaria).

Como se usa en el presente documento, la expresión “células madre pluripotentes inducidas” o iPSC, significa que las células madre se producen a partir de células adultas, neonatales o fetales diferenciadas que han sido inducidas o cambiadas, es decir, reprogramadas en células capaces de diferenciarse en tejidos de las tres capas germinales o dérmicas: mesodermo, endodermo y ectodermo. Las iPSC producidas no se refieren a las células como ya se encuentran en la naturaleza.

Como se usa en el presente documento, la expresión “célula madre embrionaria” se refiere a células madre pluripotentes de origen natural de la masa celular interna del blastocisto embrionario. Las células madre embrionarias son pluripotentes y dan lugar durante el desarrollo a todos los derivados de las tres capas germinales primarias: ectodermo, endodermo y mesodermo. No contribuyen a las membranas extraembrionarias o a la placenta, es decir, no son totipotentes.

Como se usa en el presente documento, la expresión “célula madre multipotente” se refiere a una célula que tiene el potencial de desarrollo para diferenciarse en células de una o más capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), pero no las tres. Por lo tanto, una célula multipotente también puede denominarse una “célula parcialmente diferenciada”. Las células multipotentes son bien conocidas en la técnica y los ejemplos de células multipotentes incluyen células madre adultas, tales como, por ejemplo, células madre hematopoyéticas y células madre neurales. “Multipotente” indica que una célula puede formar muchos tipos de células en un linaje dado, pero no células de otros linajes. Por ejemplo, una célula hematopoyética multipotente puede formar los muchos tipos diferentes de células sanguíneas (rojas, blancas, plaquetas, etc.), pero no puede formar neuronas. En consecuencia, el término “multipotencia” se refiere a un estado de una célula con un grado de potencial de desarrollo que es menor que totipotente y pluripotente.

La pluripotencia puede determinarse, en parte, evaluando las características de pluripotencia de las células. Las características de pluripotencia incluyen, pero no se limitan a: (i) morfología de célula madre pluripotente; (ii) el potencial de autorrenovación ilimitada; (iii) expresión de marcadores de células madre pluripotentes que incluyen, pero no se limitan a SSEA1 (solo ratón), SSEA3/4, SSEA5, TRA1-60/81, TRA1-85, TRA2-54, GCTM-2, TG343, TG30, CD9, CD29, CD133/prominina, CD140a, CD56, CD73, CD90, CD105, OCT4, NANOG, SOX2, CD30 y/o CD50; (iv) capacidad de diferenciarse en los tres linajes somáticos (ectodermo, mesodermo y endodermo); (v) formación de teratoma que consiste en los tres linajes somáticos; y (vi) formación de cuerpos embrioides que consisten en células de los tres linajes somáticos.

Se han descrito anteriormente dos tipos de pluripotencia: el estado de pluripotencia “cebado” o “metaestable” similar a las células madre epiblasticas (EpiSC) del blastocisto tardío, y el estado de pluripotencia “virgen” o “fundamental” similar a la masa celular interna del blastocisto temprano/preimplantación. Si bien ambos estados pluripotentes presentan las características descritas anteriormente, el estado virgen o fundamental exhibe además: (i) preinactivación o reactivación del cromosoma X en células femeninas; (ii) clonalidad y supervivencia mejoradas durante el cultivo de células individuales; (iii) reducción global en la metilación del ADN; (iv) reducción de la deposición de marca de cromatina represora H3K27me3 en promotores del gen regulador del desarrollo; y (v) expresión reducida de marcadores de diferenciación con respecto a células pluripotentes de estado cebado. Las metodologías convencionales de reprogramación celular en donde se introducen genes de pluripotencia exógenos en una célula somática, se expresan y después se silencian o se eliminan de las células pluripotentes resultantes generalmente se ven como características del estado cebado de pluripotencia. En condiciones de cultivo de células pluripotentes convencionales, tales células permanecen en el estado cebado a menos que se mantenga la expresión transgénica exógena, en donde se observan características del estado fundamental.

Como se usa en el presente documento, la expresión “morfología de células madre pluripotentes” se refiere a las características morfológicas clásicas de una célula madre embrionaria. La morfología de las células madre embrionarias normales se caracteriza por tener una forma redonda y pequeña, con una alta relación núcleo-citoplasma, la notable presencia de nucleolos y la separación típica entre células.

Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a cualquier animal, preferiblemente un paciente humano, ganado u otro animal domesticado.

Un “factor de pluripotencia” o “factor de reprogramación” se refiere a un agente capaz de aumentar la potencia del desarrollo de una célula, ya sea solo o en combinación con otros agentes. Los factores de pluripotencia incluyen, sin limitación, polinucleótidos, polipéptidos y moléculas pequeñas capaces de aumentar la potencia del desarrollo de una célula. Los factores de pluripotencia ilustrativos incluyen, por ejemplo, factores de transcripción y agentes de reprogramación de moléculas pequeñas.

“Cultivo” o “cultivo celular” se refiere al mantenimiento, el crecimiento y/o la diferenciación de células en un entorno *in vitro*. “Medios de cultivo celular”, “medios de cultivo” (“medio” singular en cada caso), “suplemento” y “suplemento de medios” se refieren a composiciones nutritivas que cultivan cultivos celulares.

“Cultivar” o “mantener” se refiere al mantenimiento, la propagación (crecimiento) y/o la diferenciación de células fuera del tejido o del cuerpo, por ejemplo, en una placa o un matraz de cultivo celular de plástico estéril (o plástico revestido). “Cultivo” o “mantenimiento”, puede utilizar un medio de cultivo como fuente de nutrientes, hormonas y/u otros factores útiles para propagar y/o sostener las células.

Como se usa en el presente documento, el término “mesodermo” se refiere a una de las tres capas germinales que aparece durante la embriogénesis temprana y que da lugar a diversos tipos de células especializadas que incluyen células sanguíneas del sistema circulatorio, músculos, el corazón, la dermis, el esqueleto y otros tejidos de soporte y conectivo.

Como se usa en el presente documento, la expresión “endotelio hemogénico definitivo” (HE) o “endotelio hemogénico definitivo derivado de células madre pluripotentes” (iHE) se refiere a un subconjunto de células endoteliales que dan lugar a células madre y progenitoras hematopoyéticas en un proceso denominado transición endotelial a hematopoyética. El desarrollo de células hematopoyéticas en el embrión procede secuencialmente desde el mesodermo de la placa lateral a través del hemangioblasto hasta el endotelio hemogénico definitivo y los progenitores hematopoyéticos.

La expresión “células madre y progenitoras hematopoyéticas”, “células madre hematopoyéticas”, “células progenitoras hematopoyéticas” o “células precursoras hematopoyéticas” se refiere a células que están comprometidas con un linaje hematopoyético pero son capaces de una diferenciación hematopoyética adicional e incluyen células madre hematopoyéticas multipotentes (hematoblastos), progenitores mieloides, progenitores de megacariocitos, progenitores de eritrocitos y progenitores linfoides. Las células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSC) son células madre multipotentes que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas incluyendo linajes mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linfoides (linfocitos T, linfocitos B, células NK). La expresión “célula madre hematopoyética definitiva” como se usa en el presente documento, se refiere a células hematopoyéticas CD34+ capaces de dar lugar tanto a tipos de células mieloides como linfoides maduras que incluyen linfocitos T, células NK y linfocitos B. Las células hematopoyéticas también incluyen diversos subconjuntos de células hematopoyéticas primitivas que dan lugar a eritrocitos primitivos, megacariocitos y macrófagos.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “linfocito T” y “célula T” se usan indistintamente y se refieren a un tipo principal de glóbulos blancos que completa la maduración en el timo y que tiene varias funciones en el sistema inmunitario, incluyendo la identificación de antígenos extraños específicos en el cuerpo y la activación y desactivación de otras células inmunitarias. Un linfocito T puede ser cualquier linfocito T, tal como un linfocito T cultivado, por ejemplo, un linfocito T primario, o un linfocito T de una línea de linfocitos T cultivados, por ejemplo,

Jurkat, SupT1, etc., o un linfocito T obtenido de un mamífero. El linfocito T puede ser células CD3+. El linfocito T puede ser cualquier tipo de linfocito T y puede ser de cualquier fase del desarrollo, que incluye, pero no se limita a, linfocitos T dobles positivos para CD4+/CD8+, linfocitos T auxiliares CD4+ (por ejemplo, linfocitos Th1 y Th2), linfocitos T CD8+ (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos), células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos de sangre periférica (PBL), linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), linfocitos T de memoria, linfocitos T vírgenes, linfocitos T reguladores, linfocitos T gamma delta (linfocitos T $\gamma\delta$) y similares. Los tipos adicionales de linfocitos T auxiliares incluyen células tales como linfocitos Th3 (Treg), Th17, Th9 o Tfh. Los tipos adicionales de linfocitos T de memoria incluyen células tales como linfocitos T de memoria central (linfocitos Tcm), linfocitos T de memoria efectores (linfocitos Tern y células TEMRA). El linfocito T también puede referirse a un linfocito T modificado genéticamente, tal como un linfocito T modificado para expresar un receptor de linfocitos T (TCR) o un receptor quimérico para el antígeno (CAR). El linfocito T también puede diferenciarse de una célula madre o célula progenitora.

“Linfocitos T CD4+” se refiere a un subconjunto de linfocitos T que expresan CD4 en su superficie y están asociados a la respuesta inmunitaria mediada por células. Se caracterizan por los perfiles de secreción después de la estimulación, que pueden incluir secreción de citocinas tales como IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-4 e IL-10. “CD4” son glucoproteínas de 55 kD definidas originalmente como antígenos de diferenciación en los linfocitos T, pero también se encuentran en otras células que incluyen monocitos/macrófagos. Los antígenos CD4 son miembros de la familia supergénica de inmunoglobulina y están implicados como elementos de reconocimiento asociativos en respuestas inmunitarias restringidas por MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) de clase II. Sobre los linfocitos T definen el subconjunto auxiliar/inductor.

“Linfocitos T CD8+” se refiere a un subconjunto de linfocitos T que expresan CD8 en su superficie, están restringidos al MHC de clase I y funcionan como linfocitos T citotóxicos. Las moléculas “CD8” son antígenos de diferenciación encontrados en timocitos y en linfocitos T citotóxicos y supresores. Los antígenos CD8 son miembros de la familia supergénica de inmunoglobulina y son elementos de reconocimiento asociativos en interacciones restringidas al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I.

Como se usa en el presente documento, la expresión “célula NK” o “linfocito citolítico natural” se refiere a un subconjunto de linfocitos de sangre periférica definidos por la expresión de CD56 o CD16 y la ausencia del receptor de linfocitos T (CD3). Como se usa en el presente documento, las expresiones “célula NK adaptativa” y “célula NK de memoria” son intercambiables y se refieren a un subconjunto de células NK que son fenotípicamente CD3- y CD56+, que expresan NKG2C y CD57 y, opcionalmente, CD16, pero carecen de expresión de uno o más de los siguientes: PLZF, SYK, FcεRy y EAT-2. En algunas realizaciones, las subpoblaciones aisladas de células NK CD56+ comprenden la expresión de ligandos CD16, NKG2C, CD57, NKG2D, ligandos NCR, NKp30, NKp40, Nkp46, KIR activadores e inhibidores, NKG2A y DNAM-1. CD56+ puede tener expresión tenue o clara.

Como se usa en el presente documento, la expresión “células NKT” o “linfocitos T citolíticos naturales” se refiere a linfocitos T restringidos a CD1d, que expresan un receptor de linfocitos T (TCR). A diferencia de los linfocitos T convencionales que detectan los antígenos peptídicos presentados por las moléculas mayores de histocompatibilidad (MHC) convencionales, las células NKT reconocen los antígenos lipídicos presentados por CD1d, una molécula MHC no clásica. Actualmente se reconocen dos tipos de células NKT. Las células invariantes o tipo INKT expresan un repertorio de TCR muy limitado: una cadena α canónica (Va24-Ja18 en seres humanos) asociada a un espectro limitado de cadenas β (V β 11 en seres humanos). La segunda población de células NKT, denominada células NKT de tipo II no clásicas o no invariantes, muestra un uso más heterogéneo de $\alpha\beta$ de TCR. Las células NKT de tipo I se consideran actualmente adecuadas para la inmunoterapia. Las células NKT adaptativas o invariantes (tipo I) pueden identificarse con la expresión de al menos uno o más de los siguientes marcadores, TCR Va24-Ja18, Vb11, CD1d, CD3, CD4, CD8, aGalCer, CD161 y CD56.

Como se usa en el presente documento, el término “aislado” o similar se refiere a una célula, o una población de células, que se ha separado de su entorno original, es decir, el entorno de las células aisladas está sustancialmente libre de al menos un componente como se encuentra en el entorno en donde existen las células de referencia “no aisladas”. El término incluye una célula que se elimina de algunos o todos los componentes según se encuentra en su entorno natural, por ejemplo, tejido, biopsia. El término también incluye una célula que se elimina de al menos uno, algunos o todos los componentes a medida que la célula se encuentra en entornos de origen no natural, por ejemplo, cultivo, suspensión celular. Por lo tanto, una célula aislada se separa parcial o completamente de al menos un componente, que incluye otras sustancias, células o poblaciones celulares, como que se encuentra en la naturaleza o como se cultiva, se almacena o subsiste en entornos no naturales. Los ejemplos específicos de células aisladas incluyen células parcialmente puras, células sustancialmente puras y células cultivadas en un medio que no se produce de forma natural. Las células aisladas pueden obtenerse a partir de la separación de las células deseadas, o poblaciones de las mismas, de otras sustancias o células en el entorno, o de eliminar una o más poblaciones celulares o subpoblaciones del entorno. Como se usa en el presente documento, el término “purificar” o similares se refiere a aumentar la pureza. Por ejemplo, la pureza puede aumentarse hasta al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 %.

Como se usa en el presente documento, el término “codifica” se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de la misma. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona habitualmente en listados de secuencias, como la cadena no codificante, usada como el molde para la transcripción de un gen o ADNc, puede denominarse que codifica la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

Una “construcción” se refiere a una macromolécula o complejo de moléculas que comprenden un polinucleótido que se administrará a una célula hospedadora, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Un “vector”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir el suministro o la transferencia de un material genético extraño a las células diana, donde puede replicarse y/o expresarse. El término “vector” como se usa en el presente documento comprende la construcción a suministrar. Un vector puede ser una molécula lineal o circular. Un vector puede ser integrante o no integrante. Los principales tipos de vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vector episómico, vectores víricos, cósmidos y cromosomas artificiales. Los vectores víricos incluyen, pero no se limitan a, vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado, vector de retrovirus, vector de lentivirus, vector de virus Sendai y similares.

Por “integración” se entiende que uno o más nucleótidos de una construcción se insertan de manera estable en el genoma celular, es decir, se unen covalentemente a la secuencia de ácido nucleico dentro del ADN cromosómico de la célula. Por “integración dirigida” se entiende que los nucleótidos de una construcción se insertan en el ADN cromosómico o mitocondrial de la célula en un sitio preseleccionado o “sitio de integración”. El término “integración” como se usa en el presente documento se refiere además a un proceso que implica la inserción de una o más secuencias exógenas o nucleótidos de la construcción, con o sin delección de una secuencia endógena o nucleótido en el sitio de integración. En el caso donde hay una delección en el sitio de inserción, “integración” puede comprender además la sustitución de la secuencia endógena o un nucleótido que se elimina con el uno o más nucleótidos insertados.

Como se usa en el presente documento, el término “exógeno” pretende significar que la molécula a la que se hace referencia o la actividad a la que se hace referencia se introduce en la célula hospedadora. La molécula puede introducirse, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico codificante en el material genético hospedador tal como mediante integración en un cromosoma hospedador o como material genético no cromosómico tal como un plásmido. Por lo tanto, el término como se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante se refiere a la introducción del ácido nucleico codificante en una forma expresable en la célula. El término “endógeno” se refiere a una molécula o actividad mencionada que está presente en la célula hospedadora. De manera similar, el término cuando se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante se refiere a la expresión de un ácido nucleico codificante contenido dentro de la célula y no introducido exógenamente.

Como se usa en el presente documento, un “gen de interés” o “una secuencia polinucleotídica de interés” es una secuencia de ADN que se transcribe en ARN y, en algunos casos, se traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Un gen o polinucleótido de interés puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, mamífero) y secuencias de ADN sintéticas. Por ejemplo, un gen de interés puede codificar un miARN, un ARNh_c, un polipéptido nativo (es decir, un polipéptido que se encuentra en la naturaleza) o un fragmento de los mismos; un polipéptido variante (es decir, un mutante del polipéptido nativo que tiene menos del 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido nativo) o un fragmento del mismo; un polipéptido o fragmento peptídico modificado, un péptido o polipéptido terapéutico, un marcador de obtención de imágenes, un marcador seleccionable y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “polinucleótido” se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. La secuencia de un polinucleótido está compuesta por cuatro bases de nucleótidos: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) por timina cuando el polinucleótido es ARN. Un polinucleótido puede incluir un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, un cebador, una etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. El polinucleótido también se refiere tanto a moléculas bicatenarias como monocatenarias.

Como se usa en el presente documento, el término “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente y se refieren a una molécula que tiene residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Un polipéptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se coloca ninguna limitación en el número máximo de aminoácidos de un polipéptido. Como se usa en el presente documento, los términos se refieren a ambas cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica polipéptidos o proteínas. Los “polipéptidos” incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos,

homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen polipéptidos naturales, polipéptidos recombinantes, polipéptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

“Unido operativamente” se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico de tal manera que la función de uno se ve afectada por el otro. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante o ARN funcional cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante o ARN funcional (es decir, la secuencia codificante o ARN funcional está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse operativamente a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

Como se usa en el presente documento, la expresión “impronta genética” se refiere a información genética o epigenética que contribuye a atributos terapéuticos preferenciales en una célula fuente o una iPSC, y puede ser alcanzable en las iPSC derivadas de células fuente y/o las células de linaje hematopoyético derivadas de iPSC. Como se usa en el presente documento, “una célula fuente” es una célula no pluripotente que puede usarse para generar iPSC mediante la reprogramación, y las iPSC derivadas de células fuente pueden diferenciarse adicionalmente en tipos celulares específicos que incluyen cualquier célula del linaje hematopoyético. Las iPSC derivadas de células fuente y las células diferenciadas a partir de las mismas a veces se denominan colectivamente “células derivadas” dependiendo del contexto. Como se usa en el presente documento, la impronta o improntas genéticas que confieren un atributo terapéutico preferencial se incorporan a las iPSC ya sea mediante la reprogramación de una célula fuente seleccionada que es específica de la respuesta del donador, de la enfermedad o del tratamiento, o a través de la introducción de modalidades genéticamente modificadas para iPSC mediante el uso de edición genómica. En el aspecto de una célula fuente obtenida a partir de un contexto de donador, enfermedad o tratamiento seleccionado específicamente, la impronta genética que contribuye a atributos terapéuticos preferentes puede incluir cualquier modificación genética o epigenética específica del contexto que manifieste un fenotipo alcanzable, es decir, un atributo terapéutico preferencial, que se pasa a células derivadas de la célula fuente seleccionada, independientemente de los eventos moleculares subyacentes que se identifican o no. Las células de fuente específica de donador, enfermedad o respuesta de tratamiento pueden comprender improntas genéticas que pueden retenerse en iPSC y células de linaje hematopoyético derivadas, cuyas improntas genéticas incluyen, pero no se limitan a, TCR monoespecífico predispuesto, por ejemplo, de un linfocito T específico de virus o linfocitos T citolíticos naturales invariantes (iNKT); polimorfismos genéticos rastreables y deseables, por ejemplo, homocigotos para una mutación puntual que codifica el receptor CD16 de alta afinidad en donantes seleccionados; y requisitos de HLA predeterminados, es decir, células donadoras compatibles con HLA seleccionadas que exhiben un haplotipo con una población aumentada. Como se usa en el presente documento, los atributos terapéuticos preferentes incluyen injerto, tráfico, localización, viabilidad, autorrenovación, persistencia, regulación de la respuesta inmunitaria y modulación, supervivencia y citotoxicidad mejoradas de una célula derivada. Un atributo terapéutico preferencial también puede relacionarse con la expresión del receptor dirigido a antígeno; presentación de HLA o falta de los mismos; resistencia al microentorno tumoral; inducción de células inmunitarias circunstantes y modulaciones inmunitarias; especificidad específica mejorada con un efecto no específico de tumor reducido; resistencia al tratamiento tal como quimioterapia.

La expresión “propiedad terapéutica mejorada” como se usa en el presente documento, se refiere a una propiedad terapéutica de una célula que se mejora en comparación con una célula inmunitaria típica del mismo tipo de célula general. Por ejemplo, una célula NK con una “propiedad terapéutica mejorada” tendrá una propiedad terapéutica potenciada, mejorada y/o aumentada en comparación con una célula NK típica, no modificada y/o de origen natural. Las propiedades terapéuticas de una célula inmunitaria pueden incluir, pero no se limitan a, injerto celular, tráfico, localización, viabilidad, autorrenovación, persistencia, regulación y modulación de la respuesta inmunitaria, supervivencia y citotoxicidad. Las propiedades terapéuticas de una célula inmunitaria también se manifiestan por expresión del receptor dirigido a antígeno; presentación de HLA o falta de los mismos; resistencia al microentorno tumoral; inducción de células inmunitarias circunstantes y modulaciones inmunitarias; especificidad específica mejorada con un efecto no específico de tumor reducido; resistencia al tratamiento tal como quimioterapia.

Como se usa en el presente documento, el término “acoplador” se refiere a una molécula, por ejemplo, un polipéptido de fusión, que es capaz de formar un enlace entre una célula inmunitaria, por ejemplo, un linfocito T, una célula NK, una célula NKT, un linfocito B, un macrófago, un neutrófilo y una célula tumoral; y activar la célula inmunitaria. Los ejemplos de acopladores incluyen, pero no se limitan a, acopladores de linfocitos T biespecíficos (BiTE), acopladores de células destructoras biespecíficas (BiKEs), acopladores de células destructoras trispecíficas o acopladores de células destructoras multispecíficas, o acopladores universales compatibles con múltiples tipos de células inmunitarias.

Como se usa en el presente documento, la expresión “receptor de activación de superficie” se refiere a un receptor capaz de desencadenar o iniciar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta citotóxica. Los receptores de activación de superficie pueden diseñarse por ingeniería genética y pueden expresarse en células efectoras, por ejemplo, un linfocito T, una célula NK, una célula NKT, un linfocito B, un macrófago, un neutrófilo. En algunas realizaciones, el receptor de activación de superficie facilita el acoplamiento de anticuerpos bi o multispecíficos entre las células efectoras y la célula diana específica, por ejemplo, una célula tumoral, independientemente de los receptores naturales y tipos de células de la célula efectora. Usando este enfoque, pueden generarse iPSC que

comprenden un receptor de activación de superficie universal y después diferenciar tales iPSC en poblaciones de diversos tipos de células efectoras que expresan el receptor de activación de superficie universal. Por “universal”, se entiende que el receptor de activación de superficie puede expresarse en, y activar, cualquier célula efectora independientemente del tipo de célula, y todas las células efectoras que expresan el receptor universal pueden acoplarse o unirse a los acopladores que tienen el mismo epítipo reconocible por el receptor de activación de superficie, independientemente de las especificidades de unión tumoral del promotor. En algunas realizaciones, se usan acopladores que tienen la misma especificidad de direccionamiento tumoral para acoplarse con el receptor de activación de superficie universal. En algunas realizaciones, se usan acopladores que tienen especificidad de direccionamiento tumoral diferente para acoplarse con el receptor de activación de superficie universal. Como tal, uno o múltiples tipos de células efectoras pueden acoplarse para destruir un tipo específico de células tumorales en algún caso, y para destruir dos o más tipos de tumores en algunos otros casos. Un receptor de activación de superficie generalmente comprende un dominio coestimulador para la activación de células efectoras y un antiepítipo que es específico del epítipo de un acoplador. Un acoplador biespecífico es específico para el antiepítipo de un receptor de activación de superficie en un extremo, y es específico de un antígeno tumoral en el otro extremo.

Como se usa en el presente documento, la expresión “proteína de interruptor de seguridad” se refiere a una proteína modificada por ingeniería genética diseñada para evitar la toxicidad potencial o efectos adversos de otro modo de una terapia celular. En algunos casos, la expresión de la proteína del interruptor de seguridad se controla condicionalmente para abordar las preocupaciones de seguridad para células modificadas por ingeniería genética trasplantadas que han incorporado permanentemente el gen que codifica la proteína del interruptor de seguridad en su genoma. Esta regulación condicional podría ser variable y podría incluir control a través de una activación postraduccional mediada por moléculas pequeñas y regulación transcripcional específica de tejido y/o temporal. El interruptor de seguridad podría mediar la inducción de la apoptosis, la inhibición de la síntesis de proteínas, la replicación del ADN, la detención del crecimiento, la regulación genética transcripcional y postranscripcional y/o el agotamiento mediado por anticuerpos. En algún caso, la proteína del interruptor de seguridad se activa por una molécula exógena, por ejemplo, un profármaco, que cuando se activa, desencadena la apoptosis y/o la muerte celular de una célula terapéutica. Los ejemplos de proteínas de interruptor de seguridad incluyen, pero no se limitan a, genes suicidas tales como caspasa 9 (o caspasa 3 o 7), timidina quinasa, citosina desaminasa, CD20 de linfocitos B, EGFR modificado y cualquier combinación de los mismos. En esta estrategia, un profármaco que se administra en caso de un evento adverso es activado por el producto génico suicida y destruye la célula transducida.

Como se usa en el presente documento, la expresión “proteínas o péptidos farmacéuticamente activos” se refiere a proteínas o péptidos que son capaces de lograr un efecto biológico y/o farmacéutico sobre un organismo. Una proteína farmacéuticamente activa ha curado propiedades curativas o paliativas contra una enfermedad y puede administrarse para mejorar mitigar, aliviar, revertir o disminuir la gravedad de una enfermedad. Una proteína farmacéuticamente activa también tiene propiedades profilácticas y se usa para prevenir la aparición de una enfermedad o para disminuir la gravedad de dicha enfermedad o afección patológica cuando emerge. Las proteínas farmacéuticamente activas incluyen una proteína o péptido completo o fragmentos farmacéuticamente activos de los mismos. También incluye análogos farmacéuticamente activos de la proteína o péptido o análogos de fragmentos de la proteína o péptido. La expresión proteína farmacéuticamente activa también se refiere a una pluralidad de proteínas o péptidos que actúan cooperativa o sinérgicamente para proporcionar un beneficio terapéutico. Los ejemplos de proteínas o péptidos farmacéuticamente activos incluyen, pero no se limitan a, receptores, proteínas de unión, factores de transcripción y traducción, proteínas supresoras del crecimiento tumoral, anticuerpos o fragmentos de los mismos, factores de crecimiento y/o citocinas.

Como se usa en el presente documento, la expresión “molécula de señalización” se refiere a cualquier molécula que modula, participa en, inhibe, activa, reduce o aumenta, la transducción de señales celulares. La transducción de señales se refiere a la transmisión de una señal molecular en forma de modificación química por el reclutamiento de complejos de proteínas a lo largo de una ruta que finalmente desencadena un evento bioquímico en la célula. Las rutas de transducción de señales son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, señalización de receptor acoplado a proteína G, señalización de receptor de tirosina quinasa, señalización de integrina, señalización de puerta toll, señalización de canal iónico de selección de ligando, ruta de señalización de ERK/MAPK, ruta de señalización de Wnt, ruta dependiente de AMPc y ruta de señalización de IP3/DAG.

Como se usa en el presente documento, la expresión “modalidad de direccionamiento” se refiere a una molécula, por ejemplo, un polipéptido, que se incorpora genéticamente en una célula para promover la especificidad del antígeno y/o epítipo que incluye, pero no se limita a i) especificidad antigénica ya que se relaciona con un receptor quimérico para el antígeno (CAR) único o receptor de linfocitos T (TCR), ii) especificidad por el acoplador como se relaciona con anticuerpos monoclonales o promotores biespecíficos, iii) direccionamiento de la célula transformada, iv) direccionamiento de células madre cancerosas y v) otras estrategias de direccionamiento en ausencia de un antígeno específico o molécula de superficie.

Como se usa en el presente documento, el término “específico” o “especificidad” puede usarse para referirse a la capacidad de una molécula, por ejemplo, un receptor o un promotor, para unirse selectivamente a una molécula diana, en contraste con la unión no específica o no selectiva.

La expresión “terapia celular adoptiva” como se usa en el presente documento se refiere a una inmunoterapia basada en células que, como se usa en el presente documento, se refiere a la transfusión de linfocitos autólogos o alogénicos, identificados como linfocitos T o B, genéticamente modificados o no, que se han expandido *ex vivo* antes de dicha transfusión.

Una “cantidad terapéuticamente suficiente”, como se usa en el presente documento, incluye dentro de su significado una cantidad no tóxica pero suficiente y/o eficaz de la composición terapéutica y/o farmacéutica particular a la que se refiere a proporcionar un efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro dependiendo de factores tales como la salud general del paciente, la edad del paciente y la etapa y la gravedad de la afección. En realizaciones particulares, una cantidad terapéuticamente suficiente es suficiente y/o eficaz para mejorar, reducir y/o mejorar al menos un síntoma asociado a una enfermedad o afección del sujeto que se está tratando.

La diferenciación de células madre pluripotentes requiere un cambio en el sistema de cultivo, tal como cambiar los agentes de estímulo en el medio de cultivo o el estado físico de las células. La estrategia más convencional usa la formación de cuerpos embrioides (EB) como un intermedio común y crítico para iniciar la diferenciación específica de linaje. Los “cuerpos embrioides” son agrupaciones tridimensionales que se ha demostrado que imitan el desarrollo de embriones a medida que dan lugar a numerosos linajes dentro de su área tridimensional. A través del proceso de diferenciación, normalmente pocas horas a días, los EB sencillos (por ejemplo, células madre pluripotentes agregadas provocadas para diferenciarse) continúan madurando y se desarrollan en un EB quístico en el momento en que, normalmente, de días a pocas semanas, se procesan adicionalmente para continuar la diferenciación. La formación de EB se inicia poniendo las células madre pluripotentes en estrecha proximidad entre sí en agrupaciones de células multicapa tridimensionales, normalmente esto se logra mediante uno de varios métodos que incluyen permitir que las células pluripotentes se sedimenten en gotas líquidas, sedimentando las células en placas de pocillos de fondo de “U” o mediante agitación mecánica. Para promover el desarrollo de EB, los agregados de células madre pluripotentes requieren señales de diferenciación adicionales, ya que los agregados mantenidos en medio de mantenimiento de cultivo pluripotente no forman EB adecuados. Como tales, los agregados de células madre pluripotentes deben transferirse al medio de diferenciación que proporciona señales que conduzcan al linaje de elección. El cultivo basado en EB de células madre pluripotentes normalmente da como resultado la generación de poblaciones celulares diferenciadas (capas germinales de ectodermo, mesodermo y endodermo) con una proliferación modesta dentro de la agrupación de células EB. Aunque se ha demostrado que facilita la diferenciación celular, los EB, sin embargo, dan lugar a células heterogéneas en estado de diferenciación variable debido a la exposición inconsistente de las células en la estructura tridimensional a las señales de diferenciación del entorno. Además, los EB son laboriosos de crear y mantener. Por otra parte, la diferenciación celular a través de EB se acompaña de una modesta expansión celular, lo que también contribuye a una baja eficiencia de diferenciación.

En comparación, “formación de agregados”, a diferencia de la “formación de EB”, puede usarse para expandir las poblaciones de células derivadas de células madre pluripotentes. Por ejemplo, durante la expansión de células madre pluripotentes basadas en agregados, los medios de cultivo se seleccionan para mantener la proliferación y la pluripotencia. La proliferación de células generalmente aumenta el tamaño de los agregados que forman agregados más grandes, estos agregados pueden disociarse rutinariamente de forma mecánica o enzimática en agregados más pequeños para mantener la proliferación celular dentro del cultivo y aumentar el número de células. A diferencia del cultivo de EB, las células cultivadas dentro de agregados en cultivo de mantenimiento mantienen marcadores de pluripotencia. Los agregados de células madre pluripotentes requieren más señales de diferenciación para inducir la diferenciación.

Como se usa en el presente documento, “diferenciación en monocapa” es una expresión que se refiere a un método de diferenciación distinto de la diferenciación a través de agrupaciones de múltiples capas tridimensionales de células, es decir, “formación de EB”. La diferenciación en monocapa, entre otras ventajas desveladas en el presente documento, evita la necesidad de formación de EB para el inicio de la diferenciación. Debido a que el cultivo en monocapa no imita el desarrollo de embriones, tal como la formación de EB, la diferenciación hacia linajes específicos se considera mínima en comparación con las tres diferencias de la capa germinal en EB.

Como se usa en el presente documento, una célula “disociada” se refiere a una célula que se ha separado o purificado sustancialmente de otras células o de una superficie (por ejemplo, una superficie de la placa de cultivo). Por ejemplo, las células pueden disociarse de un animal o tejido mediante métodos mecánicos o enzimáticos. Alternativamente, las células que se agregan *in vitro* pueden disociarse entre sí, tal como por disociación en una suspensión de agrupaciones, células individuales o una mezcla de células individuales y agrupaciones, enzimática o mecánicamente. En otra realización alternativa más, las células adherentes se disocian de una placa de cultivo u otra superficie. Por lo tanto, la disociación puede implicar romper las interacciones celulares con la matriz extracelular (ECM) y sustratos (por ejemplo, superficies de cultivo) o romper la ECM entre las células.

Como se usa en el presente documento, “células alimentadoras” o “alimentadoras” son términos que describen células de un tipo que se co-cultivan con células de un segundo tipo para proporcionar un entorno en donde las células del segundo tipo puedan crecer, ya que las células alimentadoras proporcionan factores de crecimiento y nutrientes para el soporte del segundo tipo de célula. Las células alimentadoras son opcionalmente de una especie

diferente a medida que las células son compatibles. Por ejemplo, ciertos tipos de células humanas, que incluyen células madre, pueden soportarse por cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón o fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados. Las células alimentadoras normalmente pueden inactivarse cuando se co-cultivan con otras células mediante irradiación o tratamiento con un agente antimitótico tal como mitomicina para evitar que se salgan de las células que soportan. Las células alimentadoras pueden incluir células endoteliales, células estromales (por ejemplo, células epiteliales o fibroblastos) y células leucémicas. Sin limitar lo anterior, un tipo específico de célula alimentadora puede ser una alimentadora humana, tal como un fibroblasto de piel humana. Otro tipo de célula alimentadora puede ser fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). En general, diversas células alimentadoras pueden usarse en parte para mantener la pluripotencia, la diferenciación directa hacia un cierto linaje y promover la maduración a los tipos de células especializadas, tal como una célula efectora.

Como se usa en el presente documento, un entorno “libre de alimentadores” (FF) se refiere a un entorno tal como una condición de cultivo, cultivo celular o medio de cultivo que está esencialmente libre de células alimentadoras o estromales, y/o que no se ha precondicionado por el cultivo de células alimentadoras. El medio “precondicionado” se refiere a un medio recolectado después de que las células alimentadoras se hayan cultivado dentro del medio durante un período de tiempo, tal como durante al menos un día. El medio precondicionado contiene muchas sustancias mediadoras, incluyendo factores de crecimiento y citocinas secretadas por las células alimentadoras cultivadas en el medio.

“Funcional” como se usa en el contexto de la edición genómica o la modificación de iPSC, y células no pluripotentes derivadas diferenciadas a partir de las mismas, o edición genómica o modificación de células no pluripotentes e iPSC derivadas reprogramadas a partir de las mismas, se refiere a (1) a nivel génico, expresión génica exitosa insertada, inactivada, atenuada, expresión transgénica o génica controlada tal como expresión inducible o temporal en una fase del desarrollo celular deseada, que se logra a través de la edición o modificación genómica directa, o a través de “pasar” a través de diferenciación desde o reprogramación de una célula de partida que inicialmente se modifica genómicamente; o (2) a nivel celular, exitosamente eliminar, añadir o alterar una función/característica celular a través de (i) modificación de la expresión génica obtenida en dicha célula a través de la edición genómica directa, (ii) modificación de la expresión génica mantenida en dicha célula a través de “pasar” a través de diferenciación desde o reprogramación de una célula de partida que inicialmente se modifica genómicamente; (iii) regulación génica posterior en dicha célula como resultado de la modificación de la expresión génica que solo aparece en una fase de desarrollo anterior de dicha célula, o solo aparece en la célula de partida que da lugar a dicha célula a través de diferenciación o reprogramación; o (iv) función o atributo celular mejorados o recién alcanzados mostrados dentro del producto celular maduro, derivado inicialmente de la edición genómica o modificación realizada en iPSC, origen celular progenitor o desdiferenciado.

“Deficiente en HLA”, que incluye deficiente en HLA de clase I o deficiente en HLA de clase II, o ambos, se refiere a células que carecen o ya no mantienen, o tienen un nivel reducido de expresión superficial de un complejo MHC completo que comprende un heterodímero de proteína HLA de clase I y/o un heterodímero HLA de clase II, de tal manera que el nivel disminuido o reducido es menor que el nivel detectable naturalmente por otras células o por métodos sintéticos. La deficiencia de HLA de clase I puede lograrse mediante la delección funcional de cualquier región del locus de HLA de clase I (cromosoma 6p21), o delección o reducción del nivel de expresión de genes asociados a HLA de clase I que incluyen, no limitándose a, gen de beta-2 microglobulina (B2M), gen TAP 1, gen TAP 2 y Tapasina. La deficiencia de HLA de clase II puede lograrse mediante la eliminación o reducción funcional de genes asociados a HLA-II que incluyen, no limitándose a, RFXANK, CIITA, RFX5 y RFXAP. No estaba claro, antes de esta invención, si las iPSC deficientes en el complejo HLA o alteradas tienen la capacidad de entrar en el desarrollo, madurar y generar células diferenciadas funcionales mientras retienen la actividad modulada. Además, no estaba claro, antes de esta invención, si las células diferenciadas deficientes en el complejo HLA pueden reprogramarse a iPSC y mantenerse como células madre pluripotentes mientras que tienen la deficiencia del complejo HLA. Los fallos no anticipados durante la reprogramación celular, el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación pueden relacionarse con aspectos que incluyen, pero no se limitan a, la expresión génica específica de la etapa de desarrollo o la falta de la misma, los requisitos para la presentación del complejo HLA, la eliminación de proteínas de las modalidades de expresión de superficies introducidas, necesitan una reprogramación clonal adecuada y eficiente, y necesitan una reconfiguración de los protocolos de diferenciación.

“iPSC deficiente en HLA modificada”, como se usa en el presente documento, se refiere a iPSC deficiente en HLA que se modifica adicionalmente mediante la introducción de genes que expresan proteínas relacionadas pero no limitadas a potencial de diferenciación mejorado, direccionamiento de antígeno, presentación de antígeno, reconocimiento de anticuerpos, persistencia, evasión inmunitaria, resistencia a la supresión, proliferación, coestimulación, estimulación de citocinas, producción de citocinas (autocrina o paracrina), quimiotaxis y citotoxicidad celular, tales como proteínas de HLA de clase I no clásicas (por ejemplo, HLA-E y HLA-G), receptor quimérico para el antígeno (CAR), receptor de linfocitos T (TCR), Receptor Fc CD16, BCL11b, NOTCH, RUNX1, IL15, 41BB, DAP10, DAP12, CD24, CD3z, 41BBL, CD47, CD113 y PDL1. Las células que son “deficientes en HLA modificado” también incluyen células distintas de iPSC.

Los “receptores Fc”, abreviado FcR, se clasifican basándose en el tipo de anticuerpo que reconocen. Por ejemplo, aquellos que se unen a la clase más común de anticuerpo, IgG, se denominan receptores Fc-gamma (FcγR), aquellos que se unen a IgA se denominan receptores Fc-alfa (FcαR) y aquellos que se unen a IgE se denominan

receptores de Fc-epsilon (FcεR). Las clases de FcR también se distinguen por las células que las expresan (macrófagos, granulocitos, células citolíticas naturales, linfocitos T y B) y las propiedades de señalización de cada receptor. Los receptores Fc-gamma (FcγR) incluyen varios miembros, FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIIA (CD16a), FcγRIIIB (CD16b), que difieren en sus afinidades de anticuerpos debido a su diferente estructura molecular

CD16 se ha identificado como dos isoformas, los receptores Fc FcγRIIIa (CD16a) y FcγRIIb (CD16b). CD16a es una proteína transmembrana expresada por células NK, que une IgG monomérica unida a células diana para activar las células NK y facilitar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). “CD16 de alta afinidad”, “CD16 no escindible” o “CD16 no escindible de alta afinidad”, como se usa en el presente documento, se refiere a una variante de CD16. El CD16 de tipo silvestre tiene baja afinidad y está sujeto al desprendimiento del extodominio, un proceso de escisión proteolítica que regula la densidad superficial de las células de varias moléculas de superficie celular en leucocitos tras la activación de células NK. F176 V y F158 V son variantes de CD16 ilustrativas que tienen alta afinidad; mientras que la variante S197P es un ejemplo de la versión no escindible de CD 16.

I. Métodos para la edición del genoma dirigida en el locus seleccionado en células iPSC

La edición del genoma, o edición genómica, o edición genética, como se usa indistintamente en el presente documento, es un tipo de modificación por ingeniería genética en donde el ADN se inserta, se elimina y/o se reemplaza en el genoma de una célula diana. La edición del genoma dirigida (intercambiable con “edición genómica dirigida” o “edición genética dirigida”) permite la inserción, delección y/o sustitución en sitios preseleccionados en el genoma. Cuando una secuencia endógena se elimina en el sitio de inserción durante la edición dirigida, un gen endógeno que comprende la secuencia afectada puede inactivarse o atenuarse debido a la delección de secuencia. Por lo tanto, la edición dirigida también puede usarse para alterar la expresión génica endógena. De manera similar se usa en el presente documento la expresión “integración dirigida”, que se refiere a un proceso que implica la inserción de una o más secuencias exógenas, con o sin delección de una secuencia endógena en el sitio de inserción. En comparación, los genes integrados aleatoriamente están sujetos a efectos de posición y silenciamiento, lo que hace que su expresión sea no fiable e impredecible. Por ejemplo, los centrómeros y las regiones subteloméricas son particularmente propensos al silenciamiento transgénico. Actualmente, los genes recién integrados pueden afectar a los genes endógenos circundantes y la cromatina, alterando potencialmente el comportamiento celular o favoreciendo la transformación celular. Por lo tanto, la inserción del ADN exógeno en un locus preseleccionado tal como un locus de puerto seguro, o un puerto genómico seguro (GSH) es importante para la seguridad, la eficiencia, el control del número de copias y para el control fiable de la respuesta génica.

La edición dirigida puede lograrse a través de un enfoque independiente de nucleasas, o a través de un enfoque dependiente de nucleasas. En el enfoque de edición dirigida independiente de nucleasa, la recombinación homóloga está guiada por secuencias homólogas que flanquean un polinucleótido exógeno a insertar, a través de la maquinaria enzimática de la célula hospedadora.

Alternativamente, la edición dirigida podría lograrse con una frecuencia más alta mediante la introducción específica de rupturas bicatenarias (DSB, por sus siglas en inglés) mediante endonucleasas de corte raro específicas. Dicha edición dirigida dependiente de nucleasa usa mecanismos de reparación de ADN que incluyen unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés), que se produce en respuesta a DSB. Sin un vector donador que contenga material genético exógeno, la NHEJ a menudo conduce a inserciones (in/dels) aleatorias de un pequeño número de nucleótidos endógenos. En comparación, cuando un vector donador que contiene material genético exógeno flanqueado por un par de brazos de homología está presente, el material genético exógeno puede introducirse en el genoma durante la reparación dirigida por homología (HDR) mediante recombinación homóloga, lo que da como resultado una “integración dirigida”.

Las endonucleasas disponibles capaces de introducir DSB específica y dirigida incluyen, pero no se limitan a, nucleasas de dedos de cinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), nucleasa CRISPR-Cas9 guiada por ARN (CRISPR/Cas9; repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas asociadas 9). Además, el sistema DICE (intercambio de casete de integrasa doble) que usa integrasas phiC31 y Bxb1 también es una herramienta prometedora para la integración dirigida.

Las ZFN son nucleasas dirigidas que comprenden una nucleasa fusionada a un dominio de unión a ADN de dedos de cinc. Por “dominio de unión a ADN de dedos de cinc” o “ZFBD” se entiende un dominio polipeptídico que se une al ADN de una manera específica de secuencia a través de uno o más dedos de cinc. Un dedo de cinc es un dominio de aproximadamente 30 aminoácidos dentro del dominio de unión a dedos de cinc cuya estructura se estabiliza mediante la coordinación de un ion de cinc. Los ejemplos de dedos de cinc incluyen, pero no se limitan a, dedos de cinc C₂H₂, dedos de cinc C₃H y dedos de cinc C₄. Un dominio de dedo de cinc “diseñado” es un dominio que no es de origen natural cuyo diseño/composición resulta principalmente de criterios racionales, por ejemplo, aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computarizados para procesar información en una base de datos que almacena información de diseños de ZFP existentes y datos de unión. Véanse, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. N.º 6.140.081; 6.453.242; y 6.534.261; véase también el documento WO 98/53058; el documento WO 98/53059; el documento WO 98/53060; el documento WO 02/016536 y el documento WO 03/016496. Un dominio de dedo de

cinc “seleccionado” es un dominio no encontrado en la naturaleza cuya producción resulta principalmente de un proceso empírico tal como visualización en fagos, trampa de interacción o selección híbrida. Los ZFN se describen con mayor detalle en la Pat. de EE.UU. N.º 7.888.121 y Pat. de EE.UU. N.º 7.972.854. El ejemplo más reconocido de un ZFN en la técnica es una fusión de la nucleasaFokI con un dominio de unión a ADN de dedos de cinc.

Una TALEN es una nucleasa dirigida que comprende una nucleasa fusionada a un dominio de unión a ADN efector de TAL. Por “dominio de unión al ADN efector de tipo activador de la transcripción”, “dominio de unión a ADN efector TAL” o “dominio de unión a ADN TALE” se entiende el dominio polipeptídico de proteínas efectoras TAL que es responsable de la unión de la proteína efectora TAL al ADN. Las proteínas efectoras TAL son secretadas por patógenos de plantas del género *Xanthomonas* durante la infección. Estas proteínas entran en el núcleo de la célula vegetal, se unen a secuencias de ADN específicas de efector a través de su dominio de unión a ADN y activan la transcripción génica en estas secuencias a través de sus dominios de transactivación. La especificidad del dominio de unión al ADN efectora TAL depende de un número variable de efector de repeticiones imperfectas de 34 aminoácidos, que comprenden polimorfismos en posiciones de repetición seleccionadas llamadas restos variables de repetición (RVD). Las TALEN se describen con mayor detalle en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2011/0145940. El ejemplo más reconocido de una TALEN en la técnica es un polipéptido de fusión de la nucleasaFokI con un dominio de unión a ADN efector TAL.

Otro ejemplo de una nucleasa dirigida que encuentra uso en los métodos objeto es una nucleasa Spo11 dirigida, un polipéptido que comprende un polipéptido Spo11 que tiene actividad nucleasa fusionado a un dominio de unión a ADN, por ejemplo un dominio de unión a ADN de dedos de cinc, un dominio de unión a ADN efector TAL, etc. que tiene especificidad por una secuencia de ADN de interés. Véase, por ejemplo, la Solicitud de EE.UU. N.º 61/555.857.

Los ejemplos adicionales de nucleasas marcadas como diana adecuadas para la presente invención incluyen, pero no se limitan a Bxb1, phiC31, R4, PhiBT1 y Wβ/SPBc/TP901-1, ya sean usadas individualmente o en combinación.

Otros ejemplos no limitantes de nucleasas dirigidas incluyen nucleasas de origen natural y recombinante, por ejemplo CRISPR/Caspasa9, endonucleasas de restricción, meganucleasas dirigidas a endonucleasas y similares.

CRISPR/Caspasa-9 requiere dos componentes principales: (1) una endonucleasa Caspasa-9 (Cas9) y (2) el complejo ARNcr-ARNtracr. Cuando se coexpresan, los dos componentes forman un complejo que se recluta en una secuencia de ADN diana que comprende PAM y una región de siembra cerca de PAM. El ARNcr y el ARNtracr pueden combinarse para formar un ARN guía quimérico (ARNg) para guiar la Casp9 a secuencias seleccionadas como diana. Estos dos componentes pueden administrarse a células de mamífero mediante transfección o transducción.

La inserción mediada por DICE usa un par de recombinasas, por ejemplo, phiC31 y Bxb1, para proporcionar una integración unidireccional de un ADN exógeno que está estrechamente restringida a los pequeños sitios de reconocimiento attB y attP propios de cada enzima. Debido a que estos sitios de att diana no están presentes de forma natural en genomas de mamíferos, deben introducirse primero en el genoma, en el sitio de integración deseado. Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de EE.UU. N.º 2015/0140665.

Los métodos según la invención actualmente reivindicada pueden usar una construcción que comprende uno o más polinucleótidos exógenos para integración genómica dirigida. En un ejemplo que puede asociarse con los métodos de la invención reivindicada, la construcción comprende además un par de brazo homólogo específico para un sitio de integración deseado, y el método de integración dirigida comprende introducir la construcción en células para permitir la recombinación homóloga específica del sitio por la maquinaria enzimática del hospedador celular. En otra realización de los métodos de la invención reivindicada, el método de integración dirigida en una célula comprende introducir una construcción que comprende uno o más polinucleótidos exógenos a la célula, e introducir un casete de expresión de ZFN que comprende un dominio de unión a ADN específico para un sitio de integración deseado a la célula para permitir una inserción mediada por ZFN. En todavía otra realización de los métodos de la invención reivindicada, el método de integración dirigida en una célula comprende introducir una construcción que comprende uno o más polinucleótidos exógenos a la célula, e introducir un casete de expresión de TALEN que comprende un dominio de unión a ADN específico para un sitio de integración deseado a la célula para permitir una inserción mediada por TALEN. En otra realización de los métodos de la invención reivindicada, el método de integración dirigida en una célula comprende introducir una construcción que comprende uno o más polinucleótidos exógenos a la célula, introducir un casete de expresión de Cas9 y un ARNg que comprende una secuencia guía específico para un sitio de integración deseado a la célula para permitir una inserción mediada por Cas9. En otra realización más de los métodos de la invención reivindicada, el método de integración dirigida en una célula comprende introducir una construcción que comprende uno o más sitios att de un par de recombinasas DICE a un sitio de integración deseado en la célula, introduciendo una construcción que comprende uno o más polinucleótidos exógenos a la célula, e introducir un casete de expresión para recombinasas DICE, para permitir la integración dirigida mediada por DICE.

Los sitios prometedores para la integración dirigida incluyen, pero no se limitan a, loci de puertos seguros, o puerto genómico seguro (GSH), que son regiones intragénicas o extragénicas del genoma humano que, teóricamente, son capaces de acomodar una expresión predecible de ADN recién integrado sin efectos adversos en la célula u

organismo hospedadores. Un puerto seguro útil debe permitir una expresión transgénica suficiente para producir los niveles deseados de la proteína codificada por vector o ARN no codificante. Un puerto seguro también debe no predisponer las células a la transformación maligna ni alterar las funciones celulares. Para un sitio de integración para ser un locus potencial de sitio seguro, idealmente necesita cumplir con los criterios que incluyen, pero no se limitan a: ausencia de alteración de elementos reguladores o genes, según lo juzgado por la anotación de secuencias; es una región intergénica en un área densa de genes, o una ubicación en la convergencia entre dos genes transcritos en direcciones opuestas; mantiene la distancia para minimizar la posibilidad de interacciones de largo alcance entre los activadores transcripcionales codificados por vectores y los promotores de genes adyacentes, particularmente genes de microARN relacionados con el cáncer; y tiene una actividad transcripcional aparentemente ubicua, como se refleja en los patrones de expresión de la etiqueta de secuencia espacial y temporal amplia (EST), lo que indica actividad transcripcional ubicua. Esta última característica es especialmente importante en las células madre, donde durante la diferenciación, la remodelación de la cromatina normalmente conduce al silenciamiento de algunos loci y la potencial activación de otros. Dentro de la región adecuada para la inserción exógena, un locus preciso elegido para la inserción debe estar desprovisto de elementos repetitivos y secuencias conservadas y a los que se podrían diseñar fácilmente cebadores para la amplificación de los brazos de homología.

Los sitios adecuados para la edición del genoma humano, o específicamente, la integración dirigida, incluyen, pero no se limitan al sitio de virus adenoasociado 1 (AAVS1), el locus del gen del receptor 5 (motivo CC) de quimiocina (CCR5) y el ortólogo humano del locus ROSA26 de ratón. Adicionalmente, el ortólogo humano del locus H11 de ratón también puede ser un sitio adecuado para la inserción mediante el uso de la composición y el método de integración dirigida desvelado en la presente descripción. Además, los loci del gen de colágeno y HTRP también pueden usarse como un alojamiento seguro para la integración dirigida. Sin embargo, se ha demostrado que la validación de cada sitio seleccionado es necesaria especialmente en células madre para eventos de integración específicos, y la optimización de la estrategia de inserción que incluye la elección del promotor, la secuencia y la disposición del gen exógeno, y a menudo se necesita el diseño de la construcción.

Para in/dels marcados como diana, el sitio de edición a menudo está comprendido en un gen endógeno cuya expresión y/o función pretende alterarse. En realizaciones, el gen endógeno que comprende un in/del marcado como diana se asocia a la regulación y la modulación de la respuesta inmunitaria.

Un método de integración dirigida en un locus seleccionado, en el caso de la invención reivindicada, incluye al menos integración en una región constante de TCR alfa. En algunas realizaciones, los métodos reivindicados para la integración dirigida incluyen además integraciones en un puerto seguro del genoma o un locus preseleccionado conocido o demostrado que es seguro y bien regulado para la expresión génica continua o temporal, tal como el locus B2M, TAP1, TAP2 o tapasina como se proporciona en el presente documento. En una realización de los métodos de la invención reivindicada, el método de integración dirigida en una célula que comprende introducir una construcción que comprende uno o más polinucleótidos exógenos a la célula, e introducir una construcción que comprende un par de brazo homólogo específico para un sitio de integración deseado y una o más secuencias exógenas, para permitir la recombinación homóloga específica del sitio por la maquinaria enzimática del hospedador celular, en donde el sitio de integración deseado comprende una región constante de TCR alfa.

En otra realización de los métodos de la invención reivindicada, el método de integración dirigida en una célula comprende introducir una construcción que comprende uno o más polinucleótidos exógenos a la célula, e introducir un casete de expresión de ZFN que comprende un dominio de unión a ADN específico para un sitio de integración deseado a la célula para permitir una inserción mediada por ZFN, en donde el sitio de integración deseado comprende una región constante de TCR alfa. En todavía otra realización de los métodos de la invención reivindicada, el método de integración dirigida en una célula comprende introducir una construcción que comprende uno o más polinucleótidos exógenos a la célula, e introducir un casete de expresión de TALEN que comprende un dominio de unión a ADN específico para un sitio de integración deseado a la célula para permitir una inserción mediada por TALEN, en donde el sitio de integración deseado comprende una región constante de TCR alfa. En otra realización de los métodos de la invención reivindicada, el método de integración dirigida en una célula comprende introducir una construcción que comprende uno o más polinucleótidos exógenos a la célula, introducir un casete de expresión de Cas9 y un ARNg que comprende una secuencia guía específico para un sitio de integración deseado a la célula para permitir una inserción mediada por Cas9, en donde el sitio de integración deseado comprende una región constante de TCR alfa. En otra realización más de los métodos de la invención reivindicada, el método de integración dirigida en una célula comprende introducir una construcción que comprende uno o más sitios att de un par de recombinasas DICE a un sitio de integración deseado en la célula, introduciendo una construcción que comprende uno o más polinucleótidos exógenos a la célula, e introducir un casete de expresión para recombinasas DICE, para permitir la integración dirigida mediada por DICE, en donde el sitio de integración deseado comprende una región constante de TCR alfa.

Los polinucleótidos exógenos integrados por los métodos de la invención reivindicada incluyen polinucleótidos dirigidos por promotores endógenos en el genoma del hospedador, en el sitio de integración, que en el caso de la invención reivindicada incluye un promotor de TCR endógeno de una región constante de TCR alfa. Teóricamente, solo las inserciones correctas en la ubicación deseada permitirían la expresión génica de un gen exógeno accionado por un promotor endógeno.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, el uno o más polinucleótidos exógenos comprendidos en la construcción para los métodos de integración dirigida están impulsados por un promotor. En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, la construcción comprende una o más secuencias enlazadoras entre dos polinucleótidos adyacentes impulsados por el mismo promotor para proporcionar una mayor separación física entre las fracciones y maximizar la accesibilidad a la maquinaria enzimática. El péptido enlazador de las secuencias enlazadoras puede consistir en aminoácidos seleccionados para hacer la separación física entre los restos (polinucleótidos exógenos y/o la proteína o péptido codificado a partir de los mismos) más flexible o más rígido dependiendo de la función relevante. La secuencia enlazadora puede ser escindible por una proteasa o escindible químicamente para producir fracciones separadas. Los ejemplos de sitios de escisión enzimática en el enlazador incluyen sitios para la escisión por una enzima proteolítica, tal como enteroquinasa, Factor Xa, tripsina, colagenasa y trombina. En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, la proteasa es una que se produce de forma natural por el hospedador o se introduce exógenamente. Alternativamente, el sitio de escisión en el enlazador puede ser un sitio capaz de escindirse tras la exposición a un producto químico seleccionado, por ejemplo, bromuro de cianógeno, hidroxilamina o pH bajo. La secuencia enlazadora opcional puede servir para un fin distinto de la provisión de un sitio de escisión. La secuencia enlazadora debe permitir un posicionamiento eficaz de la fracción con respecto a otro resto adyacente para que las fracciones funcionen correctamente. El enlazador también puede ser una secuencia de aminoácidos sencilla de una longitud suficiente para evitar cualquier impedimento estérico entre las fracciones. Además, la secuencia enlazadora puede proporcionar una modificación postraduccional que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, sitios de fosforilación, sitios de biotilación, sitios de sulfatación, sitios de γ -carboxilación y similares. En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, la secuencia enlazadora es flexible para no mantener el péptido biológicamente activo en una única conformación no deseada. El enlazador puede comprender predominantemente aminoácidos con cadenas laterales pequeñas, tales como glicina, alanina y serina, para proporcionar flexibilidad. En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, aproximadamente el 80 o el 90 por ciento o más de la secuencia enlazadora comprende restos de glicina, alanina o serina, particularmente restos de glicina y serina. En varias realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, un péptido enlazador G4S separa el procesamiento final y los dominios de endonucleasa de la proteína de fusión. En otras realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, una secuencia enlazadora 2A permite producir dos proteínas separadas a partir de una sola traducción. Las secuencias enlazadoras adecuadas pueden identificarse fácilmente de forma empírica. Adicionalmente, el tamaño y las secuencias adecuadas de las secuencias enlazadoras también pueden determinarse mediante técnicas convencionales de modelado por ordenador. En una realización de los métodos de la invención reivindicada, la secuencia enlazadora codifica un péptido autoescindible. En una realización de los métodos de la invención reivindicada, el péptido de autoescisión es 2A. En algunas otras realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, la secuencia enlazadora proporciona una secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES). En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, cualquiera de las dos secuencias enlazadoras consecutivas es diferente.

El método de introducción en células una construcción que comprende polinucleótidos exógenos para integración dirigida puede lograrse usando un método de transferencia de genes a células conocidas en sí mismas. En una realización de los métodos de la invención reivindicada, la construcción comprende cadenas principales de vectores víricos tales como vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado, vector de retrovirus, vector de lentivirus, vector de virus Sendai. En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, los vectores plasmídicos se usan para suministrar y/o expresar los polinucleótidos exógenos a células diana (por ejemplo, pAI-11, pXTI, pRc/CMV, pRc/VRS, pcDNAI/Neo) y similares. En algunas otras realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, el vector episómico se usa para suministrar el polinucleótido exógeno a las células diana. En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, los virus adenoasociados recombinantes (rAAV) pueden usarse para la ingeniería genética para introducir inserciones, delecciones o sustituciones a través de recombinaciones homólogas. A diferencia de los lentivirus, los rAAV no se integran en el genoma hospedador. Además, los vectores de rAAV episómicos median el direccionamiento del gen dirigido a la homología a tasas mucho mayores en comparación con la transfección de plásmidos de direccionamiento convencionales. En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, se usa un vector AAV6 o AAV2 para introducir inserciones, delecciones o sustituciones en un sitio diana en el genoma de las iPSC.

II. Método para obtener y mantener iPSC modificadas genómicamente

La presente invención proporciona un método para obtener y mantener las iPSC modificadas genómicamente que comprenden una o más ediciones dirigidas en uno o más sitios deseados, en donde un TCR se inactiva mediante la interrupción de un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa y en donde uno o más CAR se inactivan en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa, en donde la edición dirigida permanece intacta y funcional en iPSC modificadas genómicamente expandidas o las células no pluripotentes derivadas de iPSC en el sitio de edición seleccionado respectivo.

En realizaciones particulares, las iPSC modificadas genómicamente que comprenden una o más ediciones dirigidas en uno o más sitios seleccionados se mantienen, se pasan y se expanden como células individuales durante un período prolongado en el medio de cultivo celular que se muestra en la Tabla 1 como Medio de Mantenimiento Fate

(FMM), en donde las iPSC conservan la edición dirigida y la modificación funcional en el sitio o sitios seleccionados. Los componentes del medio pueden estar presentes en el medio en cantidades dentro de un intervalo óptimo mostrado en la Tabla 1. Se ha demostrado que las iPSC cultivadas en FMM continúan manteniendo su perfil indiferenciado y fundamental o virgen; estabilidad genómica sin la necesidad de una limpieza o selección de cultivo; y dan lugar fácilmente a los tres linajes somáticos, diferenciación *in vitro* a través de cuerpos embrioides o monocapa (sin formación de cuerpos embrioides); y diferenciación *in vivo* mediante formación de teratoma. Véase, por ejemplo, la Solicitud de EE.UU. N.º 61/947.979.

Medio hESC convencional (Conv.)	Medio de reprogramación Fate (FRM)	Medio de mantenimiento Fate (FMM)
DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12
Suero de inactivación	Suero de inactivación	Suero de inactivación
	N2	
	B27	
Glutamina	Glutamina	Glutamina (1x)
Aminoácidos no esenciales	Aminoácidos no esenciales	Aminoácidos no esenciales
β -mercaptoetanol	β -mercaptoetanol	β -mercaptoetanol
bFGF (0,2-50 ng/ml)	bFGF (2-500 ng/ml)	bFGF (2-500 ng/ml)
	LIF (0,2-50 ng/ml)	LIF (0,2-50 ng/ml)
	Tiazovivina (0,1-25 μ M)	Tiazovivina (0,1-25 μ M)
	PD0325901 (0,005-2 μ M)	PD0325901 (0,005-2 μ M)
	CHIR99021 (0,02-5 μ M)	CHIR99021 (0,02-5 μ M)
	SB431542 (0,04-10 μ M)	
En combinación con MEF	Sin alimentadoras, en combinación con Matrigel™ o Vitronectina	

En algunas realizaciones, las iPSC modificadas genómicamente que comprenden una o más integraciones dirigidas y/o in/dels se mantienen, se pasan y se expanden en un medio que comprende MEK, GSK y ROCKi, y libres de, o esencialmente libres de, inhibidores de receptor de TGF β /ALK5, en donde las iPSC conservan la edición dirigida intacta y funcional en los sitios seleccionados.

En algunas realizaciones, la iPSC modificada genómicamente comprende uno o más polinucleótidos exógenos que comprenden además in/dels en uno o más genes endógenos, que incluyen al menos una región constante de TCR alfa en el contexto de la invención reivindicada. En algunas realizaciones, la in/del comprendida en un gen endógeno da como resultado la interrupción de la expresión génica. En algunas realizaciones, la in/del comprendida en un gen endógeno da como resultado la inactivación del gen editado. La invención actualmente reivindicada abarca iPSC que comprenden una in/del en uno o más genes endógenos adicionales, tales como una o más in/dels que hacen a las células deficientes en HLA de clase I y/o de clase II. En alguna realización, la in/del comprendida en un gen endógeno da como resultado la atenuación del gen editado. En algunas realizaciones, la iPSC modificada genómicamente que comprende uno o más polinucleótidos exógenos en un sitio o sitios seleccionados puede comprender además una o más ediciones dirigidas que incluyen in/dels en sitio o sitios seleccionados. En algunas realizaciones, la in/del está comprendida en uno o más genes supresores endógenos de MHC de clase I. En algunas realizaciones, la in/del está comprendida en uno o más genes endógenos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad. En algunas realizaciones, la in/del está comprendida en uno o más genes endógenos que incluyen, pero no se limitan a, B2M, PD1, TAP1, TAP2, Tapasina, genes de TCR. En una realización, la iPSC modificada genómicamente que comprende uno o más polinucleótidos exógenos en un sitio o sitios seleccionados comprende además una edición dirigida en el gen que codifica B2M (beta-2-microglobulina).

Otro aspecto de la invención proporciona un método para generar iPSC modificadas genómicamente mediante la edición dirigida de iPSC que han sido reprogramadas a partir de linfocitos T para inactivar un TCR mediante la interrupción de un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa y para insertar un polinucleótido que codifica al menos un receptor quimérico para el antígeno (CAR) en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa; o mediante la generación primero de linfocitos T modificados genómicamente por edición dirigida para inactivar un TCR mediante la interrupción de un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa y para insertar un polinucleótido que codifica al menos un receptor quimérico para el antígeno (CAR) en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa, y después reprogramar los linfocitos T modificados genómicamente seleccionados/aislados para obtener iPSC que comprenden la misma edición dirigida que las células no pluripotentes.

En algunas realizaciones, la reprogramación se inicia poniendo en contacto los linfocitos T con al menos un factor de reprogramación y opcionalmente una combinación de un inhibidor de receptor de TGF β /inhibidor de ALK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK3 y un inhibidor de ROCK (FRM; Tabla 1). En algunas realizaciones, las iPSC modificadas genómicamente a través de cualquier método anterior se mantienen y se expanden adicionalmente usando una mezcla que comprende una combinación de un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK3 y un inhibidor de ROCK (FMM; Tabla 1).

En algunas realizaciones del método de generación de iPSC modificadas genómicamente, el método comprende: modificar mediante ingeniería genómica una iPSC que ha sido reprogramada de un linfocito T mediante la introducción de una o más de integración dirigida y/o in/dels en iPSC para obtener iPSC modificadas genómicamente en las cuales el TCR está inactivado mediante la interrupción de un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa, en el cual un polinucleótido que codifica al menos un receptor quimérico para el antígeno (CAR) en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa se inserta, y en el cual el polinucleótido que codifica el al menos un CAR se expresa bajo el control de un promotor de TCR endógeno de la región constante de TCR alfa. Alternativamente, el método de generación de iPSC por ingeniería genómica comprende: (a) introducir una o más ediciones dirigidas en linfocitos T para obtener linfocitos T modificados genómicamente que comprenden integración dirigida y/o in/dels en sitios seleccionados, en los cuales el TCR se inactiva mediante la interrupción de un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa, en el cual un polinucleótido que codifica al menos un receptor quimérico para el antígeno (CAR) en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa se inserta, y en el cual el polinucleótido que codifica el al menos un CAR se expresa bajo el control de un promotor de TCR endógeno de la región constante de TCR alfa, y (b) poner en contacto los linfocitos T modificados genómicamente con uno o más factores de reprogramación, y opcionalmente una composición de molécula pequeña que comprende un receptor de TGF β /inhibidor de ALK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK3 y/o un inhibidor de ROCK, para obtener iPSC modificadas genómicamente que comprenden integración dirigida y/o in/dels en sitios seleccionados.

Los factores de reprogramación se seleccionan del grupo que consiste en OCT4, SOX2, NANOG, KLF4, LIN28, C-MYC, ECAT1, UTF1, ESRRB, SV40LT, HESRG, CDH1, TDGF1, DPPA4, DNMT3B, ZIC3, L1TD1 y cualquier combinación de los mismos. El uno o más factores de reprogramación pueden estar en forma de polipéptido. Los factores de reprogramación también pueden estar en forma de polinucleótidos y, por lo tanto, se introducen en las células no pluripotentes mediante vectores tales como, un retrovirus, un virus Sendai, un adenovirus, un episoma y un minicirculo. En realizaciones particulares, el uno o más polinucleótidos que codifican al menos un factor de reprogramación se introducen mediante un vector lentivírico. En algunas realizaciones, el uno o más polinucleótidos se introducen mediante un vector episómico. En diversas otras realizaciones, el uno o más polinucleótidos se introducen mediante un vector vírico Sendai.

En algunas realizaciones, los linfocitos T se transfieren con múltiples construcciones que comprenden diferentes polinucleótidos exógenos y/o diferentes promotores mediante múltiples vectores para la integración dirigida en el mismo o diferentes sitios seleccionados, con la condición en el caso de la invención reivindicada, que el linfocito T esté modificado genómicamente para inactivar un TCR mediante la interrupción de un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa, en el cual un polinucleótido que codifica al menos un receptor quimérico para el antígeno (CAR) en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa se inserta, y en el cual el polinucleótido que codifica el al menos un CAR se expresa bajo el control de un promotor de TCR endógeno de la región constante de TCR alfa. Estos polinucleótidos exógenos también pueden comprender un gen suicida, o un gen que codifica la modalidad de direccionamiento, receptores, moléculas de señalización, factores de transcripción, proteínas y péptidos farmacéuticamente activos, candidatos a fármacos diana, o un gen que codifica una proteína que promueve injerto, tráfico, localización, viabilidad, autorrenovación, persistencia y/o supervivencia de las iPSC o células derivadas de las mismas. En algunas realizaciones, los polinucleótidos exógenos codifican ARN, incluyendo pero no limitado a, ARNip, ARNhc, miARN y ácidos nucleicos antisentido. Estos polinucleótidos exógenos pueden estar impulsados por uno o más promotores seleccionados del grupo que consiste en promotores constitutivos, promotores inducibles, promotores específicos temporales y promotores específicos de tipo tejido o célula. En consecuencia, los polinucleótidos son expresables cuando están en condiciones que activan el promotor, por ejemplo, en presencia de un agente inductor o en un tipo de célula diferenciada particular. En algunas realizaciones, los polinucleótidos se expresan en iPSC y/o en células diferenciadas de las iPSC. En una realización, uno o más genes suicidas se accionan por un promotor constitutivo, por ejemplo, Caspasa-9 impulsado por CAG.

En algunas realizaciones, los linfocitos T se introducen con una o más in/dels en sitios seleccionados que incluyen uno o más genes endógenos y, en el caso de la invención reivindicada actualmente, que incluyen al menos una alteración de un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa, y la inactivación de un polinucleótido que codifica al menos un CAR en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa; en el cual el polinucleótido que codifica el al menos un CAR se expresa bajo el control de un promotor de TCR endógeno de la región constante de TCR alfa. En algunas realizaciones, los linfocitos T que comprenden una o más in/dels comprenden además una o más integraciones dirigidas descritas anteriormente. En algunas realizaciones, la in/del comprendida en un gen endógeno da como resultado la interrupción de la expresión génica. En algunas realizaciones, la in/del comprendida en un gen endógeno da como resultado la inactivación del gen editado. En alguna realización, la in/del comprendida en un gen endógeno da como resultado la atenuación del gen editado. En algunas realizaciones, la iPSC modificada genómicamente que comprende uno o más polinucleótidos exógenos en un sitio o sitios seleccionados puede comprender además una o más ediciones dirigidas que incluyen in/dels en sitio o sitios seleccionados. En algunas realizaciones, la in/del está comprendida en uno o más genes endógenos asociados a la regulación y la mediación de la respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la in/del está comprendida en uno o más genes supresores endógenos de MHC de clase I. En algunas realizaciones, la in/del está comprendida en uno o más genes endógenos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad. En algunas realizaciones, la in/del está

comprendida en uno o más genes endógenos que incluyen, pero no se limitan a, genes B2M, PD1, TAP1, TAP2, Tapasina. En una realización, la iPSC modificada genómicamente que comprende uno o más polinucleótidos exógenos en un sitio o sitios seleccionados comprende además una edición dirigida en el gen que codifica B2M (beta-2-microglobulina).

5 III. Un método para obtener células no pluripotentes genéticamente modificadas mediante la diferenciación de iPSC modificadas genómicamente

10 En realizaciones particulares, las iPSC modificadas genómicamente que comprenden una o más ediciones dirigidas en sitio o sitios seleccionados como se define por la invención reivindicada se usan para derivar linajes celulares hematopoyéticos *in vitro*, en donde las células no pluripotentes derivadas retienen la edición diana funcional en el sitio o sitios seleccionados como se define por la invención reivindicada. En una realización, las células que se derivan de iPSC modificadas genómicamente incluyen, pero no se limitan a, células mesodérmicas con potencial de endotelio hemogénico definitivo (HE), HE definitivas, células hematopoyéticas CD34, células madre y progenitoras hematopoyéticas, progenitores hematopoyéticos multipotenciales (MPP), progenitores de linfocitos T, progenitores de células NK, células mieloides, progenitores de neutrófilos, linfocitos T, células NKT, células NK y linfocitos B, en donde estas células derivadas de las iPSC modificadas genómicamente retienen la edición específica diana en el sitio o sitios deseados.

20 Los métodos y composiciones de diferenciación aplicables para obtener linajes celulares hematopoyéticos derivados de iPSC incluyen aquellos representados en, por ejemplo, la Solicitud Internacional N.º PCT/US2016/044122. Como se proporciona, los métodos y composiciones para generar linajes celulares hematopoyéticos son a través del endotelio hemogénico definitivo (HE) derivado de células madre pluripotentes, que incluyen hiPSC en condiciones libres de suero, libres de alimentadores y/o libres del estroma y en una plataforma de cultivo escalable y monocapa sin la necesidad de formación de EB. Las células que pueden diferenciarse según los métodos proporcionados varían de células madre pluripotentes, a células progenitoras que están comprometidas con una célula diferenciada terminalmente particular y células transdiferenciadas, células de diversos linajes pasan directamente a destino hematopoyético sin pasar a través de un intermedio pluripotente. De manera similar, las células producidas por diferenciación de células madre varían de células madre o progenitoras multipotentes a células madre diferenciadas terminalmente, y todos los linajes celulares hematopoyéticos intermedios.

35 Los métodos para diferenciar y expandir las células del linaje hematopoyético a partir de células madre pluripotentes en el cultivo en monocapa comprenden poner en contacto las células madre pluripotentes con un activador de la ruta de BMP y, opcionalmente, bFGF. Como se proporciona, las células mesodérmicas derivadas de células madre pluripotentes se obtienen y se expanden sin formar cuerpos embrioides a partir de células madre pluripotentes. A continuación, las células mesodérmicas se someten a contacto con un activador de la ruta de BMP, bFGF, y un activador de la ruta WNT para obtener células mesodérmicas expandidas que tienen potencial de endotelio hemogénico definitivo (HE) sin formar cuerpos embrioides a partir de las células madre pluripotentes. Por contacto posterior con bFGF y, opcionalmente, un inhibidor de ROCK, y/o un activador de la ruta WNT, las células mesodérmicas que tienen potencial de HE definitivo se diferencian en células HE definitivas, que también se expanden durante la diferenciación.

45 Los métodos proporcionados en el presente documento para obtener células del linaje hematopoyético son superiores a la diferenciación de células madre pluripotentes mediada por EB, porque la formación de EB conduce a una expansión celular moderada a mínima, no permite el cultivo monocapa que es importante para muchas aplicaciones que requieren una expansión homogénea y una diferenciación homogénea de las células en una población, y es laboriosa y de baja eficiencia.

50 La plataforma de diferenciación monocapa proporcionada facilita la diferenciación hacia endotelio hemogénico definitivo, lo que da como resultado la derivación de células madre hematopoyéticas y progenie diferenciada tal como linfocitos T, B, NKT y NK. La estrategia de diferenciación monocapa combina una eficacia de diferenciación mejorada con una expansión a gran escala permite la administración de un número terapéuticamente relevante de células hematopoyéticas derivadas de células madre pluripotentes para diversas aplicaciones terapéuticas. Además, el cultivo en monocapa mediante el uso de los métodos proporcionados en el presente documento conduce a células de linaje hematopoyético funcionales que permiten el intervalo completo de diferenciación *in vitro*, la modulación *ex vivo* y la autorrenovación, la reconstitución y el injerto hematopoyéticos a largo plazo. Como se proporciona, las células de linaje hematopoyético derivadas de iPSC incluyen, pero no se limitan a, endotelio hemogénico definitivo, células progenitoras multipotentes hematopoyéticas, células madre y progenitoras hematopoyéticas, progenitores de linfocitos T, progenitores de células NK, linfocitos T, células NK, células NKT, linfocitos B, macrófagos y neutrófilos.

60 El método para dirigir la diferenciación de células madre pluripotentes en células de un linaje hematopoyético definitivo, en donde el método comprende: (i) poner en contacto células madre pluripotentes con una composición que comprende un activador de BMP y, opcionalmente bFGF, para iniciar la diferenciación y expansión de células mesodérmicas a partir de las células madre pluripotentes; (ii) poner en contacto las células mesodérmicas con una composición que comprende un activador de BMP, bFGF, y un inhibidor de GSK3, en donde la composición está opcionalmente exenta de inhibidor del receptor de TGFβ/ALK, para iniciar la diferenciación y expansión de células

mesodérmicas que tienen potencial de EH definitivo a partir de las células mesodérmicas; (iii) poner en contacto las células mesodérmicas que tienen un potencial de EH definitivo con una composición que comprende un inhibidor de ROCK; uno o más factores de crecimiento y citocinas seleccionadas del grupo que consiste en bFGF, VEGF, SCF, IGF, EPO, IL6 e IL11; y opcionalmente, un activador de la ruta Wnt, en donde la composición está opcionalmente exenta de inhibidor del receptor de TGFβ/ALK, para iniciar la diferenciación y expansión del endotelio hemogénico definitivo a partir de células mesodérmicas derivadas de células madre pluripotentes que tienen potencial de endotelio hemogénico definitivo.

En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto células madre pluripotentes producidas mediante los métodos de la invención reivindicada con una composición que comprende un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK3 y un inhibidor de ROCK, en donde la composición está libre de inhibidores de receptor de TGFβ/ALK, para sembrar y expandir las células madre pluripotentes. En algunas realizaciones, las células madre pluripotentes son iPSC, o iPSC vírgenes, o iPSC que comprenden una o más improntas genéticas; y la una o más improntas genéticas comprendidas en las iPSC se retienen en las células hematopoyéticas diferenciadas a partir de las mismas. En algunas realizaciones del método para dirigir la diferenciación de células madre pluripotentes en células de un linaje hematopoyético, la diferenciación de las células madre pluripotentes en células de linaje hematopoyético está libre de generación de cuerpos embrioides y está en una forma de cultivo monocapa.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, las células de endotelio hemogénico definitivo derivadas de células madre pluripotentes obtenidas son CD34+. En algunas realizaciones, las células endoteliales hemogénicas definitivas obtenidas son CD34+CD43-. En algunas realizaciones, las células endoteliales hemogénicas definitivas son CD34+CD43-CXCR4-CD73-. En algunas realizaciones, las células endoteliales hemogénicas definitivas son CD34+ CXCR4-CD73-. En algunas realizaciones, las células endoteliales hemogénicas definitivas son CD34+CD43-CD93-. En algunas realizaciones, las células endoteliales hemogénicas definitivas son CD34+ CD93-.

En algunas realizaciones del método anterior, el método comprende además (i) poner en contacto endotelio hemogénico definitivo derivado de células madre pluripotentes con una composición que comprende un inhibidor de ROCK; uno o más factores de crecimiento y citocinas seleccionadas del grupo que consiste en VEGF, bFGF, SCF, Flt3L, TPO e IL7; y opcionalmente un activador de BMP; para iniciar la diferenciación del endotelio hemogénico definitivo a progenitores de células pre-T; y opcionalmente, (ii) poner en contacto los progenitores de células pre-T con una composición que comprende uno o más factores de crecimiento y citocinas seleccionadas del grupo que consiste en SCF, Flt3L e IL7, pero libre de uno o más de VEGF, bFGF, TPO, activadores de BMP e inhibidores de ROCK, para iniciar la diferenciación de los progenitores de las células pre-T a progenitores de linfocitos T o linfocitos T. En algunas realizaciones del método, los progenitores de linfocitos T derivados de células madre pluripotentes son CD34+CD45+CD7+. En algunas realizaciones del método, los progenitores de linfocitos T derivados de células madre pluripotentes son CD45+CD7+.

En algunas realizaciones más del método anterior para dirigir la diferenciación de células madre pluripotentes en células de un linaje hematopoyético, el método comprende además: (i) poner en contacto el endotelio hemogénico definitivo derivado de células madre pluripotentes con una composición que comprende un inhibidor de ROCK; uno o más factores de crecimiento y citocinas seleccionadas del grupo que consiste en VEGF, bFGF, SCF, Flt3L, TPO, IL3, IL7 e IL15; y opcionalmente, un activador de BMP, para iniciar la diferenciación del endotelio hemogénico definitivo a un precursor de células pre-NK; y opcionalmente, (ii) poner en contacto progenitores de células pre-NK derivados de células madre pluripotentes con una composición que comprende uno o más factores de crecimiento y citocinas seleccionadas del grupo que consiste en SCF, Flt3L, IL3, IL7 e IL15, en donde el medio está libre de uno o más de VEGF, bFGF, TPO, activadores de BMP e inhibidores de ROCK, para iniciar la diferenciación de los progenitores de células pre-NK a progenitores de células NK o células NK. En algunas realizaciones, los progenitores de células NK derivados de células madre pluripotentes son CD3-CD45+CD56+CD7+. En algunas realizaciones, las células NK derivadas de células madre pluripotentes son CD3-CD45+CD56+ y, opcionalmente, se definen además por NKp46+, CD57+ y CD16+.

Por lo tanto, mediante el uso de los métodos de diferenciación anteriores, uno puede obtener una o más poblaciones de células hematopoyéticas derivadas de iPSC (i) células CD34+ HE (iCD34), mediante el uso de uno o más medios de cultivo seleccionados de iMPP-A, iTC-A2, iTC-B2, iNK-A2, e iNK-B2; (ii) endotelio hemogénico definitivo (iHE), usando uno o más medios de cultivo seleccionados de iMPP-A, iTC-A2, iTC-B2, iNK-A2 e iNK-B2; (iii) HSC definitivas, usando uno o más medios de cultivo seleccionados de MPP-A, iTC-A2, iTC-B2, iNK-A2 e iNK-B2; (iv) células progenitoras multipotentes (iMPP), usando iMPP-A; (v) progenitores de linfocitos T (ipro-T), usando uno o más medios de cultivo seleccionados de iTC-A2 e iTC-B2; (vi) linfocitos T (ITC), usando iTC-B2; (vii) progenitores de células NK (ipro-NK), mediante el uso de uno o más medios de cultivo seleccionados de iNK-A2 e iNK-B2; y/o (viii) células NK (iNK) y iNK-B2. En algunas realizaciones, el medio:

a. iCD34-C comprende un inhibidor de ROCK, uno o más factores de crecimiento y citocinas seleccionados del grupo que consiste en bFGF, VEGF, SCF, IL6, IL11, IGF y EPO, y opcionalmente, un activador de la ruta Wnt; y está libre de receptor de TGFβ/inhibidor de ALK;

b. iMPP-A comprende un activador de BMP, un inhibidor de ROCK y uno o más factores de crecimiento y citocinas seleccionados del grupo que consiste en TPO, IL3, GMCSF, EPO, bFGF, VEGF, SCF, IL6, Flt3L e IL11;

c. iTC-A2 comprende un inhibidor de ROCK; uno o más factores de crecimiento y citocinas seleccionados del grupo que consiste en SCF, Flt3L, TPO e IL7; y, opcionalmente, un activador de BMP;

d. iTC-B2 comprende uno o más factores de crecimiento y citocinas seleccionadas del grupo que consiste en SCF, Flt3L e IL7; en donde la composición está libre de uno o más de VEGF, bFGF, activadores de BMP e inhibidores de ROCK;

e. iNK-A2 comprende un inhibidor de ROCK y uno o más factores de crecimiento y citocinas seleccionados del grupo que consiste en SCF, Flt3L, TPO, IL3, IL7 e IL15; y opcionalmente, un activador de BMP y

f. iNK-B2 comprende uno o más factores de crecimiento y citocinas seleccionadas del grupo que consiste en SCF, Flt3L, IL7 e IL15.

Adicionalmente, los métodos y las composiciones de desdiferenciación aplicables para obtener células hematopoyéticas modificadas genómicamente de un primer destino a células hematopoyéticas genómicamente modificadas de un segundo destino incluyen las representadas en, por ejemplo, la Publicación Internacional N.º WO 2011/159726. El método y la composición proporcionados en el mismo permiten reprogramar parcialmente una célula no pluripotente de partida a una célula intermedia no pluripotente al limitar la expresión del gen Nanog endógeno durante la reprogramación; y someter la célula intermedia no pluripotente a condiciones para diferenciar la célula intermedia en un tipo de célula deseado.

IV. Composiciones para la integración dirigida en loci seleccionados para incorporar genes de interés en células iPSC

Los métodos según la invención actualmente reivindicada pueden usar una construcción para la integración dirigida de uno o más polinucleótidos exógenos en un genoma de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) en un sitio seleccionado, con o sin delección de cualquier secuencia endógena en el sitio de integración. En una realización de los métodos de la invención reivindicada, la construcción se transfiere a iPSC mediante un vector para la integración dirigida. En otra realización de los métodos de la invención reivindicada, la construcción se transfiere a células no pluripotentes mediante un vector para la integración dirigida, y las células no pluripotentes se someten después a reprogramación para obtener iPSC modificadas genómicamente. Mediante cualquier enfoque, la construcción permanece integrada y los polinucleótidos exógenos son funcionales en iPSC que se obtienen de la reprogramación o la transferencia de vectores, en iPSC expandidas posteriormente, en células diferenciadas derivadas de las iPSC y en células desdiferenciadas derivadas de las mismas.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, la construcción que comprende polinucleótidos unidos operativamente comprende además componentes que permiten la integración dirigida en un locus de puerto seguro que comprende una región constante de TCR alfa

La presente invención también proporciona una iPSC modificada genómicamente que comprende uno o más polinucleótidos exógenos y/o in/dels en un sitio o sitios seleccionados, en los cuales un TCR se ha inactivado interrumpiendo un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa y en donde ha habido una inserción de un polinucleótido que codifica al menos un receptor quimérico para el antígeno (CAR) en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa. En algunas realizaciones, la iPSC modificada genómicamente se obtiene a través de transferencia de la construcción mediante un vector a iPSC y/o edición usando NHEJ. En algunas otras realizaciones, la iPSC modificada genómicamente se obtiene de la reprogramación de células no pluripotentes con edición dirigida que incluye integración dirigida y/o in/dels.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, la in/del comprendida en un gen endógeno da como resultado la interrupción de la expresión génica. En algunas realizaciones, la in/del comprendida en un gen endógeno da como resultado la inactivación del gen editado. En alguna realización, la in/del comprendida en un gen endógeno da como resultado la atenuación del gen editado. En algunas realizaciones, la iPSC modificada genómicamente que comprende uno o más polinucleótidos exógenos en un sitio o sitios seleccionados puede comprender además una o más ediciones dirigidas que incluyen in/dels en sitio o sitios seleccionados. En algunas realizaciones, la in/del está comprendida en uno o más genes endógenos asociados a la regulación y la mediación de la respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la in/del está comprendida en uno o más genes supresores endógenos de MHC de clase I. En algunas realizaciones, la in/del está comprendida en uno o más genes endógenos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad. En algunas realizaciones, la in/del está comprendida en uno o más genes endógenos que incluyen, pero no se limitan a, B2M, PD1, TAP1, TAP2, Tapasina, genes de TCR. En una realización, la iPSC modificada genómicamente que comprende uno o más polinucleótidos exógenos en un sitio o sitios seleccionados comprende además una edición dirigida en el gen que codifica B2M (beta-2-microglobulina). En una realización, la iPSC modificada genómicamente que comprende una edición dirigida en el gen B2M es B2M nulo o bajo, y deficiente en HLA-I.

Como se describe en el presente documento, la célula no pluripotente con múltiple edición dirigida de modalidades deseadas es adecuada para la reprogramación mediante el uso de la plataforma de cultivo en la Tabla 1 para obtener iPSC modificadas genómicamente derivadas.

La presente invención proporciona además células no pluripotentes derivadas de las iPSC modificadas genómicamente obtenidas mediante los métodos de la invención reivindicada, en donde las iPSC modificadas genómicamente se obtienen a través de la edición dirigida de iPSC o bien a través de células no pluripotentes modificadas genómicamente de la reprogramación que tienen integración específica del sitio o in/dels consecutivamente (obtener iPSC reprogramada primero y después realizar la modificación genómica; u obtener células no pluripotentes modificadas genómicamente primero y después realizar la reprogramación). En algunas realizaciones, las células no pluripotentes que derivan de iPSC modificadas genómicamente son células progenitoras o células completamente diferenciadas. En algunas realizaciones, las células derivadas de iPSC modificadas genómicamente son células mesodérmicas, células CD34, células de endotelio hemogénicas, células madre o progenitoras hematopoyéticas, células progenitoras multipotentes hematopoyéticas, progenitor de linfocitos T, progenitor de células NK, linfocitos T, células NKT, células NK o linfocitos B.

Los métodos según la invención reivindicada actualmente pueden usar una composición para obtener iPSC modificadas genómicamente. En un ejemplo que puede asociarse a los métodos de la invención reivindicada, la composición comprende linfocitos T modificados genómicamente; uno o más factores de reprogramación; y una composición de molécula pequeña que comprende un inhibidor de TGF β /inhibidor de ALK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK3 y/o un inhibidor de ROCK para reprogramar los linfocitos T modificados genómicamente a iPSC modificadas genómicamente que comprenden la misma edición dirigida. En algunas realizaciones de la composición anterior, los linfocitos T modificados genómicamente para la reprogramación comprenden un polinucleótido que codifica al menos un CAR en un ácido polinucleico que codifica una región constante de un TCR alfa, en donde el polinucleótido que codifica el al menos un CAR se expresa bajo el control de un promotor de TCR endógeno de la región constante de TCR alfa.

En algunas otras realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, la composición para obtener iPSC modificadas genómicamente comprende linfocitos T, uno o más factores de reprogramación; y una combinación de un inhibidor de TGF β /inhibidor de ALK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK3 y un inhibidor de ROCK y una o más construcciones que comprenden polinucleótidos unidos operativamente flanqueados por brazos de homología para integración dirigida. En algunas realizaciones de los métodos de la invención reivindicada, las diferentes construcciones y/o in/dels se introducen en los linfocitos T consecutivamente con los factores de reprogramación.

Las iPSC modificadas genómicamente obtenidas a partir de linfocitos T modificados genómicamente de reprogramación también se proporcionan en el presente documento pueden mantenerse en una composición. En un ejemplo que puede asociarse a los métodos de la invención reivindicada, la composición comprende iPSC modificadas genómicamente reprogramadas a partir de los linfocitos T modificados genómicamente mediante el uso de los métodos de la invención reivindicada; y una combinación de un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK3 y un inhibidor de ROCK. En una realización de los métodos de la invención reivindicada, las iPSC obtenidas a partir de la reprogramación conservan la pluripotencia y la edición dirigida durante un pase y expansión a largo plazo.

Las iPSC modificadas genómicamente de la invención reivindicada pueden estar comprendidas en una composición que comprende además una composición de molécula pequeña que comprende un inhibidor de MEK, un inhibidor de GSK3 y un inhibidor de ROCK, en donde las iPSC modificadas genómicamente se obtienen de (a) linfocitos T modificados genómicamente de reprogramación, en donde las iPSC obtenidas comprenden la misma edición dirigida comprendida en los linfocitos T modificados genómicamente; o (b) modificar genómicamente una iPSC clonal o un grupo de iPSC mediante la introducción de una o más ediciones dirigidas en sitios seleccionados.

V. Uso terapéutico de iPSC genéticamente modificadas y células inmunitarias derivadas con modalidades funcionales a partir de las mismas

La presente invención proporciona una composición que comprende una población o subpoblación aislada de iPSC genéticamente modificadas y/o células inmunitarias que han derivado de dichas iPSC mediante el uso de los métodos y las composiciones de la invención reivindicada, en donde las células inmunitarias se modifican genéticamente según la invención reivindicada y son adecuadas para terapias adoptivas basadas en células. En una realización, la población o subpoblación aislada de células inmunitarias genéticamente modificadas comprende células HSC derivadas de iPSC. En una realización, la población o subpoblación aislada de células inmunitarias genéticamente modificadas comprende células HSC derivadas de iPSC. En una realización, la población o subpoblación aislada de células inmunitarias genéticamente modificadas comprende células proT o linfocitos T derivados de iPSC. En una realización, la población o subpoblación aislada de células inmunitarias genéticamente modificadas comprende células proNK o NK derivadas de iPSC. En algunas realizaciones, las células inmunitarias genéticamente modificadas derivadas de iPSC se modulan adicionalmente ex vivo para un potencial terapéutico mejorado. En una realización, una población o subpoblación aislada de células inmunitarias genéticamente modificadas que se han derivado de iPSC comprende un mayor número o relación de linfocitos T vírgenes, linfocitos

T de memoria de células madre y/o linfocitos T de memoria central. En una realización, la población o subpoblación aislada de células inmunitarias genéticamente modificadas que se han derivado de iPSC comprende un mayor número o relación de células NKT de tipo I. En otra realización, la población o subpoblación aislada de células inmunitarias genéticamente modificadas que se han derivado de iPSC comprende un mayor número o relación de células NK adaptativas. En algunas realizaciones, la población o subpoblación aislada de células CD34 genéticamente modificadas, células HSC, linfocitos T o células NK derivadas de iPSC son alogénicas. En algunas otras realizaciones, la población o subpoblación aislada de células CD34 genéticamente modificadas, células HSC, linfocitos T o células NK derivadas de iPSC son autogénicas.

En algunas realizaciones, la iPSC para la diferenciación comprenden improntas genéticas que transmiten atributos terapéuticos deseables en células efectoras, cuyas improntas genéticas se retienen y son funcionales en las células hematopoyéticas diferenciadas derivadas de dicha iPSC, comprenden al menos una combinación de (a) un TCR que se inactiva mediante la interrupción de un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa, y (b) un polinucleótido que codifica al menos un CAR que está inactivado en el ácido polinucleico que codifica la región constante de TCR alfa, en donde el polinucleótido que codifica el al menos un CAR se expresa bajo el control de un promotor de TCR endógeno de la región constante de TCR alfa.

En algunas realizaciones, las improntas genéticas de las células madre pluripotentes obtenidas según los métodos reivindicados actualmente comprenden además (i) una o más modalidades genéticamente modificadas obtenidas mediante inserción genómica, delección o sustitución en el genoma de las células pluripotentes durante o después de reprogramar una célula no pluripotente a iPSC; o (ii) uno o más atributos terapéuticos retenidos de una célula inmunitaria específica de fuente que es específica de donador, de enfermedad o de respuesta al tratamiento, y en donde las células pluripotentes se reprograman a partir de la célula inmunitaria específica de la fuente, en donde la iPSC retiene los atributos terapéuticos de origen, que también están comprendidos en las células de linaje hematopoyético derivadas de iPSC.

En algunas otras realizaciones, las células obtenidas según las presentes reivindicaciones comprenden modalidades genéticamente modificadas que comprenden uno o más de delección o expresión reducida de B2M, TAP1, TAP2, Tapasina, NLRC5, PD1, LAG3, TIM3, RFXANK, CIITA, RFX5 o RFXAP, y cualquier gen en la región del cromosoma 6p21.

En algunas otras realizaciones más, las células de linaje hematopoyético producidas según la invención actualmente reivindicada comprenden los atributos terapéuticos del linfocito T específico de la fuente con respecto a uno o más de (i) expresión del receptor dirigido a antígeno; (ii) presentación de HLA o falta de los mismos; (iii) resistencia al microentorno tumoral; (iv) inducción de células inmunitarias circunstantes y modulaciones inmunitarias; (iv) especificidad específica mejorada con un efecto no específico de tumor reducido; (v) resistencia al tratamiento tal como quimioterapia; y (vi) una localización, persistencia y citotoxicidad mejoradas.

En algunas realizaciones, las iPSC y sus células hematopoyéticas derivadas comprenden uno o más de B2M nulo o bajo, HLA-E/G, PDL1, A2AR, CD47, LAG3 nulo o bajo, TIM3 nulo o bajo, TAP1 nulo o bajo, TAP2 nulo o bajo, Tapasina nula o baja, NLRC5 nulo o bajo, PD1 nulo o bajo, Rfkk nulo o bajo, CIITA nulo o bajo, RFX5 nulo o bajo y RFXAP nulo o bajo. Estas células con HLA de clase I y/o II modificados tienen una mayor resistencia a la detección inmunitaria y, por lo tanto, presentan una persistencia *in vivo* mejorada. Por otra parte, tales células pueden evitar la necesidad de una coincidencia de HLA en la terapia celular adoptiva y, por lo tanto, proporcionar una fuente de régimen terapéutico universal, disponible.

En algunas realizaciones, las iPSC y sus células hematopoyéticas derivadas comprenden uno o más de hnCD16 (CD16 no escindible de alta afinidad), HLA-E, HLA-G, 41BBL, CD3, CD4, CD8, CD47, CD113, CD131, CD137, CD80, PDL1, A₂AR, CAR o TCR. Dichas células tienen una capacidad efectora inmunitaria mejorada.

En algunas realizaciones, las iPSC y sus células hematopoyéticas derivadas son específicas de antígeno.

Una diversidad de enfermedades puede mejorarse mediante la introducción de las células inmunitarias de la invención a un sujeto adecuado para la terapia celular adoptiva. Los ejemplos de enfermedades que incluyen diversos trastornos autoinmunitarios, incluyendo pero no limitado a, alopecia areata, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, dermatomiositis, diabetes (tipo 1), algunas formas de artritis idiopática juvenil, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, púrpura idiopática trombocitopénica, miastenia grave, algunas formas de miocarditis, esclerosis múltiple, pénfigo/penfigoide, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia/esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, algunas formas de tiroiditis, algunas formas de uveítis, vitiligo, granulomatosis con poliangiitis (Wegener); neoplasias hematológicas, incluyendo pero no limitado a, leucemias agudas y crónicas, linfomas, mieloma múltiple y síndromes mielodisplásicos; tumores sólidos, incluyendo pero no limitado a, tumor del cerebro, próstata, mama, pulmón, colon, útero, piel, hígado, hueso, páncreas, ovario, testículos, vejiga, riñón, cabeza, cuello, estómago, cuello uterino, recto, laringe o esófago; e infecciones, incluyendo pero no limitado a, trastornos asociados a VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), a VRS (virus respiratorio sincitial), a VEB (virus de Epstein-Barr), a CMV (citomegalovirus), a adenovirus y a BK poliomavirus.

Las realizaciones particulares de la presente invención se dirigen a composiciones farmacéuticas para su uso en métodos para tratar a un sujeto que lo necesita mediante la administración al sujeto de una composición que comprende una iPSC modificada genómicamente o una iPSC clonal de la invención reivindicada o célula de linaje hematopoyético derivada de la misma. En realizaciones particulares, los términos “tratar”, “tratamiento” y similares se usan en el presente documento para significar generalmente obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento” como se usa en el presente documento abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, e incluye: evitar que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero aún no ha sido diagnosticado como que la tiene; inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad. El agente o la composición terapéutica puede administrarse antes, durante o después del inicio de la enfermedad o lesión. El tratamiento de la enfermedad en curso, donde el tratamiento estabiliza o reduce los síntomas clínicos indeseables del paciente, es de particular interés.

En realizaciones particulares, el sujeto tiene una enfermedad, afección y/o una lesión que puede tratarse, aliviarse y/o mejorarse mediante una terapia celular. Algunas realizaciones contemplan que un sujeto que necesita terapia celular es un sujeto con una lesión, enfermedad o afección, por lo que una terapia celular, por ejemplo, una terapia en donde se administra un material celular al sujeto, puede tratar, aliviar, mejorar y/o reducir la gravedad de al menos un síntoma asociado a la lesión, enfermedad o afección. Determinadas realizaciones contemplan que un sujeto que necesita terapia celular incluye, pero no se limita a, un candidato para el trasplante de médula ósea o de células madre, un sujeto que ha recibido quimioterapia o radioterapia, un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno hiperproliferativo o un cáncer, por ejemplo, un trastorno hiperproliferativo o un cáncer de sistema hematopoyético, un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un tumor, por ejemplo, un tumor sólido, un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una infección vírica o una enfermedad asociada a una infección vírica.

Según la presente invención, también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden la iPSC modificada genómicamente o una iPSC clonal o una población de las mismas fabricada por los métodos de la invención reivindicada, o una célula de linaje hematopoyético derivada de la misma, en donde las composiciones farmacéuticas comprenden además un medio farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende los linfocitos T derivados de células pluripotentes producidos mediante los métodos y la composición desvelados en el presente documento. En una realización, la composición farmacéutica comprende las células NK derivadas de células pluripotentes producidas mediante los métodos y la composición desvelados en el presente documento. En una realización, la composición farmacéutica comprende las células CD34+ HE derivadas de células pluripotentes producidas mediante los métodos y la composición desvelados en el presente documento. En una realización, la composición farmacéutica comprende las HSC derivadas de células pluripotentes producidas mediante los métodos y la composición desvelados en el presente documento.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso terapéutico de las composiciones farmacéuticas anteriores de la invención reivindicada mediante la introducción de la composición a un sujeto adecuado para terapia celular adoptiva, en donde el sujeto tiene un trastorno autoinmunitario; una neoplasia hemática; un tumor sólido; o una infección asociada a VIH, VRS, VEB, CMV, adenovirus o BK poliomavirus.

Las células de linaje hematopoyético derivadas de células madre pluripotentes aisladas pueden tener al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % de linfocitos T, células NK, células NKT, células proT, células proNK, células CD34+ HE o HSC. En algunas realizaciones, las células de linaje hematopoyético derivadas de células madre pluripotentes aisladas tienen de aproximadamente el 95 % a aproximadamente el 100 % de linfocitos T, células NK, células NKT, células proT, células proNK, células CD34+ HE o HSC. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que tienen linfocitos T, células NK, células NKT, células CD34+ HE, células proT, células proNK o HSC purificados, tales como una composición que tiene una población aislada de aproximadamente el 95 % de linfocitos T, células NK, células NKT, células proT, células proNK, células CD34+ HE o HSC para tratar a un sujeto que necesita la terapia celular.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica incluye una población aislada de células de linaje hematopoyético derivadas de células madre pluripotentes, en donde la población tiene menos de aproximadamente el 0,1 %, el 0,5 %, el 1 %, el 2 %, el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 % o el 30 % de linfocitos T, células NK, células NKT, células proT, células proNK, células CD34+ HE o HSC derivados de iPSC. La población aislada de células de linaje hematopoyético derivadas en algunas realizaciones pueden tener al menos el 0,1 %, el 0,5 %, el 1 %, el 2 %, el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 % o el 30 % de linfocitos T, células NK, células NKT, células proT, células proNK, células CD34+ HE o HSC. En otras realizaciones, la población aislada de células de linaje hematopoyético derivadas puede tener de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1 %, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 3 %, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 10 %, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 15 %, de aproximadamente el 15 %-20 %, de aproximadamente el 20 %-25 %, de aproximadamente el 25 %-30 %, de aproximadamente el 30 %-35 %, de aproximadamente el 35 %-40 %, de aproximadamente el 40 %-45 %, de aproximadamente el 45 %-50 %, de aproximadamente el 60 %-70 %, de aproximadamente el 70 %-80 %, de aproximadamente

el 80 %-90 %, aproximadamente el 90 %-95 % o de aproximadamente el 95 % a aproximadamente el 100 % de linfocitos T, células NK, células NKT, células proT, células proNK, células CD34+ HE o HSC.

En realizaciones particulares, las células de linaje hematopoyético derivadas pueden tener aproximadamente el 0, 1 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % de linfocitos T, células NK, células NKT, células proT, células proNK, células CD34+ HE o HSC.

Como entendería un experto en la materia, tanto las células inmunitarias autólogas como las alogénicas pueden usarse en terapias celulares. Las terapias de células autólogas pueden tener una infección reducida, una baja probabilidad de EICH y una reconstitución inmunitaria rápida. Las terapias celulares alogénicas pueden tener un efecto de injerto contra neoplasia (GVM) mediado por el sistema inmunitario y una baja tasa de recaída. Basándose en las condiciones específicas de los pacientes o sujetos que necesitan la terapia celular, un experto en la materia sería capaz de determinar qué tipo específico de terapia se administra.

En realizaciones particulares, las células de linaje hematopoyético derivadas de la composición farmacéutica de la invención son alogénicas a un sujeto. En realizaciones particulares, las células de linaje hematopoyético derivadas de la formulación farmacéutica de la invención son autólogas a un sujeto. Para el trasplante autólogo, la población aislada de células de linaje hematopoyético derivadas es coincidente completa o parcial con el HKA del paciente. En otra realización, las células de linaje hematopoyético derivadas no son coincidentes con el HLA del sujeto.

En algunas realizaciones, el número de células de linaje hematopoyético derivadas en la composición farmacéutica es al menos $0,1 \times 10^5$ células, al menos $0,5 \times 10^5$ células, al menos 1×10^5 células, al menos 5×10^5 células, al menos 10×10^5 células, al menos $0,5 \times 10^6$ células, al menos $0,75 \times 10^6$ células, al menos 1×10^6 células, al menos $1,25 \times 10^6$ células, al menos $1,5 \times 10^6$ células, al menos $1,75 \times 10^6$ células, al menos 2×10^6 células, al menos $2,5 \times 10^6$ células, al menos 3×10^6 células, al menos 4×10^6 células, al menos 5×10^6 células, al menos 10×10^6 células, al menos 15×10^6 células, al menos 20×10^6 células, al menos 25×10^6 células o al menos 30×10^6 células.

En algunas realizaciones, el número de células de linaje hematopoyético derivadas en la composición farmacéutica es de aproximadamente $0,1 \times 10^5$ células a aproximadamente 10×10^5 células; de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células a aproximadamente 5×10^6 células; de aproximadamente 1×10^6 células a aproximadamente 3×10^6 células; de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células a aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células; o de aproximadamente 2×10^6 células a aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células.

En algunas realizaciones, el número de células de linaje hematopoyético derivadas en la composición farmacéutica es de aproximadamente 1×10^6 células a aproximadamente 3×10^6 células; de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 5×10^6 células; de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 10×10^6 células, de aproximadamente 10×10^6 células a aproximadamente 20×10^6 células, de aproximadamente 10×10^6 células a aproximadamente 30×10^6 células o de aproximadamente 20×10^6 células a aproximadamente 30×10^6 células.

En algunas otras realizaciones, el número de células de linaje hematopoyético derivadas en la composición farmacéutica es de aproximadamente 1×10^6 células a aproximadamente 30×10^6 células; de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 20×10^6 células; de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 10×10^6 células, de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 30×10^6 células, de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 20×10^6 células o de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 10×10^6 células.

En todavía otras realizaciones, el número de células de linaje hematopoyético derivadas en la composición farmacéutica es de aproximadamente 1×10^6 células, de aproximadamente 2×10^6 células, de aproximadamente 5×10^6 células, de aproximadamente 7×10^6 células, de aproximadamente 10×10^6 células, de aproximadamente 15×10^6 células, de aproximadamente 17×10^6 células, de aproximadamente 20×10^6 células, de aproximadamente 25×10^6 células o de aproximadamente 30×10^6 células.

En una realización, el número de células de linaje hematopoyético derivadas en la composición farmacéutica es el número de células inmunitarias en un cordón de sangre parcial o individual, o es al menos $0,1 \times 10^5$ células/kg de peso corporal, al menos $0,5 \times 10^5$ células/kg de peso corporal, al menos 1×10^5 células/kg de peso corporal, al menos 5×10^5 células/kg de peso corporal, al menos 10×10^5 células/kg de peso corporal, al menos $0,5 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos $0,75 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 1×10^6 células/kg de peso corporal, al menos $1,25 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos $1,5 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos $1,75 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 2×10^6 células/kg de peso corporal, al menos $2,5 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 3×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 4×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 5×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 10×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 15

$\times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 20×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 25×10^6 células/kg de peso corporal o al menos 30×10^6 células/kg de peso corporal.

Las células de linaje hematopoyético genéticamente modificadas derivadas proporcionadas por la invención pueden ser la administración a un sujeto sin estar expandidas *ex vivo* o *in vitro* antes de la administración. En realizaciones particulares, una población aislada de células de linaje hematopoyético genéticamente modificadas derivadas se modula y se trata *ex vivo* usando uno o más agentes para obtener células inmunitarias con potencial terapéutico mejorado. La población modulada de células de linaje hematopoyético genéticamente modificadas derivadas puede lavarse para eliminar el agente o agentes de tratamiento, y la población mejorada se administra a un paciente sin expansión adicional de la población *in vitro*.

En otras realizaciones, la invención proporciona una población aislada de células de linaje hematopoyético genéticamente modificadas derivadas que se expanden antes de la modulación con uno o más agentes. La población aislada de células de linaje hematopoyético derivadas puede producirse recombinantemente para expresar al menos un CAR usando el método y la composición de la invención reivindicada.

Para células de linaje hematopoyético derivadas modificadas genéticamente que expresan CAR recombinante, ya sea antes o después de la modificación genética de las células, las células pueden activarse y expandirse usando métodos como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20060121005.

En determinadas realizaciones, la señal estimulante primaria y la señal coestimuladora para las células de linaje hematopoyético genéticamente modificadas derivadas pueden proporcionarse mediante diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes pueden acoplarse a la misma superficie (es decir, en la formación “cis”) o para separar superficies (es decir, en la formación “trans”). Alternativamente, un agente puede acoplarse a una superficie y al otro agente en solución. En una realización, el agente que proporciona la señal coestimuladora puede unirse a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En determinadas realizaciones, ambos agentes pueden estar en solución. En otra realización, los agentes pueden estar en forma soluble y después reticularse con una superficie, tal como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes tales como los desvelados en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20040101519 y 20060034810 para células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) que se contemplan para su uso en la activación y la expansión de linfocitos T en la presente invención.

Las composiciones que comprenden una población de células de linaje hematopoyético derivadas de la invención pueden ser estériles y pueden ser adecuadas y estar listas para la administración (es decir, pueden administrarse sin ningún procesamiento adicional) a pacientes humanos. En algunas realizaciones, la composición terapéutica está lista para la infusión en un paciente. Una composición basada en células que está lista para la administración significa que la composición no requiere ningún tratamiento o manipulaciones adicionales antes del trasplante o administración a un sujeto.

Las composiciones estériles terapéuticamente aceptables adecuadas para la administración a un paciente pueden incluir uno o más vehículos (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, medio farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, medio de cultivo celular) u otros componentes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como también por el método particular usado para administrar la composición terapéutica. En consecuencia, existe una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones terapéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed. 1985).

En realizaciones particulares, las composiciones de células terapéuticas que tienen una población aislada de células de linaje hematopoyético genéticamente modificadas derivadas también tienen un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable. Una composición terapéutica que comprende una población de células de linaje hematopoyético genéticamente modificadas derivadas como se desvela en el presente documento puede administrarse por separado mediante métodos de administración enteral o parenteral o en combinación con otros compuestos adecuados para efectuar los objetivos de tratamiento deseados.

El vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable debe tener una pureza suficientemente alta y ser de una toxicidad suficientemente baja para hacerlo adecuado para la administración al sujeto humano que se está tratando. Además, debe mantener o aumentar la estabilidad de la composición terapéutica.

Tales soluciones vehículo también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Un tampón se refiere a una solución o líquido cuya composición química neutraliza ácidos o bases sin un cambio significativo en el pH. Los ejemplos de tampones previstos por la invención incluyen, pero no se limitan a, solución salina tamponada con

fosfato de Dulbecco (PBS), solución de Ringer, dextrosa al 5 % en agua (D5W), solución salina normal/fisiológica (NaCl al 0,9 %).

Estos vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables pueden estar presentes en cantidades suficientes para mantener un pH de la composición terapéutica de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10. Como tal, el agente tampón puede ser hasta aproximadamente el 5 % en peso con respecto a una base de peso de la composición total. Los electrolitos tales como, pero no limitado a, cloruro sódico y cloruro potásico también pueden incluirse en la composición terapéutica. En un aspecto, el pH de la composición terapéutica está en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10. Alternativamente, el pH de la composición terapéutica está en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8. En otra realización, la composición terapéutica incluye un tampón que tiene un pH en uno de dichos intervalos de pH. En otra realización, la composición terapéutica tiene un pH de aproximadamente 7. Alternativamente, la composición terapéutica tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4. En otra realización más, la composición terapéutica tiene un pH de aproximadamente 7,4.

La composición estéril de la invención puede ser una solución o suspensión estéril en un medio farmacéuticamente aceptable no tóxico. La suspensión puede referirse a condiciones no adherentes en las cuales las células no están unidas a un soporte sólido. Por ejemplo, las células mantenidas en suspensión pueden agitarse y no se adhieren a un soporte, tal como una placa de cultivo.

Una suspensión es una dispersión (mezcla) en la cual una especie finamente dividida se combina con otra especie, estando la primera finamente dividida y mezclada que no se asienta rápidamente. Puede prepararse una suspensión usando un vehículo tal como un medio líquido, incluyendo una solución. En algunas realizaciones, la composición terapéutica de la invención es una suspensión, donde las células madre y/o progenitoras se dispersan dentro de un medio líquido aceptable o una solución, por ejemplo, solución salina o medio libre de suero, y no se unen a un soporte sólido. En la vida diaria, las suspensiones más comunes son las de sólidos en agua líquida. Entre los diluyentes aceptables, por ejemplo, vehículos y disolventes, que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro sódico (solución salina) y medio de cultivo celular libre de suero. En algunas realizaciones, se emplean soluciones hipertónicas en la preparación de suspensiones. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para la aplicación parenteral, los vehículos particularmente adecuados consisten en soluciones, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes. Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. En algunas realizaciones, la solución de infusión es isotónica para los tejidos en cuestión. En algunas realizaciones, la solución de infusión es hipertónica para los tejidos en cuestión.

El vehículo, los diluyentes y otros componentes farmacéuticamente aceptables que comprenden la composición farmacéutica lista para administración de la invención derivan de reactivos de calidad farmacéutica de EE.UU. que permitirán que la composición terapéutica se use en regímenes clínicos. Normalmente, estos reactivos terminados, que incluyen cualquier medio, solución u otros vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, se esterilizan de una manera convencional en la técnica, tal como esterilización por filtración, y se prueban para diversos contaminantes no deseados, tales como micoplasma, endotoxina o contaminación de virus, antes de su uso. El vehículo farmacéuticamente aceptable en una realización está sustancialmente libre de proteínas naturales de origen humano o animal, y es adecuado para almacenar la población de células de la composición farmacéutica, incluyendo células madre y progenitoras hematopoyéticas. La composición farmacéutica está destinada a administrarse en un paciente humano y, por lo tanto, está sustancialmente libre de componentes de cultivo celular tales como seroalbúmina bovina, suero de caballo y suero bovino fetal.

Los métodos según la presente invención actualmente reivindicada pueden utilizar un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable en composiciones particulares y/o cultivos de la presente invención. Dichas composiciones son adecuadas para la administración a sujetos humanos. En términos generales, cualquier medio que admita el mantenimiento, el crecimiento y/o la salud de las células de linaje hematopoyético derivadas de la invención es adecuado para su uso como medio de cultivo de células farmacéuticas. En ejemplos particulares que pueden asociarse con las células y composiciones reivindicadas, el medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable es un medio libre de suero y/o libre de alimentadores.

La composición farmacéutica puede tener un medio libre de suero adecuado para almacenar la población aislada modulada de células de linaje hematopoyético derivadas. En diversas realizaciones, el medio sin suero está libre de animales y opcionalmente puede estar libre de proteínas. Opcionalmente, el medio puede contener proteínas recombinantes biofarmacéuticamente aceptables. El medio sin animales se refiere al medio en donde los componentes derivan de fuentes no animales. Las proteínas recombinantes reemplazan proteínas animales nativas en medio sin animales y los nutrientes se obtienen de fuentes sintéticas, vegetales o microbianas. El medio libre de proteínas, en contraste, se define como sustancialmente libre de proteína.

Un experto en la materia apreciaría que los ejemplos anteriores de medios son ilustrativos y de ninguna manera limitan la formulación de medios adecuados para su uso en la presente invención y que existen muchos medios adecuados conocidos y disponibles para los expertos en la materia.

- 5 La composición farmacéutica está sustancialmente libre de micoplasma, endotoxina y contaminación microbiana. En realizaciones particulares, la composición terapéutica contiene menos de aproximadamente 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1 o 0,05 µg/ml de seroalbúmina bovina.

10 Con respecto a la contaminación por micoplasma y microbiana, “sustancialmente libre” como se usa en el presente documento significa una lectura negativa para las pruebas generalmente aceptadas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la contaminación por micoplasma se determina subcultivando una muestra de la composición terapéutica en medio de caldo y se distribuye sobre placas de agar en el día 1, 3, 7 y 14 a 37 °C con controles positivos y negativos apropiados. El aspecto de la muestra se compara microscópicamente, a 100x, con el del control positivo y negativo. Además, la inoculación de un cultivo de células indicadoras se incuba durante 3 y 5 días y se examina a 600 x para la presencia de micoplasmas mediante microscopía de epifluorescencia usando un fluorocromo de unión a ADN. La muestra se considera satisfactoria si el agar y/o el procedimiento de medio de caldo y el procedimiento de cultivo celular indicador no muestran evidencia de contaminación por micoplasma.

20 Un disolvente orgánico o un disolvente orgánico adecuado se refiere generalmente a líquidos o gases que contienen carbono que disuelven un soluto sólido, líquido o gaseoso, lo que da como resultado una solución. Un disolvente orgánico adecuado es uno que es apropiado para la administración *ex vivo* a, o incubación con, células de mamífero, y también puede ser apropiado para la administración *in vivo* a un sujeto, tal como teniendo una toxicidad mínima u otros efectos inhibidores bajo condiciones *ex vivo* (por ejemplo, cultivo celular) o *in vivo* a una concentración seleccionada para el momento de la incubación o administración. Un disolvente orgánico adecuado también debe ser apropiado para la estabilidad de almacenamiento y manipulación de los agentes descritos en el presente documento.

30 Los ejemplos de disolventes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido (DMSO), N,N-dimetilformamida (DMF), dimetoxietano (DME) y dimetilacetamida, incluyendo mezclas o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, una composición o disolvente orgánico está sustancialmente libre de acetato de metilo, lo que significa que no debe haber más de trazas de acetato de metilo en la composición o disolvente, y preferiblemente cantidades indetectables (por ejemplo, medida por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de gases (GC), etc.).

35 Un recipiente o composición que está libre de endotoxinas significa que el recipiente o composición contiene como mucho cantidades traza (es decir, cantidades que no tienen efectos fisiológicos adversos en un sujeto) de endotoxinas, o cantidades indetectables de endotoxinas. Que las células estén “sustancialmente libres de endotoxinas” significa que hay menos endotoxina por dosis de células que la FDA permite para un producto biológico, que es una endotoxina total de 5 EU/kg de peso corporal por día, que para una persona promedio de 70 kg es 350 EU por dosis total de células.

40 En una realización, el recipiente y/o las composiciones libres de endotoxinas es al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % libre de endotoxinas. Las endotoxinas son toxinas asociadas a determinadas bacterias, normalmente bacterias gramnegativas, aunque las endotoxinas pueden encontrarse en bacterias grampositivas, tales como *Listeria monocytogenes*. Las endotoxinas más prevalentes son lipopolisacáridos (LPS) o lipooligosacáridos (LOS) encontrados en la membrana externa de diversas bacterias Gramnegativas, y que representan una característica patógena central en la capacidad de estas bacterias para provocar enfermedad. Pequeñas cantidades de endotoxinas en seres humanos pueden producir fiebre, una disminución de la presión sanguínea y activación de la inflamación y coagulación, entre otros efectos fisiológicos adversos. Por lo tanto, a menudo es deseable eliminar la mayoría o todas las trazas de endotoxinas de los recipientes de productos farmacéuticos, porque incluso pequeñas cantidades pueden provocar efectos adversos en los seres humanos. Las endotoxinas pueden retirarse de los recipientes usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los recipientes pueden limpiarse en un equipo de lavado con filtros HEPA con agua libre de endotoxinas, despirogenar a 250 °C y envasar en limpio en estaciones de trabajo filtradas con HEPA ubicadas dentro de una sala limpia de clase 100/10 (por ejemplo, una sala limpia de clase 100, no contiene más de 100 partículas más grandes que la mitad de un micrómetro en un pie cúbico de aire).

Ejemplos

60 Los siguientes ejemplos ilustran características y métodos que pueden usarse en la invención, pero no limitan su alcance, que se define por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

65 Para seleccionar y probar eficazmente los sistemas suicidas bajo el control de diversos promotores en combinación con diferentes estrategias de integración de loci de puerto seguro, se usó una plataforma hiPSC patentada del

solicitante, que permite el paso de células individuales y la clasificación de citometría de flujo de 96 pocillos de alto rendimiento, para permitir la derivación de hiPSC clonales con modulaciones genéticas individuales o múltiples.

Mantenimiento de hiPSC en cultivo de molécula pequeña: Las hiPSC se pasaron rutinariamente como células individuales una vez la confluencia del cultivo alcanzó el 75 %-90 %. Para la disociación de células individuales, las hiPSC se lavaron una vez con PBS (Mediatech) y se trataron con Accutase (Millipore) durante 3-5 min a 37 °C seguido de pipeteo para asegurar la disociación de células individuales. Después, la suspensión de células individuales se mezcló en un volumen igual con medio convencional, se centrifugó a 225 × g durante 4 min, se resuspendió en FMM y se sembró en una superficie recubierta con Matrigel. Los pasajes fueron normalmente 1:6-1:8, placas de cultivo de tejidos transferidas previamente recubiertas con Matrigel durante 2-4 h a 37 °C y se alimentaron cada 2-3 días con FMM. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora humidificada ajustada a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Edición del genoma de iPSC humana con ZFN, CRISPR para la inserción dirigida de iCasp9 en puertos seguros del genoma: Para la edición del genoma mediado por ZFN, se transfectaron 2 millones de iPSC con una mezcla de 2,5 ug de ZFN-L (FTV893; SEQ ID NO:2 y 4), 2,5 ug de ZFN-R (FTV894; SEQ ID NO:3 y 5) y 5 ug de construcción de donador AAVS1 iCasp9 (FTV895, FTV930, FTV921, FTV931, FTV932, FTV952 o FTV953; iCasp9a9 SEQ ID NO: 7 y 8) de ADN de plásmido. Para la edición del genoma mediado por CRISPR, se transfectaron 2 millones de iPSC con una mezcla de 5 ug de ROSA26-ARNG/Cas9 (FTV922; SEQ ID NO:6) y 5 ug de construcción de donador ROSA26 iCasp9 (FTV955 o FTV956). La transfección se realizó mediante el uso del sistema de transfección Neon (Life Technologies) usando parámetros 1500 V, 10 ms, 3 pulsos. El día 2 o 3 después de la transfección, la eficiencia de la transfección se midió mediante el uso de citometría de flujo si los plásmidos contienen un casete de expresión del promotor-controlador artificial GFP y/o RFP. El día 4 después de la transfección, se añadió puromicina al medio a una concentración de 0,1 ug/ml durante los primeros 7 días y 0,2 ug/ml después de 7 días para seleccionar las células diana. Durante la selección con puromicina, las células se pasaron a pocillos recubiertos con matrigel nuevos el día 10. El día 16 o posterior de la selección con puromicina, las células supervivientes se analizaron por citometría de flujo para el porcentaje de células GFP+ iPS.

Clasificación de forma global y clasificación clonal de iPSC editadas genómicamente: Las iPSC marcadas como diana con iCasp9-2A-GFP impulsado por el promotor AAVS1 EF1α o CAG mediado por ZFN se clasificaron de forma global y se clasificaron clonalmente iPSC GFP+SSEA4+TRA181+ después de 20 días de selección con puromicina. Los grupos de iPSC marcadas como diana disociadas de células individuales se resuspendieron en tampón de tinción enfriado que contenía solución salina equilibrada de Hanks (Mediatech), suero bovino fetal al 4 % (Invitrogen), 1 x penicilina/estreptomycin (Mediatech) y Hepes 10 mM (Mediatech); preparado reciente para un rendimiento óptimo. Los anticuerpos primarios conjugados, incluyendo SSEA4-PE, TRA181-Alexa Fluor-647 (BD Biosciences), se añadieron a la solución celular y se incubaron en hielo durante 15 min. Todos los anticuerpos se usaron a 7 µl en 100 µl de tampón de tinción por millón de células. La solución se lavó una vez en tampón de tinción, se centrifugó a 225 g durante 4 min y se resuspendió en tampón de tinción que contenía Tiazovivina 10 µM y se mantuvo en hielo para la clasificación por citometría de flujo. La clasificación por citometría de flujo se realizó en FACS Aria II (BD Biosciences). Para la clasificación de forma global, las células GFP+SSEA4+TRA181+ se seleccionaron y se clasificaron en tubos canónicos de 15 ml llenos con 7 ml de FMM. Para la clasificación clonal, las células clasificadas se expulsaron directamente en placas de 96 pocillos usando la boquilla de 100 µM, a concentraciones de 3 eventos por pocillo. Cada pocillo se cargó previamente con 200 µl de FMM suplementado con 5 µg/ml de fibronectina y 1x penicilina/estreptomycin (Mediatech) y se recubrió previamente durante la noche con 5x Matrigel. El recubrimiento previo de Matrigel de 5x incluye añadir una alícuota de Matrigel en 5 ml de DMEM/F 12, después incubar durante la noche a 4 °C para permitir una resuspensión adecuada y finalmente añadir a placas de 96 pocillos a 50 µl por pocillo seguido de incubación durante la noche a 37 °C. El 5x Matrigel se aspira inmediatamente antes de la adición de medios a cada pocillo. Tras la finalización de la clasificación, se centrifugaron placas de 96 pocillos durante 1-2 min a 225 g antes de la incubación. Las placas se dejaron sin perturbar durante siete días. El séptimo día, se retiraron 150 µl de medio de cada pocillo y se reemplazaron por 100 µl de FMM. Los pocillos se realimentaron con 100 µl de FMM adicionales en el día 10 después de la clasificación. La formación de colonias se detectó tan pronto como el día 2 y la mayoría de colonias se expandió entre los días 7-10 después de la clasificación. En el primer pasaje, los pocillos se lavaron con PBS y se disociaron con 30 µl de Accutase durante aproximadamente 10 min a 37 °C. La necesidad de tratamiento extendido de Accutase refleja la compacidad de las colonias que tienen un estado de reposo en cultivo durante una duración prolongada. Después de que se observa que las células se disocian, se añaden 200 µl de FMM a cada pocillo y se pipetea varias veces para romper la colonia. La colonia disociada se transfiere a otro pocillo de una placa de 96 pocillos previamente recubierta con 5x Matrigel y después se centrifuga durante 2 min a 225 g antes de la incubación. Este pasaje 1:1 se lleva a cabo para extender la colonia temprana antes de la expansión. Los pases posteriores se realizaron rutinariamente con el tratamiento con Accutase durante 3-5 min y la expansión de 1:4-1:8 tras el 75-90 % de confluencia en pocillos más grandes recubiertos previamente con 1x Matrigel en FMM. Cada línea celular clonal se analizó para determinar el nivel de fluorescencia de GFP y el nivel de expresión de TRA1-81. Se seleccionaron líneas clonales con cerca del 100 % de GFP+ y TRA1-81+ para un análisis y detección por PCR adicionales. El análisis de citometría de flujo se realizó en GuavaEasyCyte 8 HT (Millipore) y se analizó mediante el uso de FlowJo (FlowJo, LLC).

Destrucción inducible in vitro de iPSC con iCasp9 integrado: El inductor químico de dimerización (CID; AP1903) se adquirió de Medchemexpress (Monmouth Junction, NJ). Veinticuatro horas después de la exposición a CID, las células se recolectaron y se tiñeron con 7-amino actinomicina D (7-AAD) según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). El porcentaje de células positivas para 7-AAD se cuantificó como células muertas por citometría de flujo (Guava, EMD Millipore, Billerica, MA) y se analizó con el software flowjo.

Para probar si la AP1903 indujo la muerte celular completa de los clones de iPSC marcados como diana por iCasp9, los presentes inventores trataron 3 pocillos de cada clon de iPSC dirigido con AP1903 durante 48 horas y después se lavaron los pocillos dos veces con PBS antes de añadir medio de iPSC fresco. Se permitió que los pocillos se recuperaran con medio refrescante cada 2 días durante 5 días totales. Después, los pocillos se tiñeron con reactivo de tinción de fosfatasa alcalina (Sigma).

Diferenciación dirigida a tri-linaje in vitro de clones dirigidos a iCasp9 y destrucción inducible: Para la diferenciación tri-linaje monocapa dirigida, las hiPSC se sembraron en pocillos recubiertos con Matrigel en FMM (por ejemplo, 200K células/pocillo para endodermo, 50K células/pocillo para ectodermo, 10K y 50K células/pocillo para mesodermo) el día antes de la diferenciación inicial. Se establecieron cuatro pocillos replicados para cada diferenciación de linaje. Para la diferenciación del endodermo, el medio FMM se reemplazó por medio de inducción del endodermo: RPMI-1640, Ácido ascórbico (50 µg/ml), Monotioglicerol (450 µM), 1X Glutamina, Reemplazo de suero de inactivación (0,20 %), Activina A (100 ng/ml), CHIR99021 (Biovision) (3 µM), 1X penicilina/estreptomicina. Después de 2 días, reemplazar con medios: RPMI-1640, Ácido ascórbico (50 µg/ml), Monotioglicerol (450 µM), 1X Glutamina, Reemplazo de suero de inactivación (0,50 %), bFGF (5 ng/ml), Activina A (100 ng/ml), 1X penicilina/estreptomicina. Se fijó un pocillo el día 3 y se tiñó para Sox17 (R&D Systems). Se tiñó un pocillo con cristal violeta el día 3. Los otros dos pocillos se trataron con AP1903 durante 48 horas, después se lavaron y se repusieron con medio de diferenciación fresco y se continuó el cultivo durante 5 días antes de teñir con cristal violeta. Para la diferenciación del mesodermo, los medios se reemplazaron por DMEM/F12 (Mediatech) suplementado con ITS, bFGF 10 ng/ml, Forskolina 20 µM y CHIR99021 3 µM. El medio se cambió cada dos días y se fijó un pocillo en el 4º día y se tiñó para αSMA (Sigma). Se tiñó un pocillo con cristal violeta el día 4. Los otros dos pocillos se trataron con AP1903 durante 48 horas, después se lavaron y se repusieron con medio de diferenciación fresco y se continuó el cultivo durante 5 días antes de teñir con cristal violeta. Para la diferenciación del ectodermo, el medio FMM se reemplazó por medio de inducción neural: DMEM/F12 (Mediatech) suplementado con un aditivo de medio 1x B27 (Life Technologies), aditivo de medio 1x N2 (Life Technologies), SB431542 10 µM y LDN-193189 100 nM. El medio se cambió cada dos días y se fijó un pocillo en el 7º día y se tiñó para Nestina (Abeam). Se tiñó un pocillo con cristal violeta el día 7. Los otros dos pocillos se trataron con AP1903 durante 48 horas, después se lavaron y se repusieron con medio de diferenciación fresco y se continuó el cultivo durante 5 días antes de teñir con cristal violeta.

Tinción con cristal violeta: Se preparó solución de cristal violeta al 0,5 % disolviendo 0,5 g de tinción de cristal violeta (Sigma) en 100 ml de agua desionizada. Filtrar y almacenar a temperatura ambiente. Para la tinción, lavar las células 2 veces con PBS. Reemplazar con PBS que contiene paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar dos veces con PBS. Teñir con cristal violeta al 0,1 % (preparado en etanol al 10 %) 15 minutos a temperatura ambiente. Desechar el CV. Lavar con cuidado las células con agua desionizada de una botella de lavado hasta que el agua ya no salga oscura. Retirar el agua desionizada y dejar secar las células teñidas antes de tomar imágenes.

Destrucción inducible in vivo de teratomas derivados de iPSC con iCasp9 integrado: Todos los ratones se alojaron en la instalación del solicitante. Todos los protocolos experimentales que implican ratones fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee del solicitante. Todos los ratones usados en este estudio fueron ratones NSG hembra de 7-10 semanas de edad (NOD/SCID/γ^{null}, the Jackson Laboratory). Para el ensayo de teratoma, 200 µl que consiste en 1-2×10⁶ iPSC en medio FMM al 50 % y Matrigel al 50 % se introdujeron por vía subcutánea en el área dorsolateral. Cada ratón recibió dos inyecciones celulares en ambos lados, con iPSC con iCasp9 integrado inyectadas en el lado izquierdo y la línea de iPSC parental no modificada inyectada en el lado derecho. Para iniciar la destrucción *in vivo* en los puntos de tiempo indicados, los ratones fueron administrados diariamente con AP1903 (125 µg/ratón) mediante inyección intraperitoneal (i.p.) durante 5 o 7 días. Los ratones se monitorizaron para la formación de teratoma y las mediciones de volumen se iniciaron en la semana 3 o como se indica. Los teratomas se recogieron en puntos de tiempo indicados y se procesaron para histología o ensayos moleculares. Se preparó la solución madre AP1903 en DMSO (25 µg/ml). Para una sola inyección i.p., se añadieron 5 µl de solución madre a 200 µl de PBS, seguido de sometimiento a ultrasonidos en un baño de agua durante 10 minutos. Para histología, los teratomas se cosecharon en PBS, se fijaron durante la noche a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4 % y se mantuvieron después en etanol al 70 % a temperatura ambiente para su procesamiento. Las muestras se enviaron a la UCSD Histology Core Facility para el seccionamiento y la tinción con hematoxilina y eosina. Se examinaron las secciones, se interpretaron y se fotografiaron usando un microscopio Nikon Eclipse TS100 equipado con una cámara Nikon DS-Fi1.

Visualización in vivo de la destrucción inducible de iPSC que expresan luciferasa injertadas: Para visualizar la destrucción inducida por AP1903 *in vivo*, las iPSC con iCasp9 integrado y las iPSC parentales no modificadas se infectaron con un lentivirus que contenía un casete policistónico compuesto por un gen de luciferasa de luciérnaga y RFP enlazado por IRES y se expresó bajo el control de EF1α (Biosettia). Las células infectadas se clasificaron para

células RFP+ y se inyectaron como anteriormente. Se inyectaron 2×10^6 iPSC con iCasp9 integrado por vía subcutánea en el lado izquierdo de ratones NSG y se inyectó el mismo número de iPSC parentales en el lado derecho. Las inyecciones i.p. de AP1903 se administraron en los días indicados. Comenzando inmediatamente después de la implantación de iPSC (día 0), el injerto y los volúmenes de teratoma se monitorizaron semanalmente usando el sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS. Para la obtención de imágenes, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con D-luciferina (4 mg/ratón, Thermo Fisher) y se registró la bioluminiscencia 10 min después. El análisis se realizó mediante el uso del software XenogenLivingImage.

EJEMPLO 2: El gen suicida de icasp9 dirigido a un puerto seguro de AAVS1 regulado por el promotor de CMV provoca una respuesta variable cuando se activa por AP1903

Para realizar análisis de alto rendimiento de estrategias de integración y expresión adecuadas en iPSC, se seleccionó una plataforma del gen suicida iCasp9, donde la muerte celular mediada por caspasa-9 rápida puede inducirse por inductores químicos de molécula pequeña de dimerización tales como AP1903. Obsérvese que para la inducción de molécula pequeña para demostrar la efectividad en cada fase de desarrollo hacia el producto final, el gen iCasp9 necesitará expresarse de forma continua en cada fase de mantenimiento y diferenciación de células madre pluripotentes. En una hiPSC individual por pocillo, para integrar y mantener de manera eficiente y precisa diversos casetes de expresión génica suicida en loci de puerto seguro que incluyen, pero no se limitan a, los loci AAVS1, ROSA26 y H11. Varios vectores de integración, conteniendo cada uno de los cuales un casete de expresión génica suicida posterior de diversos promotores exógenos y endógenos, incluyendo los promotores de AAVS1 o ROSA26 endógenos, de citomegalovirus (CMV), del factor de elongación 1α (EF1 α), de la fosfoglicerato quinasa (PGK), del potenciador híbrido de CMV/ β -actina de pollo (CAG) y de la ubiquitina C (UBC), se probaron para analizar sistemáticamente y comparar la actividad de diferentes sistemas suicidas en ambas hiPSC y células diferenciadas derivadas de hiPSC.

Se diseñó una construcción donadora que abarca iCasp9 impulsado por CMV (AAVS1-G1,0) para dirigirse al locus AAVS1 (Figura 1A) e integrar el gen suicida Casp9 a las células 293T. La construcción donadora también comprende genes de GFP y puromicina, cuyas expresiones están impulsadas por el promotor endógeno AAVS1 una vez que tiene lugar la inserción dirigida (Figura 1A). Las células 293T se transfectaron con ZFN específicas para el locus AAVS1 y la construcción donadora AAVS1-G1,0. Tres días después de la transfección, se inició la selección con puromicina y continuó durante 12 días. La población seleccionada con puro se analizó por citometría de flujo para determinar la expresión de GFP y se observó un intervalo de niveles de expresión de GFP. Se observó que aproximadamente el 82 % de la población celular seleccionada con puro expresó GFP (Figura 1B). A continuación, las células 293T seleccionadas con puro se sometieron a tratamientos AP1903 10 nM o 120 nM (se usó DMSO como control) durante 24 h. Las células tratadas se recogieron y se tiñeron después con 7AAD, que tiñe selectivamente células moribundas con la membrana comprometida, y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células negativas para 7AAD (presumiblemente células vivas) se representó gráficamente para cada tratamiento (DMSO en el control; AP1903 10 nM; y AP1903 120 nM) ($n=2$). Se detectó la muerte celular significativa después del tratamiento con AP1903 en ambas concentraciones (Figura 1C). La dosificación de AP1903 no pareció tener un efecto sobre la tasa de células muertas. La inserción dirigida de vectores donadores en el locus AAVS1 en las células 293T seleccionadas con puro se verificó adicionalmente mediante el uso de la PCR de unión del ADN genómico de estas células 293T seleccionadas con puro (Figura 1D) con la presencia de productos de amplificación por PCR específicos para la unión formada por la inserción del vector donador.

Similar a las células 293T, las hiPSC se transfectaron con ZFN específicas para el locus AAVS1 y una construcción donadora que abarca iCasp9 impulsada por CMV (AAVS1-G1,0). La selección con puromicina se inició 3 días después de la transfección y continuó durante 16 días. Las células resistentes a puro se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión de GFP. Tres poblaciones basadas en la intensidad de GFP, GFP (neg), GFP (bajo) y GFP (alto) se clasificaron por citometría de flujo (Figura 1E). Las poblaciones clasificadas GFP (neg), GFP (bajo) y GFP (alto) se expandieron y después se sometieron a tratamiento con AP1903 (10 nM o 100 nM), o DMSO como control, durante 24 h. Las células tratadas se recogieron y se tiñeron con 7AAD y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células negativas para 7AAD (presumiblemente células vivas) se representó gráficamente para cada tratamiento. Sin embargo, a diferencia de las células 293T con inserción dirigida de Casp9 en el locus AAVS1, la muerte celular mediada por el AP1903 no se detectó en todos los tratamientos en iPSC con inserción dirigida de Casp9 en el locus AAVS 1 (Figura 1F). La PCR de unión del ADN genómico de las hiPSC seleccionadas y clasificadas mostró la inserción dirigida de vectores donadores en el locus AAVS1 solo en GFP (bajo) pero no en poblaciones GFP (neg) o GFP (alto) (Figura 1G). Por lo tanto, se creía que la falta de muerte celular en la población de GFP (alto) estaba asociada a una inserción incorrecta (no dirigida) en el genoma y supuesta ausencia de expresión de iCasp9 bajo el promotor de CMV (Figura 1G, carril 4; carril 1-marcador). Mientras tanto, se creía que la falta de muerte celular en GFP (bajo) estaba asociada a la expresión reducida del gen iCasp9 bajo el promotor CMV a pesar de la inserción dirigida correcta en iPSC (Figura 1G, carril 5). Por lo tanto, el gen suicida de iCasp9 dirigido a AAVS1 de puerto seguro regulado por el promotor de CMV provoca respuestas variables, probablemente dependiendo del tipo de célula para la integración y los sitios de integración en el genoma, cuando se activa por AP1903.

EJEMPLO 3: Inserción dirigida de loci de puertos seguros de iCasp9 bajo diversos promotores endógenos y exógenos en hiPSC

Debido a que en el estudio anterior la selección con puromicina bajo el promotor AAVS 1 se expresó de manera robusta para mantener la viabilidad y el crecimiento durante la selección, junto a una construcción donadora que abarca iCasp9 se diseñó para dirigirse al locus AAVS 1 con el promotor AAVS1 endógeno que impulsa la expresión del gen iCasp9 tras la inserción (y genes marcadores GFP y puromicina) (Figura 2A). Las hiPSC se transfectaron con ZFN específicas para el locus endógeno de AAVS1 y la construcción del donante abarca iCasp9 bajo el control del promotor endógeno AAVS1. La selección con puromicina se inició 3 días después de la transfección y continuó durante 20 días antes de que las células resistentes a puro se analizaran por citometría de flujo, y se demostró que tenían expresión de GFP (Figura 2B). Las iPSC resistentes a puro expandidas se sometieron después a tratamiento con AP1903 (o control DMSO) durante 24 h. Las células tratadas se recogieron y se tiñeron con 7AAD y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células negativas para 7AAD, es decir, células vivas, se representó gráficamente para cada tratamiento. Sin embargo, la muerte celular mediada por el AP1903 no se detectó en todos los tratamientos en iPSC con la inserción dirigida de Casp9 en el locus AAVS 1 y la expresión controlada de Casp9 por el promotor AAVS 1 endógeno (Figura 2C). La PCR de unión del ADN genómico del grupo resistente a puro mostró la inserción dirigida de vectores donadores en el locus AAVS1 en estas poblaciones (Figura 2D). Como tal, el gen suicida iCasp9 dirigido a AAVS1 de puerto seguro regulado por el promotor AAVS1 endógeno parece haber fallado para provocar la expresión de iCasp9 a pesar de la inserción correcta en el locus AAVS1. Basándose en la intensidad de la expresión de GFP, nuevamente parece que la expresión de bajo nivel no es suficiente para la muerte celular mediada por iCasp9.

Parece que, a diferencia de otras estrategias de suministro de genes, tales como la integración transgénica mediada por lentivirus donde se introducen múltiples copias del gen por células individuales, en el método de direccionamiento específico del locus, las propiedades de diferentes promotores desempeñarán un papel significativo en el rendimiento funcional. Para examinar qué promotor mantiene una expresión robusta en el nivel deseado, se diseñó una construcción para dirigirse al locus AAVS1 con diversos promotores exógenos que impulsan la expresión de iCasp9, y con el promotor endógeno AAVS1 que conduce a GFP y genes marcadores de puromicina (Figura 2E). Los promotores exógenos probados incluyeron CMV, UBC, PGK, EF1 α y CAG. Las hiPSC se transfectaron con ZFN específicas para el locus AAVS 1 y una construcción donadora que abarca iCasp9 bajo el control de uno de los promotores exógenos seleccionados. La selección con puromicina se inició 3 días después de la transfección y continuó durante 20 días antes de que las células resistentes a puro se analizaran por citometría de flujo para expresión de GFP. Se observaron hiPSCtransfectadas con construcciones que abarcan iCasp9 bajo el control de EF1 α y CAG (véase SEQ ID NO: 1) demostraron una alta expresión de GFP tras la transfección con CAG solo que demuestra una expresión robusta (Figura 2F y Tabla 1). Estas dos estrategias se seleccionaron para su análisis adicional.

Ejemplo 4: Inserción dirigida de iCasp9 impulsada por el promotor Ef1 α en el puerto seguro AAVS1 en iPSC.

Una construcción donadora que abarca iCasp9 impulsada por EF1 α se diseñó para dirigirse al locus AAVS1 según la Figura 2E. Las hiPSCtransfectadas con ZFN específicas para el locus AAVS1 y la construcción donadora que abarca iCasp9 impulsada por EF1 α se seleccionaron con puromicina durante 20 días seguido de tratamiento AP1903. El área cerrada en la Figura 3A que muestra el análisis de citometría de flujo destaca las células iPSC positivas para GFP con inserción dirigida, aunque pocas fueron sensibles a la inducción de muerte celular por AP1903. Para determinar si estas poblaciones positivas para GFP pueden enriquecerse y mantenerse, las hiPSC TRA181 (un marcador que muestra estado pluripotente e indiferenciado) y GFP positivas (indicación de expresión de iCasp9) se clasificaron de forma global o individualmente en la placa de 96 pocillos alrededor del día 16 después de la selección (Figura 3B). Las hiPSC positivas para GFP clasificadas de forma global se mantuvieron en medio libre de puromicina en exceso para determinar el perfil de población a lo largo del tiempo (Figura 3C). Se observó el porcentaje de células que expresan TRA181 alto y GFP alto con el tiempo (por ejemplo, del Día 2 después de la clasificación al Día 16 después de la clasificación). Estos datos sugieren que, aunque EF1 α mostró una expresión de alto nivel, no fue capaz de mantener esa expresión, lo más probablemente debido al silenciamiento en el estado pluripotente. Para determinar si se pudo encontrar hiPSC individuales que contenían la expresión mediada por EF1 α robusta, se cribaron las células individuales clasificadas por hiPSC. La imagen presentada clara de una hiPSC clonal derivada de linfocitos TRA181 y GFP clasificadas por células individuales demostró la morfología de la colonia de hiPSC derivada de una sola célula clasificada (Figura 3D). Las hiPSC cíclicas que tienen inserción dirigida en el locus AAVS1 iCasp9 impulsado por Ef1 α se expandieron después y se evaluaron para determinar la expresión de GFP. Sin embargo, todas las colonias perdieron la expresión de GFP en diversos grados después de la expansión, sugiriendo la incapacidad del promotor EF1 α para mantener la expresión en hiPSC durante la expansión después de la inserción (véase la Figura 3E, EF1 α clon C1 y C23 por ejemplo). Colectivamente, a nivel clasificado de forma global e individual, EF1 α no pudo mantener de manera robusta la GFP y, a su vez, la expresión de iCasp9.

Ejemplo 5: Inserción dirigida de iCasp9 impulsada por el promotor CAG en el puerto seguro AAVS1 en hiPSC

Se descubrió que varios promotores endógenos impulsaron la expresión persistente de iCasp9 durante la expansión clonal de las hiPSC, pero se determinó que el nivel de expresión era demasiado bajo para responder eficazmente al tratamiento con AP1903. También se demostró que la expresión de iCasp9 bajo el control de diversos promotores

exógenos se perdió durante la expansión clonal prolongada de las hiPSC, y no pudo impulsar la muerte celular inducida por AP1903. Las hiPSCtransfectadas con ZFN específicas para el locus AAVS1 y una construcción donadora que abarca iCasp9 impulsada por CAG se evaluaron a continuación (Figura 2E y Tabla 1).

- 5 La selección con puromicina se inició 3 días después de la transfección y continuó durante 16 días antes de que las células resistentes a puro se clasificaran de forma global o individualmente en placas de 96 pocillos para expresión de GFP alta. Las iPSC clasificadas de forma global positivas para GFP después del direccionamiento y la selección con puro se mantuvieron en medio sin puromicina durante 21 días antes de analizarse por citometría de flujo para demostrar si la alta expresión de GFP puede mantenerse durante la expansión de iPSC. La Figura 4B mostró que el
- 10 porcentaje de células positivas para GFP no solo se mantuvo durante la expansión prolongada, sino que el porcentaje de células positivas para GFP fue superior al 99 %. Esta es una observación en primer lugar de que un promotor dirigido a un locus específico fue capaz de mantener una expresión robusta similar a la de un método lentivírico donde se insertan múltiples copias en el genoma. A continuación, se probó la respuesta del gen iCasp9 de la clasificación de forma global manteniendo un 99 % de expresión de GFP. La Figura 4C mostró que cuando se trataron con AP1903, las células positivas para GFP se sometieron a muerte celular inducida y se convierten
- 15 positivas para tinción con 7AAD después del tratamiento. Con la población global CAG que demuestra una expresión robusta que se traduce en una muerte celular mediada por iCasp9 eficaz, los presentes inventores evaluaron a continuación los clones individuales. A continuación, se evaluaron las iPSC resistentes a puro clasificadas clonalmente en una placa de 96 pocillos recubierta con matrigel. La imagen presentada clara de una colonia típica después de la clasificación individual muestra una morfología pluripotente de alta calidad (Figura 4D). Las colonias originadas a partir de una sola célula se expandieron individualmente y se evaluaron para la expresión de GFP y TRA181 mediante citometría de flujo. Se demostró que todas las colonias seleccionadas (por ejemplo, CAG-C5, -C8, -C12, -C38) han mantenido un alto porcentaje de expresión de GFP y TRA181 durante la expansión
- 20 (Figura 4E). La intensidad de fluorescencia media (MFI) de los clones seleccionados se representa en la Figura 4F, teniendo CAG-C5 la más alta MFI, 1500, y CAG-C38 tiene relativamente la MFI más baja entre los cuatro clones, que es 858. La PCR de unión del ADN genómico se realizó con todos los clones GFP+ seleccionados para detectar la recombinación homóloga de la construcción donadora y el locus AAVS 1. Las hiPSC parentales representan la línea hiPSC original antes de la transfección.
- 30 La agrupación de la población CAG hiPSC representa la población después de la transfección dirigida y 16 días de selección con puromicina. La secuencia genómica de GAPDH se amplificó para asegurar la calidad del ADN genómico. Todos los clones positivos para GFP seleccionados demostraron una inserción correcta en el locus AAVS1 (Figura 4G). Por lo tanto, los datos anteriores sugirieron que CAG es el único promotor que tiene la capacidad de mantener de manera robusta una expresión de alto nivel del gen bajo su control durante la expansión de iPSC después de dirigirse al locus AAVS1 en células hiPSC.
- 35

El rendimiento de los promotores adicionales en el momento de la transfección (Día 2-3 después de la transfección), el mantenimiento después de la selección con puromicina (Día 20 después de la selección posterior) y la respuesta funcional después del tratamiento con AP1903 se evaluaron de manera similar. La Tabla 1 a continuación describe el rendimiento de los promotores exógenos CMV, UBC, EF1 α , CAG y PGK, y el promotor endógeno AAVS1. En la

40 Tabla 1, la respuesta del gen suicida se cuantifica basándose en el número de células positivas para GFP que responden al tratamiento con AP1903.

Tabla 1: Mantenimiento de la expresión génica mediada por el promotor dirigido a AAVS1, intensidad y respuesta funcional.

Locus de auto-alojamiento	Promotor	% de GFP (Día 2-3, después de la transfección)	MFI (Día 2-3, después de la transfección)	% de GFP (Día 20, después de la selección)	MFI (Día 20, después de la selección)	Respuesta del gen suicida
AAVS1	CMV	51,7	113	1,6	4,4	-
AAVS1	UBC	20,6	20,3	31,6	16,5	-
AAVS1	EF1a	60	163	2,65	16,5	+/-
AAVS1	CAG	79,4	531	60,9	828	+++
AAVS1	PGK	19,0	15,8	53,8	38,9	-
AAVS1	AAVS1	2	11,1	32,1	31,0	-

Como tal, CAG, entre todos los promotores probados, demuestra el mejor rendimiento en todos los recuentos, y los clones CAG-iPSC se caracterizaron adicionalmente a continuación.

EJEMPLO 6: Caracterización de pluripotencia de los clones CAG-hiPSC

Todos los clones CAG-hiPSC seleccionados se analizaron para determinar la caracterización de pluripotencia. La Figura 5A es la imagen representativa del clon CAG C38 mantenido en cultivo sin alimentador, que muestra un

cultivo homogéneo de hiPSC con células individuales que consisten en una alta relación de núcleos a citoplasma. La tinción de inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia NANOG y OCT4 en la Figura 5B muestra que los clones CAG-hiPSC son pluripotentes y sin diferenciación. También se llevaron a cabo RT-PCR cuantitativas para la expresión de diversos marcadores de pluripotencia endógena que incluyen NANOG, OCT4, SOX2, REX1, DPPA2 y MYC, para representar el estado de pluripotencia de los clones CAG-hiPSC seleccionados (CAG-C5, -C8, -C12, -C38 y -C40). Se muestra que la expresión de NANOG es menor que la iPSC parental en todos los clones CAG-hiPSC. El análisis de citometría de flujo también se realizó para la expresión del marcador TRA181, SSEA3 y CD30. A continuación, los clones CAG seleccionados se dirigieron a la diferenciación específica de linaje y se evaluaron para marcadores de linaje. La Figura 5D muestra la expresión de NESTINA, un marcador para ectodermo; α SMA, un marcador para mesodermo; y SOX17, un marcador para endodermo, después de que los clones CAG seleccionados se dirigieron a la diferenciación. Uno de los clones CAG-iPSC, CAG-C38, se evaluó adicionalmente por su potencial para dar lugar a un teratoma que consiste en diversos linajes. En la Figura 5E, el teratoma se recolectó 6 semanas después de la inyección y demuestra tres capas germinales (endodermo, mesodermo o ectodermo). Estos datos demuestran que los clones CAG-iPSC conservaron la pluripotencia y la capacidad de diferenciarse en células no pluripotentes de todos los linajes.

EJEMPLO 7: Destrucción inducida por el gen suicida de los clones hiPSC en estados tanto pluripotentes como diferenciados con iCasp9 impulsada por CAG marcada como diana en el locus AAVS1

Se trataron veinte clones de hiPSC CAG-iCasp9 marcados como diana con AP1903 (o control de DMSO) durante 24 horas antes de teñir con 7AAD y se analizaron para determinar la tinción de GFP y 7AAD mediante citometría de flujo. Todos los clones han mostrado más del 95 % de tinción positiva para 7AAD después del tratamiento con AP1903 (Figura 6A). También se demostró que las gráficas de citometría de flujo de dos clones representativos (CAG-C5 y -C38) representan la respuesta del gen Cas9 en el estado pluripotente de los clones CAG-iPSC (Figura 6A). Se cultivaron quince clones de iPSC dirigidos a CAG-iCasp9 en pocillos por triplicado en una placa de 12 pocillos. Tras la confluencia, se tiñó un pocillo para la fosfatasa alcalina y se tomó la imagen, otros dos pocillos se trataron con AP1903 (10 nM) durante 48 horas. Los pocillos tratados se lavaron con PBS y se añadió medio fresco para que cualquier célula viva residual se recupere. Ocho días de pocillos recuperados se tiñeron para fosfatasa alcalina y se tomaron imágenes para registrar cualquier supervivencia de los clones de iPSC. De los quince clones, solo el clon CAG-C14 contenía los clones supervivientes, es decir, ha escapado de la muerte inducida (Figura 6B). Los otros catorce clones no mostraron ninguna tinción que indique que ninguna célula sobrevivió tras la expresión inducida de Casp9. La Figura 6C demostró la cinética de cobertura de células vivas del clon CAG-C5 en una placa de 10 cm después del tratamiento con AP1903 (10 nM). Las células vivas comenzaron a morir alrededor de 8 minutos después del tratamiento, y casi todas las células vivas se destruyeron 12 minutos después del tratamiento con AP1903. A continuación, los clones de hiPSC marcados como diana CAG-iCasp9 se indujeron para diferenciarse en células de tres capas germinales, endodermo, mesodermo o ectodermo, y cada una se trató con AP1903 durante 48 horas y se dejó recuperar en medio de diferenciación durante 5 días. Los pocillos replicados antes del tratamiento y después de la recuperación se tiñeron con cristal violeta y se obtuvieron imágenes como se muestra en la Figura 6D. Las imágenes del clon CAG-C5 se mostraron como una representación, demostrando que las células de todos los linajes se sacrificaron después del tratamiento con AP1903. Por último, se indujo que los clones de hiPSC CAG-iCasp9 marcados como diana se diferenciaron en células CD34+ y se trataron con AP1903 durante 48 horas y se analizaron por citometría de flujo para la muerte celular. La tinción elevada de 7AAD mostrada en la Figura 6E indicó la muerte celular CD34+ tras el tratamiento con AP1903. Los datos muestran que, independientemente del estado epigenético de la célula, es decir, estado pluripotente, frente a ectodermo, endodermo o mesodermo, o estado específico del tipo celular tal como células CD34 positivas, CAG dirigido a locus AAVS1 mantiene de manera robusta la expresión de iCasp9.

EJEMPLO 8: Demostración *in vivo* de la regresión inducida por AP1903 de teratomas derivados de clones iCasp9-iPSC

El posicionamiento por inyección subcutánea en los estudios de ratones NSG se mostró en la Figura 7A para demostrar la muerte celular *in vitro* mediada por la expresión e inducción de iCasp9. La línea de hiPSC parental y el clon CAG-C38 se inyectaron en las células 4E6 (Día 0) y se trataron con AP1903 (i.p. 200 μ g total) en los días 7-11. En el día 34, se recolectaron los teratomas y se obtuvieron imágenes para mostrar el tamaño (Figura 7B). De la recolección CAG-C38, un sitio de inyección no contenía ningún tumor mientras el otro consistía en células similares a grasas. Los teratomas recolectados también se midieron en volumen (Figura 7C). De los tumores recolectados, los teratomas de origen CAG-38 hiPSC no se detectaron ni se observaron ser significativamente más pequeños que su control parental. Los teratomas recolectados se tiñeron con hematoxilina y eosina y los resultados de la tinción muestran la diferencia en histología entre los clones parentales de iPSC y CAG-hiPSC (Figura 7D). Si bien la línea hiPSC parental muestra la mayoría de los tipos celulares diferenciados de trilineaje, CAG-C38 parece consistir en su mayoría en células similares a grasas altamente organizadas que presumiblemente contribuyeron del ratón. A continuación, la línea de hiPSC parental y los clones de CAG se inyectaron en 4E6 células y se trataron con AP1903 (i.p. 200 μ g total) en los días 40-46. Todos los tumores se midieron rutinariamente para el volumen y las CAG-iPSC todavía respondían a la expresión del gen Cas9 y provocaban un volumen disminuido de tumores en ratones inyectados con cualquiera de los clones CAG-iPSC seleccionados. En conjunto, los datos demuestran una expresión robusta del promotor CAG dirigido al locus AAVS1 *in vitro* e *in vivo*.

EJEMPLO 9: Edición genómica del locus ROSA26 humano usando CRISPR/Cas9 para la inserción dirigida o independiente de nucleasas de iCasp9

Para probar la sinergia de otras estrategias de direccionamiento y loci de puertos seguros, en este experimento, se probó un locus endógeno diferente del genoma de iPSC para determinar su potencial para la inserción dirigida independiente de nucleasas de un gen exógeno accionado por el promotor CAG. Se diseñó una construcción para dirigirse al locus ROSA26 con CRISPR/Cas9, como se muestra en la Figura 9A. Las hiPSC se transfectaron con ARNg/Cas9-RFP específico para el locus ROSA26 y una construcción donadora que abarca iCasp9 impulsada por CAG. Dos días después de la transfección, la población celular se analizó por citometría de flujo para determinar la expresión de GFP en las células para determinar la eficiencia de transfección, que se muestra estar entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 85 % (Figura 9B). La selección con puromicina se inició 3 días después de la transfección y continuó durante 20 días antes de que las células resistentes a puro se analizaran por citometría de flujo para expresión de GFP. La expresión de GFP se sostuvo durante la expansión de iPSC (Figura 9B). La Tabla 2 a continuación resume los niveles de expresión y la respuesta funcional de iPSC con la construcción mostrada en la Figura 9A.

Tabla 2: Mantenimiento de la expresión génica mediada por el promotor CAG dirigido a ROSA26, intensidad y respuesta funcional:

Locus de puerto seguro	Promotor	% de GFP (Día 2 - 3)	MFI (Día 2-3)	% de GFP (Día 20, después de la selección)	MFI (Día 20, después de la selección)	Respuesta del gen suicida
ROSA26	CAG	89,1	1434	85,2	301	+++

La Tabla 2 demuestra que la inserción génica exógena dirigida por CAG es adecuada para no solo el locus AAVS1, sino también el locus ROSA26 y puede estar mediada por las estrategias de ZFN y CRISPR. También se empleó un diseño adicional de construcción para el locus ROSA26 diana con estrategia independiente de nucleasa, mediante la utilización de brazos homólogos, para probar la factibilidad de la estrategia. La construcción para el locus ROSA26 independiente de la nucleasa consiste en el promotor CAG impulsando GFP e iCasp9 mientras RFP indicará la integración inespecífica (Figura 9C). Las células 293 T y las hiPSCtransfectadas con la construcción en la Figura 9C y seleccionadas por puromicina se enriquecieron cada una para células diana (Figura 9D y Figura 9E). Los datos demuestran que la estrategia independiente de nucleasa también puede aplicarse a la plataforma actual para generar eficientemente hiPSC dirigidas.

En resumen, el promotor CAG mantuvo altos niveles de expresión de iCasp9 durante la expansión clonal a largo plazo de las hiPSC, independientemente de la estrategia de direccionamiento, loci o diferentes estados de diferenciación. Además, estas líneas clonales integradas de iCasp9 se sometieron a una muerte celular rápida en presencia de AP1903, y no se observó supervivencia celular residual cuando los cultivos se dejaron recuperar en ausencia de la molécula dimerizadora. Además, los clones de hiPSC se diferenciaron en tres linajes somáticos *in vitro* y se descubrió que estaban completamente sujetos a la muerte celular inducida por AP1903. Los clones también se diferenciaron específicamente hacia las células hematopoyéticas para demostrar la inducción completa de la muerte celular mediante el tratamiento con AP1903. Cuando se inyecta en ratones NSG para formar teratomas, se observó una respuesta mediada por muerte celular similar *in vivo*. Se observaron resultados similares con integración dirigida impulsada por CAG sin nucleasas en iPSC. Por lo tanto, aparte de ser eficiente, preciso y sostenible, el sistema de integración dirigido impulsado por CAG como se proporciona en el presente documento también es fiable, porque no parece provocar alteraciones del paisaje epigenético que a menudo se ven con otros promotores y/o construcciones, cuyas alteraciones anularían la respuesta mediada por el gen suicida en iPSC, iPSC expandidas o células diferenciadas derivadas de iPSC *in vitro* e *in vivo*. Otro gen exógeno, y/o en diferentes loci seleccionados también pueden aplicarse a esta plataforma. Por ejemplo, además de crear construcciones que contienen GFP e iCasp9, pueden incorporarse genes de diferente funcionalidad a la construcción. Las modalidades de direccionamiento tales como los receptores quiméricos para el antígeno o los receptores de linfocitos T modificados por ingeniería genética también pueden introducirse en un locus específico. En otro ejemplo, el direccionamiento de diversos genes a loci específicos puede realizarse en el momento o la reprogramación. Como se ha discutido anteriormente, la plataforma hiPSC puede seleccionar células individuales con diversidad de atributos, estos atributos pueden incluir una hiPSC reprogramada con éxito en contacto con los genes deseados introducidos en loci específicos.

En particular, un clon hiPSC contenía determinadas células raras y escapó a la muerte celular inducida, y este clon y estas células raras se caracterizaron para evaluar los mecanismos moleculares de escape.

EJEMPLO 10: La caracterización de clones escapados revela una mutación puntual individual en todos los clones expandidos

El procedimiento usado para descubrir los clones supervivientes tras el tratamiento con AP1903 se retiró mediante la recogida y expansión de los clones que sobrevivieron al tratamiento AP1903 (Figura 8A). Como se demuestra, todos

los clones escapados tienen una inserción dirigida correcta mostrada por la PCR de unión. Para determinar si se observan alteraciones de secuencia en los clones escapados, la amplificación por PCR del transgén iCasp9 se llevó a cabo seguido de purificación y secuenciación genómica (Figura 8B). Las secuencias del transgén iCasp9 de esos clones escapados presentaron una mutación puntual única K189E en todos los clones secuenciados (Figura 8C). Para confirmar si K189E es la razón directa de los clones refractarios, se creó la forma mutante iCasp9 según la Figura 2E y se usó para la transfección y se probaron las células de iPSC diana resultantes. La Figura 8E representa que las células de iPSC CAS-iCasp9 m que expresan GFP no responden al tratamiento AP1903, y todas las células sobrevivieron al tratamiento con el mismo nivel alto de expresión de GFP, en comparación con las células iPSC CAS-iCasp9ts.

Ejemplo 11: Enfoques para rescatar los clones escapados que comprenden la mutación de punto individual consenso

El ejemplo anterior mostró que los clones resistentes al tratamiento *in vitro* derivados de una línea refractaria individual comprenden una mutación de punto de inactivación consenso en iCasp9 para todos los clones probados. Sin embargo, se mejoró la cinética de destrucción y se redujo la velocidad de resistencia *in vitro* e *in vivo* seleccionando clones hiPSC con inserciones bialélicas iCasp9. Por lo tanto, para proteger contra el potencial de desarrollar resistencia a un solo sistema de seguridad inducible, se exploró la generación y la selección de clones de hiPSC que contienen múltiples genes suicidas condicionales, incluyendo la timidina quinasa del virus iCasp9 y del virus del herpes simple, cada una incorporada en un locus de puerto seguro único. El sistema de protección doble seguro se comparó *in vitro* e *in vivo* con el interruptor de seguridad iCasp9 único para evaluar la seguridad y la eliminación eficiente de las células injertadas.

EJEMPLO 12: Número de copias de la inserción dirigida de iCasp9 impulsada por el promotor CAG en el puerto seguro AAVS1 en hiPSC

La evaluación cuantitativa basada en PCR del número de copias del transgén (iCasp9-GFP) en los clones iCasp9 impulsados por el promotor CAG reveló que un pequeño número de clones tiene más de una copia del transgén. Como se muestra en la Figura 10A, un número de copias de 1 sugiere una integración de iCasp9 mono-alélica, un número de copias de 2 sugiere una integración bialélica de iCasp9, mientras que mayor que 2 sugiere una posible integración aleatoria. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de iCasp9-GFP, como se muestra en la Figura 10B, en cultivo agrupado clasificado o en clones con inserciones dirigidas a iCasp9 monoalélicas o bialélicas demostró que el nivel de expresión del transgén corresponde al número de copias, cuanto mayor es el número de copias, mayor es la lectura de MFI. El análisis por PCR de la integración del transgén mediante el uso de cebadores que se superponen a la unión del transgén AAVS1 en células y clones agrupados dirigidos confirmó la integración específica de transgén iCasp9-GFP en el locus AAVS1 (Figura 10C). Se usaron cebadores específicos para el sitio de integración AAVS1 para evaluar el número de alelos que tenían integraciones dirigidas. La falta de una banda sugiere que el sitio de integración en ambos alelos AAVS1 fue alterado, es decir, inserción bialélica, mientras que la presencia de una banda sugiere que uno o ambos alelos no están perturbados (Figura 10D). Como se muestra en las Figuras 10C y 10D, los clones CAG-C5 y CAG-C35 tienen inserción bialélica de dos copias de transgén, mientras que el clon CAG-C38 tiene una copia insertada en la ubicación dirigida en un alelo. La cobertura de la superficie de la placa se evaluó inmediatamente después de la adición de AP1903 10 nM usando obtención de imágenes de células vivas. Como se muestra en la Figura 10E, las células de la agrupación dirigida no clasificadas (integradas y no integradas) tienen la capacidad de destrucción menos inducida, mientras que las células de la agrupación dirigida clasificadas para iCasp9-GFP (integración dirigida y aleatoria, con números de copias variables) mostraron una capacidad de destrucción inducida ligeramente mejor. Las líneas celulares CAG-C38 (inserción dirigida mono-alélica) y CAG-C5 (inserción bialélica) clonales tienen una tasa de destrucción y eficiencia mucho más altas en comparación con las células agrupadas.

EJEMPLO 13: Comparación de clones iCasp9 bialélicos y mono-alélicos trasplantados en destrucción inducible y regresión de teratomas *in vivo*

Los estudios de ratones NSG con inyección de posicionamiento subcutánea se mostraron en la Figura 11A para demostrar la muerte celular *in vivo* mediada por la expresión de iCasp9 y la inducción en el clon CAG-C38, el grupo CAG, el grupo PGK (transgén PGK-iCasp9), el grupo UBC (transgén UBC-iCasp9) y el grupo CMV (transgén CMV-iCasp9). El clon CAG-C38 y los grupos se inyectaron en tres grupos de ratones NSG (n=2) en 4E6 células el Día 0 y los ratones se trataron con AP1903 (i.p. 125 µg) en los días 19-25. En el día 28, se recolectaron los teratomas y se obtuvieron imágenes para mostrar el tamaño. La obtención de imágenes por bioluminiscencia de los 3 grupos de ratones NSG antes (Figura 11B, paneles superiores) y 3 días después del final de la administración AP1903 (Figura 11B, paneles inferiores) mostró que solo el promotor CAG exógeno permitió la eliminación mediada por iCasp9 de teratomas establecidos derivados de iPSC. Esta observación se representó adicionalmente en la Figura 11C-11G Flujo Total (fotones/s) indicativo de la cantidad de células tumorales en teratomas a partir de los tipos de células indicados que se muestran como promedio y SD en la Figura 11C corroborado con los descubrimientos del tamaño de los teratomas en la Figura 11B. La relación de flujo total después del tratamiento a la anterior (promedio ±SD) para los tipos de células indicados se mostró en la Figura 11D. Los resultados de los ratones inyectados con las células clonales CAG-C38 y CAG se representaron gráficamente por separado en la Figura 11E con una mayor definición. Las mediciones del volumen terminal de teratomas derivados de los tipos de células indicados el Día 28

se demostraron en la Figura 1 1F. La Figura 11G muestra la imagen de teratomas derivados de tipos de células indicados el día 28. No se detectaron teratomas a partir de los lados inyectados con el clon CAG-C38 o células agrupadas CAG-iCasp9. Colectivamente, estos datos confirmaron estudios *in vitro* de los diferentes promotores que impulsan la expresión de transgén iCasp9-GFP y mostraron que el promotor CAG es el más eficaz entre los probados *in vitro* e *in vivo*. Los datos también indican que el clon CAG-C38, a pesar de mono-alélico para iCasp9-GFP, es más eficaz que las células agrupadas CAG en la eliminación de teratomas tras la inducción del gen suicida.

Por otra parte, se probó la destrucción inducible de clon iCasp9 bialélico trasplantado y se comparó con la del clon iCasp9 mono-alélico. Los estudios de ratones NSG con inyección de posicionamiento subcutáneo se mostraron en la Figura 12A para demostrar la muerte celular *in vitro* mediada por la expresión de iCasp9 e inducción en células parentales, clon CAG-C5 y clon CAG-C38. Los tipos celulares respectivos se inyectaron en 4 grupos de ratones NSG (n=2) el Día 0 y los ratones se trataron con AP1903 (i.p. 125 µg) en los días 7-13. El día 7, 14 y 42 se tomaron imágenes de teratomas. En el Día 42, se recolectaron los teratomas y se obtuvieron imágenes para mostrar el tamaño.

Obtención de imágenes por bioluminiscencia de ratones NSG trasplantados con tipos de células indicados (clon CAG-C5 bialélico, clon CAG-C38 monoalélico e iPSC parentales) el día 7, 14 y 42 después del trasplante de iPSC (Figura 12B). La obtención de imágenes en el día 7 se realizó inmediatamente antes de la administración AP1903 (125 µg i.p.; día 7-13). Los paneles intermedios muestran imágenes de teratomas recolectados, si se encuentran, el Día 14, y los paneles inferiores muestran imágenes de teratomas recolectados, si se encuentran, el Día 42. Como se muestra, tanto CAG-C5 como CAG-C38 son capaces de eliminar teratomas el Día 14 en todos los ratones probados. Sin embargo, los teratomas regresaron en ratones trasplantados con CAG-C38 no más tarde que el Día 42, mientras que los teratomas eliminados en ratones trasplantados con CAG-C5 no crecieron de nuevo. La Figura 12C muestra la imagen de teratomas derivados de tipos de células indicados el día 42. El flujo total (fotones/s) para teratomas de los grupos indicados mostrados como promedio y SD en la Figura 12D se corroboró con los datos de obtención de imágenes en las Figuras 12B y 12C. En conjunto, estos datos demostraron destrucción inducible más eficaz de clon iCasp9 bialélico trasplantado que el del clon de iCasp9 monoalélico.

EJEMPLO 14: Generación de un sistema de guardia segura con genes suicidas dobles dirigidos a loci de puertos seguros separados

Para demostrar la capacidad y la efectividad de la ingeniería de precisión de alta resolución a nivel de célula individual, se generaron iPSC clonales que tenían un sistema de protección seguro con genes suicidas dobles dirigidos a loci de puertos seguros separados. Además de CAG-iCasp9 integrado en el locus AAVS1, CAG-sr39TK se integró en el alojamiento seguro H11 en iPSC clonal CAG-C38 mediante el uso del método de inserción dirigida descrito en el presente documento. Como se muestra en la Figura 13A, el análisis de PCR confirmó la integración genómica específica de sr39TK en el locus de puerto seguro H11 mediante el uso de cebadores específicos para sr39TK, la unión de sr39TK-blasticidina (Bsd) o la unión de secuencia de H11 endógena-transgén, usándose GAPDH como control de carga. El clon de iPSC iCasp9 con inserción dirigida de sr39TK en el locus H11 (no clonal para sr39TK) se trató con 25 µg/ml de Ganciclovir (GCV) con AP1903 10 nM. El tratamiento del clon de iCasp9 CAG-C38 (mono-alélico para iCasp9) con AP1903 solo durante dos días condujo a la destrucción inducible de la mayoría de las células pero permanecieron células raras (Figura 13B(ii)). Tratamiento de clon de iCasp9 CAG-C38 con tratamiento GCV solo durante nueve días dio lugar a células refractarias expandidas con GCV (Figura 13B(iii)). Sin embargo, el tratamiento concurrente con ambos AP1903 y GCV, todas las células refractarias se eliminaron eficazmente lo que indica que el uso del sistema de protección seguro para suicidio doble es más eficaz que el uso del gen suicida iCasp9 solo para matar las células residuales que escapan bajo el gen suicida inducible.

También se proporciona en el presente documento el diseño de iPSC que comprenden un casete inducible en un locus de alojamiento seguro, para la expresión controlable de un gen de interés. La inserción específica del locus del casete inducible tiene lugar en el nivel de iPSC. La expresión del gen de interés, un CAR aquí, representado como un ejemplo, se inactiva por codones de parada de traducción flanqueados por dos sitios loxP. Tras una inducción de una sola vez por la recombinasa Cre (Figura 33A) o la Doxiciclina (Figura 33B), los codones de parada se eliminan como resultado y se activa la expresión de CAR. El inductor puede administrarse en cualquier etapa elegida durante la diferenciación de iPSC *ex vivo*, lo que facilita la optimización del procedimiento de diferenciación. El CAR es impulsado por un promotor constitutivo fuerte para un alto nivel y una expresión duradera en el producto final, tal como iT o iNK.

También se desarrolló una estrategia novedosa para dirigirse de manera única a un locus de elección para la interrupción específica del gen mientras que al mismo tiempo inserta nuevos genes de interés en la población de hiPSC, que posteriormente se clasifica en una sola célula de una manera de alto rendimiento para seleccionar clones hiPSC que contienen todos los criterios requeridos incluyendo el número de copias único de los genes insertados, la alteración funcional del gen diana y la ausencia de efecto inespecífico. La Figura 34A demuestra un diseño de construcción para el vector diana que contiene la unión a nucleasa dirigida de cadena negativa y positiva y el vector donador que contiene brazos de homología para B2M, un gen ejemplificado para interrupción, y genes de interés (por ejemplo, CD16, HLA-G y PDL1) para la inserción en el locus interrumpido. La Figura 34B representa una

ilustración de la selección de iPSC después de la edición genética para una población clonal que contiene genes de elección en el locus de elección.

Ejemplo 15: Generación de iPSC B2M^{nulo} (B2M^{-/-}), deficientes en HLA-I y modificaciones de las mismas

Para demostrar la capacidad de realizar una edición genética de célula individual para lograr modificaciones del complejo HLA, se transfectó una línea de iPSC con un par de ARNg dirigido a B2M en un plásmido que expresa nickasa Cas9, que se diseña para proporcionar efectos inespecíficos en comparación con Cas9 de tipo silvestre. La Figura 14A mostró el análisis por citometría de flujo de GFP y B2M y la expresión de HLA-I antes (panel izquierdo) y después de la transfección (panel central). Se detectaron B2M y HLA-I simultáneamente usando anticuerpos específicos de B2M y HLA-I conjugados con el mismo colorante. Las células negativas para B2M y HLA-I (población cerrada) se clasificaron de forma global (Figura 14A) o clonalmente en placas de 96 pocillos para generar líneas clonales (Figura 14B). Los clones B2M^{-/-} y deficientes en HLA I que usan edición dirigida se analizaron adicionalmente mediante secuenciación de ADN genómico clonal y se confirmó que tenían delecciones pequeñas o inserciones que conducen a fenotipo de desactivación génica B2M.

Las iPSC deficientes en HLA de clase I (iPSC B2M^{-/-}, también llamadas iPSC nulas para HLA I) se modificaron después genéticamente, por ejemplo, mediante el uso de lentivirus para introducir una proteína de fusión HLA-E/B2M con el fin de modificar adicionalmente las células deficientes en HLA I. La calidad (es decir, el estado de pluripotencia) de las iPSC deficientes para HLA I modificadas (iPSC B2M^{-/-} HLA-E) se evaluó mediante citometría de flujo para los marcadores de pluripotencia TRA-181 y SSEA4, así como la expresión de HLA-E. La Figura 16A muestra que las iPSC deficientes en HLA modificadas expresan HLA-E en la superficie celular y mantienen un fenotipo pluripotente. Se observaron resultados similares cuando los nucleótidos que expresan la proteína de fusión HLA-E/B2M se integran en las iPSC deficientes en HLA I en comparación con los resultados de la transducción de lentivirus.

Las iPSC B2M^{-/-} HLA-E se modificaron genéticamente de forma posterior para contener la proteína PDL1, generando una iPSC deficiente en HLA I: iPSC B2M^{-/-} HLA-E PDL1. Adicionalmente, las iPSC B2M^{-/-} se modificaron genéticamente para contener la proteína de fusión HLA-G/B2M y después se modificaron genéticamente para contener la proteína PDL1, generando otra iPSC B2M nulo HLA I modificado: iPSC B2M^{-/-} HLA-G PDL1. La Figura 21A muestra la expresión de HLA-E, HLA-G y PDL1 en la superficie celular de las iPSC deficientes en HLA I modificadas. Se observaron resultados similares cuando los nucleótidos que expresan la proteína de fusión HLA-G/B2M se integran en las iPSC deficientes en HLA I.

Para determinar si las iPSC deficientes en HLA-I modificadas mantuvieron su capacidad de diferenciación hematopoyética, diversas iPSC deficientes en HLA-I modificadas (B2M^{-/-}, B2M^{-/-}HLA-E, B2M^{-/-}HLA-E/PDL1, B2M^{-/-}HLA-G y B2M^{-/-}HLA-G/PDL1) se diferenciaron respectivamente a CD34⁺ HE mediante el uso del protocolo de diferenciación iCD34 usado en el presente documento. La Figura 21B demuestra que todas las iPSC deficientes en HLA I modificadas pueden diferenciarse a CD34⁺ HE como se ve por citometría de flujo después de 10 días de diferenciación. Las células CD34⁺ se aislaron y se colocaron en cultivos de diferenciación iNK o iT linfóide. La Figura 22 demuestra que la modulación de las iPSC deficientes en HLA I mediante modalidades de resistencia inmunitaria genéticamente modificadas, por ejemplo, HLA-E, HLA-G o PDL1, no perturban la capacidad de las células iCD34 para generar células ProNK (progenitor NK; CD45+CD56) y ProT (progenitor de linfocitos T; CD45+CD34+CD7+) después de 10 días adicionales de diferenciación como se ve por citometría de flujo. Se observaron resultados similares cuando los nucleótidos que expresan la proteína PDL1 se integran en las iPSC deficientes en HLA I.

Para determinar si la expresión de proteínas inmunorresistentes genéticamente modificadas se mantiene durante la diferenciación hematopoyética, las células iNK que se diferenciaron durante 20 días de células CD34⁺ deficientes en HLA-I modificadas se evaluaron para determinar la expresión de HLA-E, HLA-G y PDL1 en la superficie celular mediante citometría de flujo. La Figura 23A demuestra que las proteínas HLA-E y HLA-G están ausentes mientras que la expresión de PDL1 se mantiene. Para determinar si las proteínas HLA-E y HLA-G se escindían de la superficie celular durante los lisados de proteínas de diferenciación hematopoyéticas de células iNK de 20 días y los sobrenadantes de los medios de cultivo de 20 días se examinaron para determinar la expresión de la proteína HLA-E y HLA-G mediante análisis de transferencia western. La Figura 23B demuestra que las proteínas HLA-E y HLA-G se encuentran en las fracciones sobrenadantes y, por lo tanto, concluye que las proteínas HLA-E y HLA-G se están desprendiendo de la superficie celular de las células NK derivadas de iPSC.

Para mantener una persistencia mejorada de las células efectoras linfoides derivadas de iPSC deficientes en HLA modificadas se diseñaron las formas resistentes a la escisión de las proteínas de fusión HLA-E/B2M y HLA-G/B2M (Figura 24A) y las iPSC B2M^{-/-} se modificaron genéticamente para contener la proteína de fusión HLA-G/HLA-A3 no escindible. La Figura 24B demuestra que la proteína HLA-G/HLA-A3 no escindible se expresa en la superficie celular mediante citometría de flujo para la expresión de HLA-G y no afecta la calidad de la iPSC como se ve por la expresión de proteínas pluripotentes (TRA-181, SSEA4, NANOG y OCT3/4).

Un método alternativo para crear iPSC deficientes en HLA de clase I es interrumpir el complejo de carga de péptidos (PLC) que es responsable de cargar péptidos en moléculas de HLA de clase I. El transportador asociado al

procesamiento de antígenos (TAP) es un miembro integral del PLC y la interrupción del gen da como resultado una disminución significativa de las moléculas estables de HLA de clase I en la superficie celular. Se desconoce, sin embargo, si las iPSC TAP2^{nulo} (TAP 2-/-), deficientes en HLA I tienen cualquier efecto sobre el potencial de diferenciación o la persistencia de las iPSC. Para generar líneas iPSC TAP2^{nulo} se transfectaron iPSC FTi121 con par de ARNg TAP2 en un plásmido que expresaba nickasa Cas9. Las células negativas/bajas para HLA-I se clasificaron clonalmente en placas de 96 pocillos para generar líneas clonales. La Figura 25A muestra el análisis de citometría de flujo de 2 clones seleccionados que presentan una disminución significativa en la expresión de HLA de clase I en comparación con FTi121 parental. El tratamiento de iPSC con IFN γ induce la regulación positiva de moléculas de HLA de clase I en la superficie. La Figura 25B demuestra que después del tratamiento con IFN γ , los clones de TAP 2-/- presentan una expresión disminuida de HLA de clase I en comparación con FTi121 de tipo silvestre que sugiere una estrategia única para identificar un nivel óptimo de expresión del complejo HLA para evadir tanto la detección de linfocitos T como las células NK.

EJEMPLO 16: Las iPSC B2M-/- y deficientes en HLA I tienen persistencia mejorada

Para determinar si la ausencia de HLA-I permite que las hiPSC B2MH-/- evadan la respuesta linfocitaria T, los linfocitos T de sangre periférica se cebaron cocultivando con hiPSC durante 10 días. Después de 10 días los linfocitos T expandidos y cebados se recolectaron y se usaron como células efectoras citotóxicas. Las células diana hiPSC de tipo silvestre (TS) o B2M-/- (modificadas por ingeniería genética) se sembraron solas o en cocultivo con linfocitos T cebados en una relación de 1:3. El número de células diana por pocillo se midió durante 5 días usando Incucyte Zoom. Como se muestra en la Figura 15A, las células diana hiPSC TS fueron reconocidas y destruidas por los linfocitos T cebados mientras que las hiPSC modificadas por ingeniería genética no se vieron afectadas.

Aunque se demostró que las hiPSC B2M-/- eran capaces de evadir el reconocimiento y la muerte por los linfocitos T, hubo una preocupación de que estas células pudieran ser destruidas de manera más eficiente por las células NK porque las células NK son conocidas por las células que carecen de MHC clase I, que es el caso de las células que carecen de B2M; y si es así, eso podría contribuir al rechazo *in vivo*. Para probar si las hiPSC B2m-/- han aumentado el reconocimiento de células NK, las células K562, las células CD45+ diferenciadas de las iPSC de tipo silvestre (TS) o células CD45+ diferenciadas de iPSC B2M-/- (B2M^{-/-}) se marcaron por separado con CFSE, tinte de proliferación e670 (eBioscience) o tinte de proliferación e450 (eBioscience), respectivamente. Las tres células diana marcadas se mezclaron en relaciones iguales y se añadieron a los efectores de las células NK en un solo pocillo en las proporciones indicadas (Figura 15B), o las tres células diana marcadas se añadieron cada una a los efectores de las células NK en los pocillos separados respectivos (Figura 15C). Las células se incubaron durante 4 horas antes de la cuantificación basada en citometría de flujo de la citotoxicidad celular. Como se muestra en las Figuras 15B y 15C, parecía que no había un aumento del reconocimiento de células NK *in vitro*, donde tanto las células B2M-/- como TS hiPSC CD45+ se sacrificaron a la misma velocidad, y tanto a niveles relativamente bajos, en comparación con la destrucción de células K562, se incluyó una diana de células NK conocida como control positivo. Por lo tanto, los datos sugirieron que esta línea de iPSC B2M-/- es capaz de evitar la muerte mediada por linfocitos T sin inducir el reconocimiento de células NK, lo que indica una línea clonal hiPSC compatible con donante/receptor universal con persistencia mejorada.

La persistencia mejorada de la línea clonal B2MH-/- universal se evaluó adicionalmente *in vivo*. Para determinar si la ausencia de HLA-A permite un aumento de la persistencia en presencia de un sistema inmunitario competente *in vivo*, se inyectaron hiPSC TS luciferizadas (TS) e hiPSC B2M-/- (modificadas por ingeniería genética) por vía subcutánea y bilateralmente en ratones receptores inmunodeprimidos NSG (Figura 15D izquierda) o TS C57BL/6 inmunocompetentes (Figura 15D derecha) para formar teratomas. Después de 96 horas, los ratones se sometieron a obtención de imágenes bioluminiscentes IVIS para detectar el teratoma. En el receptor NSG, tanto los teratomas TS como modificados por ingeniería genética se detectaron con la misma intensidad, mientras que en los ratones TS C57BL/6 las hiPSC B2M-/- modificadas por ingeniería genética exhibieron una persistencia aumentada en comparación con las hiPSC TS.

EJEMPLO 17: La modulación de HLA de clase I en iPSC aumenta la persistencia de iPSC *in vivo*

Para determinar si las iPSC deficientes para HLA I modificadas tienen un aumento de la persistencia *in vivo*, se inyectaron iPSC de tipo silvestre luciferizadas y B2M-/- HLA-E por vía subcutánea en los flancos opuestos de los receptores C57BL/6 completamente inmunocompetentes en un ensayo de teratoma. Los ratones se analizaron diariamente mediante obtención de imágenes IVIS junto con inyección de luciferina para visualizar el teratoma en desarrollo. La Figura 16B demuestra que a las 72-144 horas después de la inyección las iPSC B2M-/- HLA-E muestran una persistencia cuantitativa aumentada de aproximadamente 6 veces en comparación con iPSC de tipo silvestre. Los tres ratones representativos que representan la obtención de imágenes de luciferina aumentadas con los teratomas de iPSC B2M-/-HLA-E también se presentaron en la Figura 16B. Se observó una mejora similar en la persistencia cuando se usó HLA-G en lugar de HLA-E. Además, como se ha descrito anteriormente, se aplica una versión modificada de HLA-E o HLA-G para evitar la escisión para mejorar aún más la persistencia *in vivo* de las iPSC modificadas con HLA de clase I. Curiosamente, los presentes inventores reconocieron que en algunos escenarios donde la célula NK obtenida de donantes CMV+ exhibe la expresión de NKG2C y, por lo tanto, se activan, la expresión de la superficie de HLA-E activa en su lugar NKG2C y por lo tanto conduce a efectos adversos

que incluyen el reconocimiento de células NK y la destrucción resultante de las células que expresan HLA-E. En contraste con donde la célula NK expresa NKG2A, las células NK pueden inactivarse mediante las iPSC que expresan HLA-E de superficie y la progenie diferenciada, aumentando de esta manera la persistencia de estas células que expresan HLA-E en superficie.

Para determinar qué componente de la respuesta inmunitaria del hospedador está implicado en el rechazo de las iPSC deficientes en HLA modificadas mejoradas en ratones receptores de tipo silvestre, los linfocitos T CD4+, los linfocitos T CD8+ y las células NK se agotaron individualmente mediante la inyección de anticuerpos anti-CD4, anti-CD8a y anti-NK1.1 respectivamente. La Figura 26A demuestra la ausencia de los linfocitos T CD4+, los linfocitos T CD8+ y las células NK tres días después de la inyección de anticuerpos. Tres días después del agotamiento mediado por anticuerpos, se inyectaron iPSC modificadas con B2M/- HLA I luciferizadas por vía subcutánea en el flanco de ratones C57BL/6 inmunocompetentes para formar un teratoma. Los ratones se analizaron diariamente mediante obtención de imágenes IVIS junto con inyección de luciferina para visualizar el teratoma en desarrollo. La Figura 26B demuestra que a las 120 h después de la inyección de iPSC los ratones en los cuales se agotaron las células NK exhibieron la resistencia más alta al rechazo tumoral en comparación con los animales tratados con IgG control.

Para determinar si las iPSC modificadas con HLA I genéticamente modificadas tienen una persistencia y resistencia aumentadas *in vitro* se cultivaron iPSC modificadas B2M/- PDL1 HLA-I en suspensión durante 3 días y después se trataron con IFN γ durante 24 horas para inducir la expresión de HLA de clase I. Las iPSC tratadas se colocaron después en cocultivo con linfocitos T purificados alogénicos (Figura 27A), linfocitos T alogénicos y células NK contenidas en células mononucleares de sangre periférica completa (PBMC, Figura 27B y 27C) que se marcaron previamente con Cell Trace Violet (CTV) para controlar la proliferación celular. Los linfocitos T/PBMC solos (sin estimular) y linfocitos T/PBMC con perlas anti-CD3/CD28 (estimulados) para inducir la activación y proliferación se usaron como controles. 12 días después del inicio del cocultivo, las células se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar la cantidad de proliferación de los linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células NK CD56+ como una medida de su capacidad para reconocer y responder a células derivadas de iPSC con HLA I modificado. La Figura 27A y 27B demuestra que en comparación con los linfocitos T que se cocultivan con células derivadas de iPSC de tipo silvestre, los linfocitos T que se cocultivan con B2M/- y adicionalmente B2M/-HLA I modificado exhibieron menos proliferación como se ve por dilución del tinte de proliferación de CTV. La Figura 27C demuestra un efecto similar sobre la proliferación de células NK colectivamente que significa la capacidad de las modificaciones de HLA de clase I para mejorar la resistencia inmunitaria a los linfocitos T y células NK.

EJEMPLO 18: Generación de iPSC con propiedades mejoradas a través de la edición adicional

Las moléculas que se modifican o se modulan en el nivel de iPSC pueden usarse para mejorar las propiedades convenientes en las terapias inmunitarias mediante el uso de los linfocitos derivados obtenidos a través de la presente plataforma de diferenciación. Estas moléculas pueden incluir proteínas del interruptor de seguridad, modalidades de direccionamiento, receptores, moléculas de señalización, factores de transcripción, proteínas y péptidos farmacéuticamente activos, candidatos diana del fármaco; o proteínas que promueven el injerto, el tráfico, la localización, la viabilidad, la autorrenovación, la persistencia, la regulación y la modulación de la respuesta inmunitaria y/o la supervivencia de las iPSC o células derivadas de las mismas. Además de B2M/HLA-I y HLA-E/G, las moléculas dirigidas que contribuyen a las propiedades deseables incluyen además, pero no se limitan a, receptor CD16 y molécula coestimuladora 41BBL, CD3, CD4, CD8, CD47, CD113, CD131, CD137, CD80, PDL1, A_{2A}R, CAR (receptor quimérico para el antígeno), TCR (receptor de linfocitos T), TAP1, TAP2, Tapasina, NLRC5, PD1, LAG3, TIM3, RFXANK, CIITA, RFX5, RFXAP, cualquier gen en la región del cromosoma 6p21, un acoplador y un receptor de activación de superficie para acoplar los acopladores bi o multiespecíficos o universales. Más específicamente, la modificación genética de las moléculas dirigidas en iPSC incluye uno o más de delección o expresión reducida de B2M, TAP1, TAP2, Tapasina, NLRC5, PD1, LAG3, TIM3, RFXANK, CIITA, RFX5, RFXAP y cualquier gen en la región del cromosoma 6p21; expresión introducida o aumentada de HLA-E, HLA-G, HACD16, 41BBL, CD3, CD4, CD8, CD47, CD113, CD131, CD137, CD80, PDL1, A_{2A}R, CAR, TCR, receptor Fc, un acoplador o receptores de activación de superficie para acoplar con acopladores bi o multiespecíficos o universales. La expresión aumentada o reducida de las moléculas diana puede ser permanente, transitoria, temporal o inducible, y puede controlarse mediante promotores endógenos o exógenos.

Esta modalidad deseada puede introducirse en iPSC mediante el uso de diversos métodos de suministro conocidos en la técnica. En esta ilustración ilustrativa, las iPSC se modificaron genéticamente para contener el receptor CD16 no escindible de alta afinidad (hnCD16) y las moléculas coestimuladoras 41BBL para generar iPSC que tiene citotoxicidad mejorada. La Figura 17A demuestra la expresión eficiente de hnCD16 y 41BBL sobre la superficie de iPSC después de la transducción lentivírica por análisis de citometría de flujo. La Figura 17B demuestra que la expresión de la expresión de hnCD16 y 41BBL se mantiene y no perturba la capacidad de iPSC para generar células CD34+ HE después de 10 días de diferenciación.

Para evaluar si la expresión de la proteína hnCD16 (receptor CD16 no escindible de alta afinidad) afecta a la diferenciación hematopoyética de iPSC modificadas por ingeniería genética, la agrupación de iPSC genéticamente modificadas con hnCD16/41BBL se clasificaron clonalmente en placas de 96 pocillos. Se seleccionaron tres clones

positivos y se diferenciaron durante 10 días para generar células iCD34+. La Figura 28A demuestra la expresión homogénea de hnCD16 y 41BBL en HE CD34+ como se ve por citometría de flujo. Las células CD34+ se aislaron y se diferenciaron adicionalmente durante 10 días en condiciones de promoción de NK para generar células proNK. La Figura 28A muestra que los progenitores NK CD56+ mantienen altos niveles de expresión de la proteína hnCD16 y demuestran que la expresión de hnCD16 y 41BBL no perturba la capacidad de diferenciación hematopoyética de las iPSC modificadas por ingeniería genética.

El receptor endógeno CD16 expresado por las células NK se escinde de la superficie celular después de la activación de las células NK. Para confirmar que la proteína modificada por ingeniería genética hnCD16 no se escinde, las células iNK que expresan hnCD16 y las células NK derivadas de sangre periférica (PB) se cultivaron en 1) cultivo homeostático, 2) cultivo homeostático en presencia o ausencia de un inhibidor de TACE/ADAM que suprime la escisión de CD16 o 3) estimuladas con células diana K562 para promover la activación de células NK y posterior desprendimiento de CD16. Las células NK derivadas de PB y las células iNK sin estimulación representan el control homeostático. La Figura 28B demuestra que la pérdida de células NK derivadas de PB de la expresión de CD16 durante el cultivo homeostático se reduce o se inhibe por el inhibidor de TACE/ADAM y tras el cocultivo con células diana K562, se aumenta la pérdida de expresión de CD16. Por el contrario, la expresión de CD16 en las iNK modificadas por ingeniería genética hnCD16 permanece constante tras la activación de células iNK por células diana K562, confirmando de esta manera la integridad del receptor CD16 de alta afinidad no escindible.

Para evaluar la funcionalidad mejorada del receptor de hnCD16 las células iNK que expresan hnCD16 se dejaron sin estimular o se estimularon con 5 ug/ml de anti-CD16, o con una relación 1:1 de células P815 solas o en combinación con 5 ug/ml de anti-CD16 se evaluaron las células iNK por citometría de flujo para liberación y desgranulación de citocinas proinflamatorias que son las señas de identidad de la activación de las células NK. La Figura 29A representa células iNK clasificadas en la fracción CD45+CD56+CD3- y muestran la expresión superficial de IFN γ , TNF α y CD107a. Las células iNK que expresan hnCD16 tienen una expresión aumentada de TNF α y CD107a en respuesta al anticuerpo anti-CD16, que puede mejorarse aún más mediante el cocultivo con células P815 y anti-CD16. Estos datos demostraron que el receptor hnCD16 es funcional en células iNK derivadas de iPSC.

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo de lisis mediada por células NK a través de la unión de CD16 a células diana recubiertas de anticuerpo. Para evaluar la función ADCC, las células iNK que expresan hnCD16 se cocultivaron con células diana SKOV marcadas con rojo nuclear con o sin anticuerpo Herceptin durante 120 horas. La cuantificación de las células diana se analizó cada 2 horas con el sistema de análisis de células de Incucyte ZOOM (Essen BioScience, Ann Arbor, Michigan). La Figura 29B demuestra que las células iNK que expresan hnCD16 tienen una potente ADCC en presencia de anticuerpo Herceptin que proporciona evidencia adicional de la funcionalidad mejorada de las células iNK modificadas por ingeniería genética.

Para evaluar adicionalmente la calidad de las células iNK derivadas de iPSC, los cultivos se colocaron en condiciones promotoras de la expansión como sigue. Se obtuvieron CD45+CD3-CD56+ (~66 %) el día 18 de la diferenciación iNK a partir de células CD34+. Las células ($2,5 \times 10^5$ /ml) se cultivaron semanalmente con números iguales de alimentadores de K562/mbIL-21/41BBL irradiados más 250 U/ml de rhIL-2. Después de cada ronda de adición de alimentador, se añadió medio fresco (B0) más IL-2 el día 3. Las células se diluyeron a $2,5 \times 10^5$ /ml en el día 5 y se alimentaron con medio fresco más IL-2 (250 U/ml). Se usaron recuentos celulares y citometría de flujo para determinar la multiplicidad de expansión de las células NK. La Figura 30 demuestra que las células iNK experimentan una expansión de 495 veces durante 15 días de cultivo.

En consecuencia, las iPSC se generaron para comprender uno o más de B2M nulo o bajo, HLA-E/G, PDL1, A_{2A}R, CD47, LAG3 nulo o bajo, TIM3 nulo o bajo, TAP1 nulo o bajo, TAP2 nulo o bajo, Tapasina nula o baja, NLRC5 nulo o bajo, PD1 nulo o bajo, RFXANK nulo o bajo, CIITA nulo o bajo, RFX5 nulo o bajo y RFXAP nulo o bajo. Estas células con HLA de clase I y/o II modificados tienen una mayor resistencia a la detección inmunitaria y, por lo tanto, presentan una persistencia *in vivo* mejorada. Por otra parte, tales células pueden evitar la necesidad de una coincidencia de HLA en la terapia celular adoptiva y, por lo tanto, proporcionar una fuente de régimen terapéutico universal, disponible.

También se generan las iPSC que comprenden uno o más de HLA-E, HLA-G, CD16, 41BBL, CD3, CD4, CD8, CD47, CD113, CD131, CD137, CD80, PDL1, A_{2A}R, CAR y TCR, proporcionando una capacidad efectora inmunitaria mejorada.

EJEMPLO 19: Las iPSC derivadas de CAR-T retienen el CAR

Los receptores quiméricos para el antígeno (CAR) son receptores transmembrana modificados por ingeniería genética que sirven para aplicar especificidad en una célula efectora inmunitaria tal como un linfocito T o una célula NK. Los CAR son proteínas de fusión que consisten normalmente en un fragmento variable de cadena sencilla (scFV) derivado de anticuerpos monoclonales para proporcionar reconocimiento de antígeno y una combinación de dominios de señalización intracelular para proporcionar señales de activación a la célula efectora inmunitaria. Los CAR mantienen un gran potencial como una potente inmunoterapia universal del cáncer como células efectoras

inmunitarias con CAR pueden modificarse por ingeniería genética para reconocer cualquier antígeno asociado a tumor y, por lo tanto, dirigirse a las células efectoras inmunitarias modificadas por ingeniería genética solo a las células tumorales sin el requisito de coincidencia de HLA

Los presentes inventores han mostrado la reprogramación de una célula CAR-T a las iPSC que retienen la misma impronta genética de la célula fuente, es decir, el mismo receptor quimérico para el antígeno (Figura 18). Las iPSC genéticamente modificadas para expresar el receptor quimérico para el antígeno (CAR) CD19 y el marcador de superficie celular LNGFR truncado como un co-identificador para el CAR retienen la expresión a través de la diferenciación a células iCD34 (Figura 18).

También se proporcionan en el presente documento iPSC que comprenden un CAR en un locus de TCR endógeno. La inserción específica del locus de CAR se logró al nivel de linfocito T, que posteriormente se reprograma en iPSC que comprende la inserción dirigida de CAR. Alternativamente, la inserción específica del locus de CAR puede tener lugar en el nivel de iPSC. Debido a que solo hay un locus de TCR expresivo, el número de copias de la inserción de CAR que es expresivo está bajo control a través de la inserción específica de locus. Además, el CAR se inserta en la región constante del TCR. El truncamiento de la región constante de TCR conduce a la inactivación del TCR, lo que elimina el requerimiento de coincidencia de HLA en las terapias celulares. Por otra parte, la expresión de CAR está controlada por el promotor endógeno de TCR y, por lo tanto, está al mismo nivel y en la misma etapa de desarrollo que el TCR. La expresión de CAR controlada que imita el TCR endógeno evita el impacto potencial en la potencia de diferenciación durante el transcurso de la diferenciación de iPSC. La Figura 20 muestra la expresión de CAR a un nivel comparable en comparación con la expresión de TCR en la línea parental, y la eliminación de tanto la expresión como la función del TCR en las líneas celulares modificadas por ingeniería genética. El linfocito T modificado por ingeniería genética se reprograma a iPSC que comprende un CAR en el locus de TCR endógeno.

Adicionalmente los presentes inventores han generado una línea de iPSC que tiene la expresión de CAR inducible por doxiciclina. Las iPSC se modificaron genéticamente mediante la transducción de lentivirus que contenía el elemento de respuesta a tetraciclina (TRE), CD19 CAR y marcador de superficie LNGFR truncado como un co-identificador. Un lentivirus separado que contiene el transactivador de Tet-On avanzado (rtTA) también se modificó genéticamente en las iPSC para generar Ipsc TetCAR. Para determinar la eficiencia del sistema inducible por doxiciclina TetCAR, se cultivaron iPSC con o sin doxiciclina y se evaluó la expresión del CAR y el marcador LNGFR mediante citometría de flujo. Adicionalmente, las iPSC se tiñeron para Tra-181 para evaluar la calidad pluripotente de las iPSC. La Figura 32A demuestra que después del tratamiento de doxiciclina el ~65 % de las iPSC son positivas para la expresión del CAR y LNGFR mientras se mantiene la expresión de Tra-181.

Para determinar si las iPSC TetCAR tienen una funcionalidad mejorada, las iPSC TetCAR se diferenciaron durante 10 días para generar CD34+HE. La CD34+ HE se aisló y las células se diferenciaron durante 30 días adicionales para generar células iNK. Las células iNK se trataron con doxiciclina durante 24 horas para inducir la expresión de CAR. Después, la citotoxicidad de iNK se evaluó mediante cocultivo durante 24 h con la línea de linfoma de linfocitos B Raji que expresa CD19, células K562 sin expresión de CD19, o células K562 modificadas por ingeniería genética para expresión de la citotoxicidad mediada por CD19 humano. La citotoxicidad mediada por iNK se evaluó mediante citometría de flujo para la expresión de Caspasa-3 en las células diana. La Figura 32B demuestra que las células iNK TetCAR que se trataron con doxiciclina exhibieron una citotoxicidad aumentada en comparación con los controles no tratados, lo que confirma que el CAR confiere una función mejorada a las células efectoras linfoides derivadas de iPSC.

EJEMPLO 20: Generación de iPSC que comprenden un acoplador universal para una especificidad de direccionamiento mejorada

La citotoxicidad celular de iPSC y células efectoras linfoides derivadas, incluyendo T, NK, células NKT, macrófagos y neutrófilos, puede mejorarse aún más acoplando los acopladores bi o multispecíficos que son capaces de redirigir las células efectoras a las células tumorales diana. En general, el concepto del enfoque de acoplamiento bi o multispecífico en la redirección de células efectoras a células tumorales específicas mediante el uso de anticuerpos bi o multispecíficos que se dirigen simultáneamente a un antígeno asociado a tumor y un receptor de activación en la superficie de las células efectoras. Esta unión biespecífica también estimula la función de la célula efectora, lo que conduce a una activación eficaz de la célula efectora y, en última instancia, a la destrucción de las células tumorales. Debido a que la activación de la célula efectora y la destrucción de células tumorales se producen solo cuando las células efectoras y diana se reticular por el acoplador biespecífico, proporciona un mecanismo de control de seguridad. Además, a través de este acoplador de reorientación, se evita la activación restringida del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

En el lado de la célula tumoral, los antígenos asociados a tumores establecidos que pueden usarse para el acoplamiento de un aceptor biespecífico incluyen, pero no se limitan a, CD19, CD20 o CD30 de las neoplasias hematológicas; EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), HER2/ERBB2/neu (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), EPCAM (molécula de adhesión de células epiteliales), EphA2 (carcinoma hepatocelular productor de eritropoyetina A2) y CEA (carcinoembrionario) para tumores sólidos. Adicionalmente, los anticuerpos/acopladores específicos de la superficie pueden comprender además características adicionales,

tales como proteína o proteínas biotiniladas para mejorar el acoplamiento y la unión biespecíficos, el dominio o dominios de anclaje a la membrana superficial para la presentación de la superficie a largo plazo, el dominio o dominios coestimuladores para mejorar la señalización tras la interacción biespecífica y el mecanismo de encendido y apagado para el control de expresión inducible o temporal del acoplador.

El redireccionamiento de la célula efectora mediada por un agente biespecífico implica el acoplamiento de los receptores de superficie en el lado de las células efectoras. Los receptores de superficie existentes de forma natural incluyen, pero no se limitan a, CD3, FcγRIII (CD16), FcγRI (CD64) y FcαR (CD89), expresados en linfocitos T, células NKT, células NK, macrófagos y neutrófilos, respectivamente. Adicionalmente, pueden introducirse receptores de activación de superficie modificados por ingeniería molecular para expresar en la superficie de la célula efectora con el fin del acoplamiento de acoplador de redireccionamiento. El receptor desencadenante de superficie modificado genéticamente facilita el acoplamiento de anticuerpos bi o multiespecíficos entre las células efectoras y la célula diana específica independientemente de sus receptores naturales y tipos de células. Usando este enfoque, es factible generar iPSC que comprenden un receptor de activación de superficie universal usando los métodos desvelados en el presente documento y después diferenciar tales iPSC en poblaciones de diversos tipos de células efectoras que expresan el receptor de activación de superficie universal. Generalmente, un receptor de activación de superficie universal modificado por ingeniería genética contiene un antiepítipo y un dominio coestimulador. El antiepítipo del receptor de activación de superficie dirige el acoplamiento de cualquier célula efectora que expresa el receptor con un promotor bi o multiespecífico que tiene un epítipo coincidente en un extremo. La especificidad de direccionamiento de la cubierta en el otro extremo dirige la célula efectora acoplada a las células tumorales que tienen antígenos específicos para la destrucción. Para un receptor de activación de superficie universal, en un ejemplo, el dominio coestimulador puede comprender proteína de IL2 o parte de la misma para lograr activación celular canónica o no canónica y/o mejorar la función de célula efectora independientemente del tipo de célula efectora.

EJEMPLO 21: Los productos celulares derivados de iPSC tienen una longitud de telómero más larga representativa de mayor proliferación, supervivencia y potencial de persistencia

El acortamiento de los telómeros se produce con el envejecimiento celular y se asocia a la disfunción de las células madre y la senescencia celular. Un incentivo importante de la terapia celular derivada de iPSC es que los productos celulares derivados de iPSC tendrían una longitud de telómero más larga representativa de mayor potencial proliferativo. Para evaluar la integridad de los telómeros de las células iNK derivadas de iPSC, se aislaron células CD56+ de cultivos de células iNK de 27 días y células NK derivadas de PB adultas. Después de la purificación, cada muestra se combinó con un número igual de células de referencia, una línea celular de leucemia de linfocitos T humana (línea celular 1301) con telómeros superiores a 30 kb. Para cada mezcla de muestra/célula de referencia, el ADN se desnaturalizó en presencia de solución de hibridación sin sonda o en solución de hibridación que contenía sondas teloméricas de ácido péptido nucleico conjugado con fluoresceína (PNA) (kit Telomere PNA, DakoInc). Las mezclas de células de muestra/de referencia se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente (TA) durante la noche, después se lavaron para retirar la sonda no unida. Se añadió una solución de tinción de ADN a todas las muestras, después se adquirieron en una BD Fortessa X-20 (BD Biosciences). La longitud relativa de los telómeros, en comparación con la línea celular 1301, se calculó como la relación entre la señal telomérica de cada muestra y las células de referencia (línea celular 1301) con corrección para el índice de ADN de todas las células. La Figura 31 demuestra que las células iNK tienen una mayor longitud de los telómeros en comparación con dos donantes adultos de células NK adultas, pero una longitud más corta de los telómeros en comparación con los controles de iPSC, que representan una mayor proliferación, supervivencia y potencial de persistencia en las células NK derivadas de iPSC en comparación con las células NK del donante.

EJEMPLO 22: Los productos celulares criopreservados derivados de iPSC mantienen su potencial de diferenciación e improntas genéticas como células funcionales

Usando ProT (progenitores T) derivados de iPSC como un ejemplo, los productos celulares derivados de iPSC se evaluaron para determinar su capacidad para criopreservarse; y como productos de células progenitoras que derivan de iPSC, su capacidad para mantener el potencial de diferenciación adicional en células completamente diferenciadas. Las células CD34+ clasificadas derivadas de iPSC se diferenciaron durante 10 días adicionales en cultivos de diferenciación de linfocitos T. En el día 10+10 las células ProT CD45+CD34+CD7+ se aislaron por FACS y se criopreservaron en dos medios de criopreservación separados. Las células ProT se criopreservaron y después se descongelaron y se volvieron a colocar en cultivos de diferenciación de linfocitos T. La Figura 35 representa la expresión de CD34 y CD7 mediante citometría de flujo antes del aislamiento de células proT (A) y después 3 días después de la descongelación (B y C). El día 10+13 las células ProTcriopreservadas experimentan una diferenciación adicional a las células CD34-CD45+CD7+ (C) de una manera similar en comparación con las células ProT que no se criopreservaron (B). La Figura 35 demuestra además que las células ProT son viables después de la descongelación (D) y demuestran una mayor proliferación celular cuando se cultivan en medio de diferenciación de linfocitos T (E).

Durante el desarrollo de linfocitos T, las células progenitoras hematopoyéticas migran desde la médula ósea al timo para diferenciarse en células ProT. Para caracterizar aún más las células proT derivadas de iPSC, los presentes

inventores evaluaron su capacidad de migrar hacia quimiocinas que se sabe que se expresan en el timo para reclutar linfocitos T en desarrollo. El día 10+10 las células ProT derivadas de iPSC se aislaron mediante FACS para los marcadores CD45+CD7+ y las células se sembraron en ensayos de migración transwell con las quimiocinas CCL21, CCL25 y SDF. Después de 4 horas, se cuantificó el número de células ProT viables que migraron hacia las quimiocinas mediante citometría de flujo con partículas de cuantificación de Accucount (Spherotech, Lake Forest, IL). La Figura 36A demuestra que las células ProT derivadas de iPSC pueden migrar con éxito hacia CCL21 y SDF, proporcionando evidencia adicional del compromiso del linaje de linfocitos T. Tras la entrada a las células ProT del timo responden al entorno tímico para secretar las citocinas IPN γ , TNF α e IL2. Para evaluar la capacidad de las células proT derivadas de iPSC para responder al entorno tímico, las células proT derivadas de iPSC, las células proT derivadas de CB y los linfocitos T de sangre periférica no se estimularon o se estimularon con PMA+ionomicina durante 4 horas. Después de 4 horas las células se recogieron y se tiñeron para IPN γ , TNF α e IL2. La Figura 36B demuestra que las células proT derivadas de iPSC pueden responder a producir y secretar citocinas de IFN γ y TNF α .

Una característica adicional de las células proT funcionales es el inicio de la recombinación VDJ del locus gamma de TCR para generar un receptor de linfocitos T de función. Para determinar si las células ProT que derivan de iPSC han iniciado la recombinación VDJ, se aisló el ADN genómico. Las regiones genómicas (V-J γ y V-DJ β) que se pierden después de la recombinación del gen de TCR se amplificaron por qPCR como un control para el ADN de la línea germinal. Otra región (C β 2) que permanece sin cambios también se amplificó como un control para el ADN de la línea germinal. Se usó ADN genómico obtenido de una línea de fibroblastos para construir una curva patrón. El porcentaje del locus de TCR γ o el locus TCR β restante en la configuración de la línea germinal se calculó comparando el número de copias del V-J γ o V-DJ con el número de copias de C β 2, respectivamente. Las iPSC FTi121 e iPSC reprogramadas a partir de linfocitos T (TiPS C9.1) sirven como controles negativos y positivos, respectivamente. La Figura 37 demuestra que las células ProT derivadas de iPSC FTi121 tienen un porcentaje disminuido de línea germinal que permanece del locus gamma de TCR en comparación con FTi121 y TiPS C9.1 que indica que han comenzado el reordenamiento del locus de TCR y están comprometidas con el linaje de linfocitos T.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que los métodos, las composiciones y los productos descritos en el presente documento son representativos de realizaciones ilustrativas y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una célula madre pluripotente inducida (iPSC) modificada genómicamente capaz de diferenciarse en una célula de linaje hematopoyético que deriva de iPSC, o una población celular de la misma, comprendiendo el método:
 - (i)reprogramar un linfocito T a una célula madre pluripotente inducida (iPSC); y
 - (ii)modificar genómicamente la iPSC para
 - (a)inactivar un receptor de linfocitos T (TCR) mediante la interrupción de un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa (TRAC) mediante
 - (b)inserción de un polinucleótido que codifica al menos un receptor quimérico para el antígeno (CAR) en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa; en donde el polinucleótido que codifica el al menos un CAR se expresa bajo el control de un promotor de TCR endógeno de la región constante de TCR alfa,

obteniendo de este modo una iPSC modificada genómicamente capaz de diferenciarse en una célula de linaje hematopoyético derivada de iPSC que expresa el al menos un CAR.
2. Un método para generar una célula madre pluripotente inducida (iPSC) modificada genómicamente capaz de diferenciarse en una célula de linaje hematopoyético que deriva de iPSC, o una población celular de la misma, comprendiendo el método:
 - (i)modificar genómicamente un linfocito T para
 - (a)inactivar un receptor de linfocitos T (TCR) mediante la interrupción de un ácido polinucleico que codifica una región constante de TCR alfa (TRAC) mediante
 - (b)inserción de un polinucleótido que codifica al menos un receptor quimérico para el antígeno (CAR) en el ácido polinucleico que codifica la región constante del TCR alfa; en donde el polinucleótido que codifica el al menos un CAR se expresa bajo el control de un promotor de TCR endógeno de la región constante de TCR alfa,

obteniendo de este modo un linfocito T modificado genómicamente que expresa el al menos un CAR;
 - (ii)reprogramar el linfocito T modificado genómicamente de la etapa (i) a una célula madre pluripotente inducida (iPSC), en donde la iPSC comprende la misma ingeniería genómica que el linfocito T de la etapa (i).
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el al menos un CAR comprende un CAR relacionado con CD19.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células son deficientes en HLA de clase I y/o de clase II.
5. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la célula de linaje hematopoyético derivada de iPSC es una célula endotelial hemogénica definitiva, un progenitor de linfocitos T, un linfocito T, un progenitor de células NK, una célula NK o un linfocito B.
6. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la célula de linaje hematopoyético derivada de iPSC es un linfocito T, un progenitor de linfocitos T o una célula clonal de los mismos.
7. Un método para generar una célula de linaje hematopoyético o una población de la misma, que comprende: generar una iPSC modificada genómicamente o una población de la misma según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y dirigir además la diferenciación de la iPSC modificada genómicamente *in vitro* a una célula de linaje hematopoyético o una población de la misma.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la célula de linaje hematopoyético derivada de iPSC comprende una célula endotelial hemogénica definitiva, un progenitor de linfocitos T, un linfocito T, un progenitor de células NK, una célula NK o un linfocito B; y en donde la célula de linaje hematopoyético diferenciada de iPSC comprende una longitud de telómero más larga que una célula del mismo tipo que no deriva de una iPSC.
9. El método de las reivindicaciones 7 u 8, en donde la célula de linaje hematopoyético derivada de iPSC es un linfocito T, un progenitor de linfocitos T o una célula clonal de los mismos, y el linfocito T o el progenitor de linfocitos T que deriva de iPSC tiene al menos una de las siguientes características:

(i)no requiere que el HLA coincida en las terapias celulares; y
(ii)comprende una longitud de telómero más larga que una célula del mismo tipo que no deriva de una iPSC.

- 5 10. Una iPSC modificada genómicamente o una iPSC clonal, o una población de las mismas, obtenible mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
11. Una composición farmacéutica que comprende un medio farmacéuticamente aceptable y la célula o la población de la misma de la reivindicación 10.
- 10 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento de: un trastorno autoinmunitario; una neoplasia hemática; un tumor sólido; cáncer o una infección asociada a VIH, VRS, VEB, CMV, adenovirus o BK poliomavirus, comprendiendo el uso introducir la composición en un sujeto que necesita terapia celular adoptiva
- 15

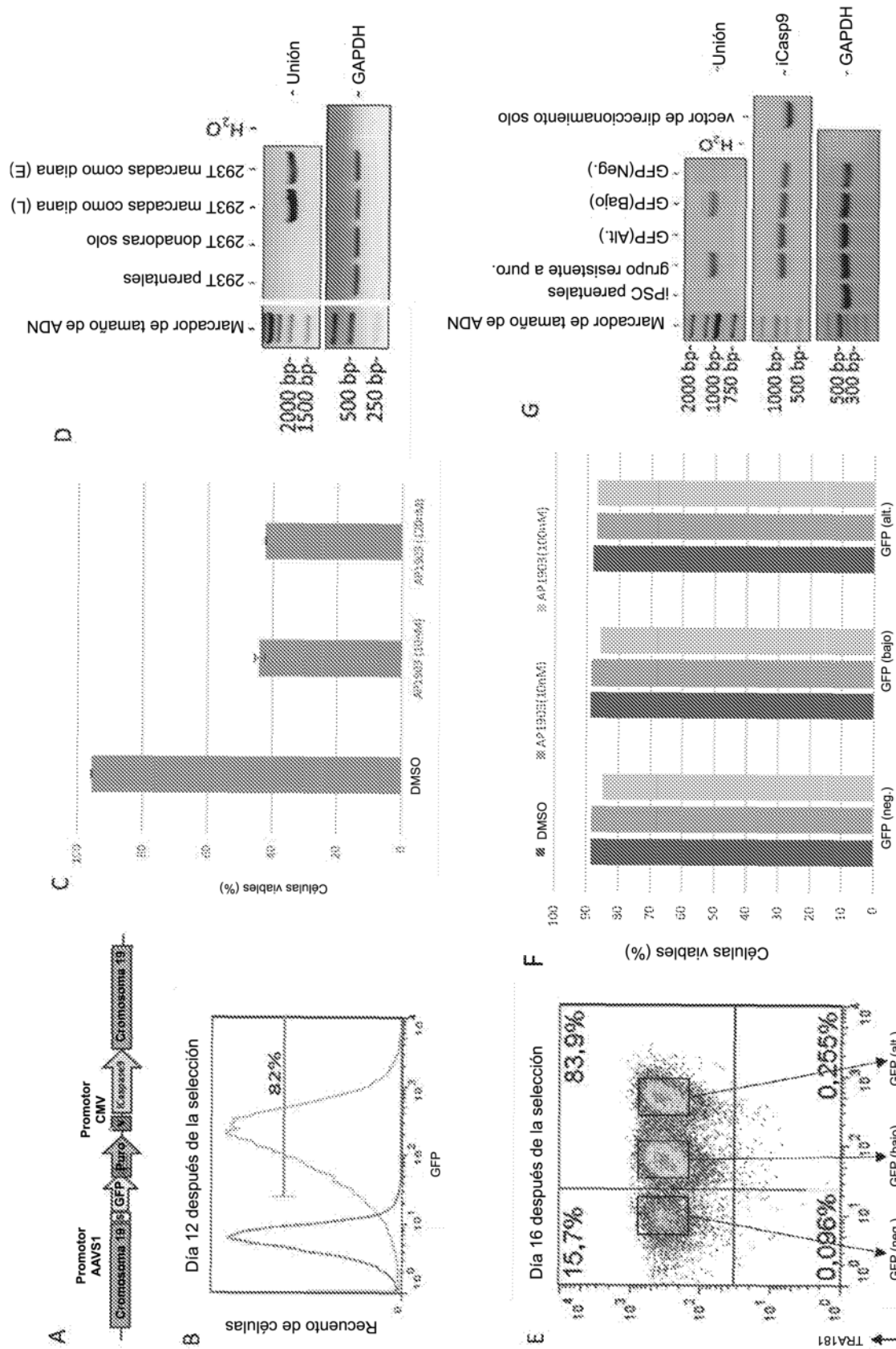


Figura 1

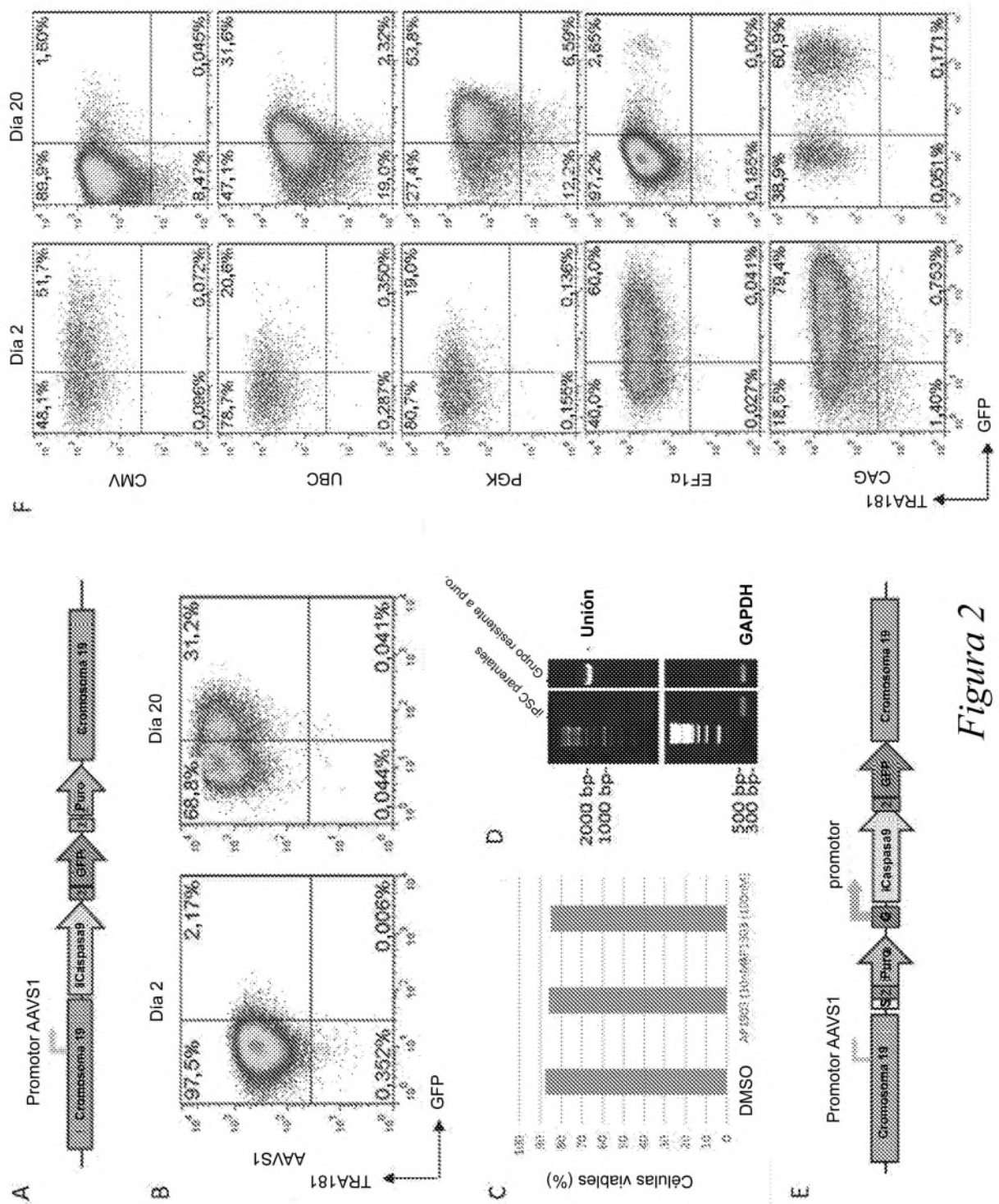


Figura 2

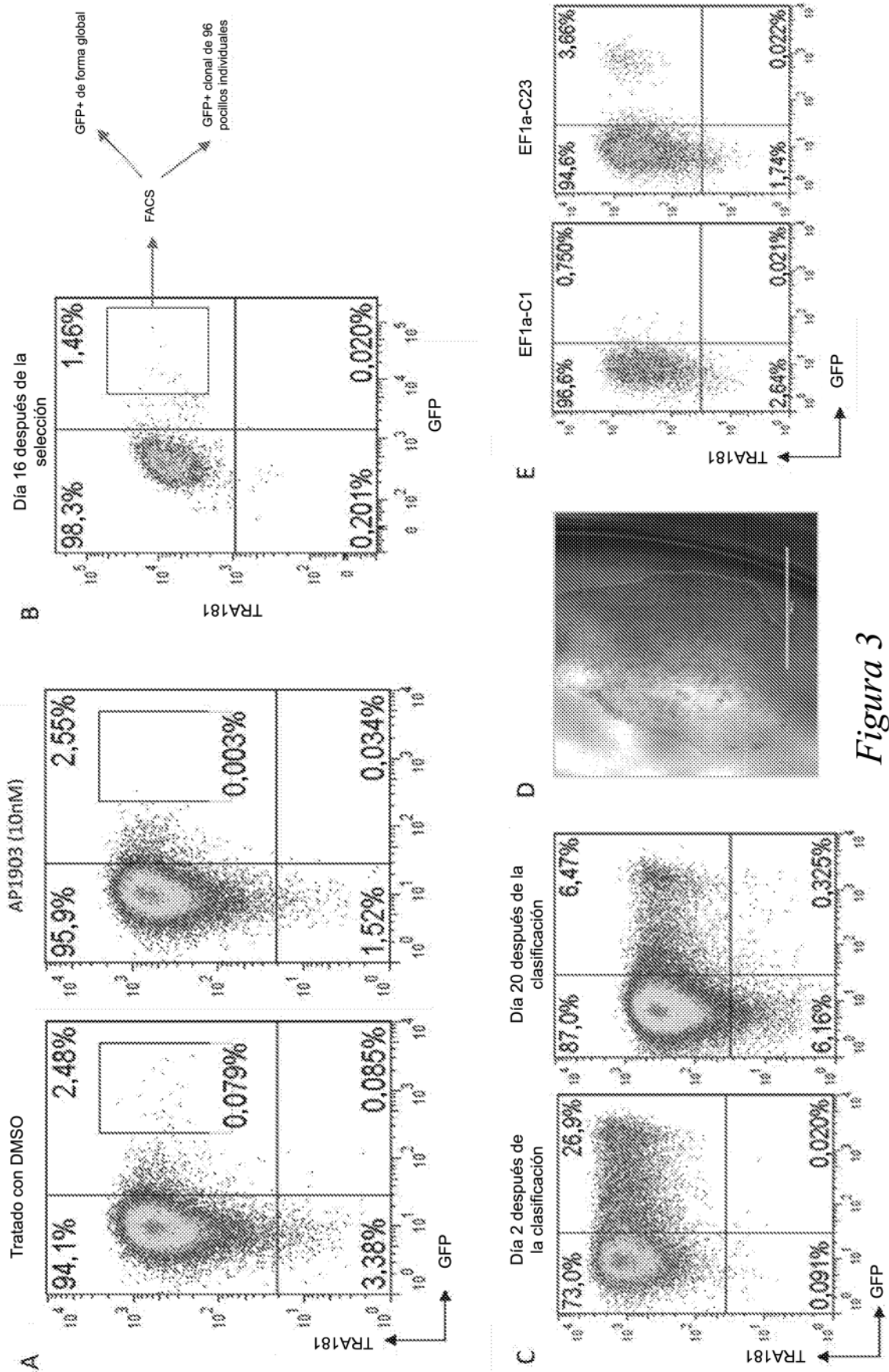


Figura 3

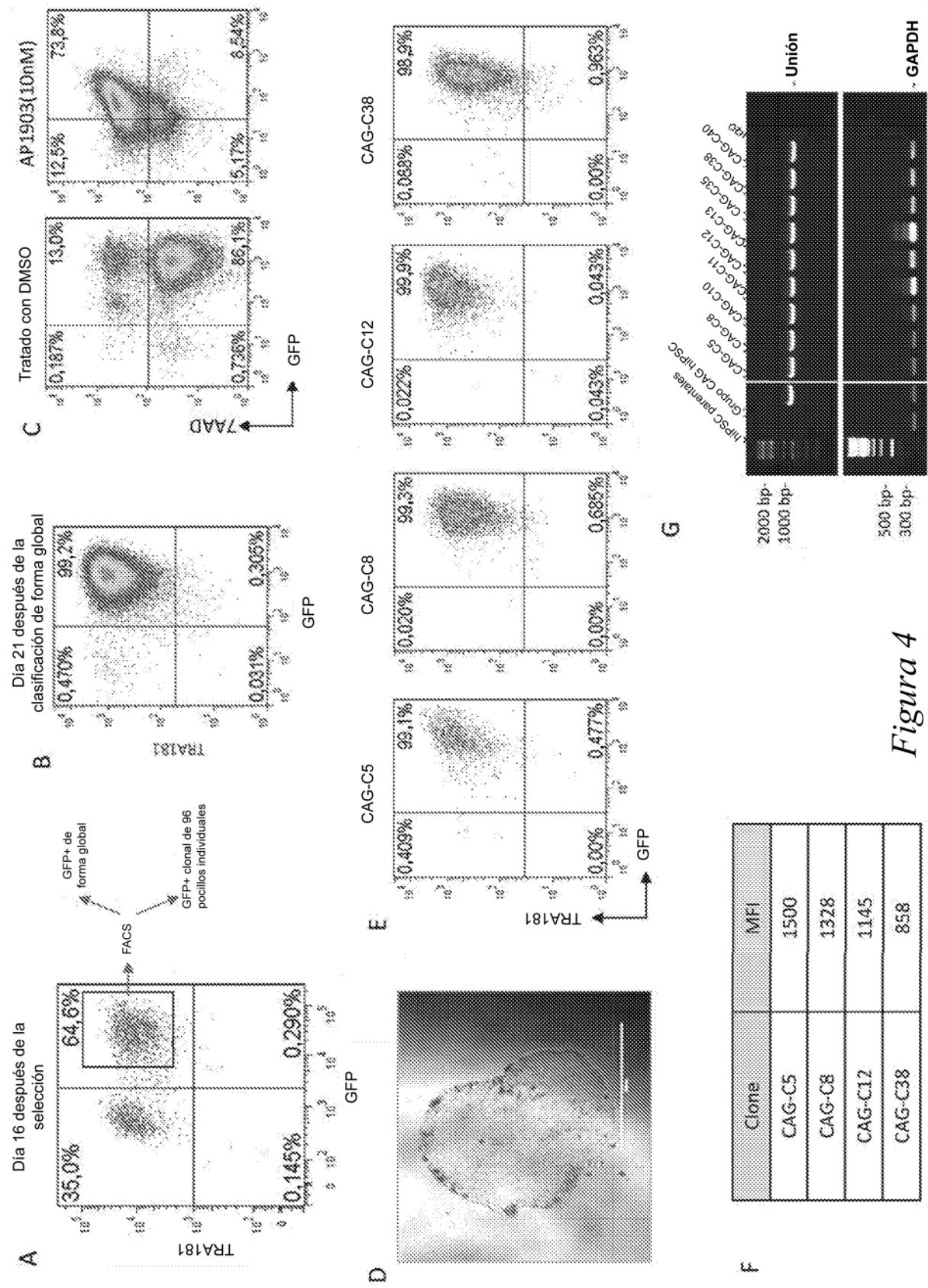


Figura 4

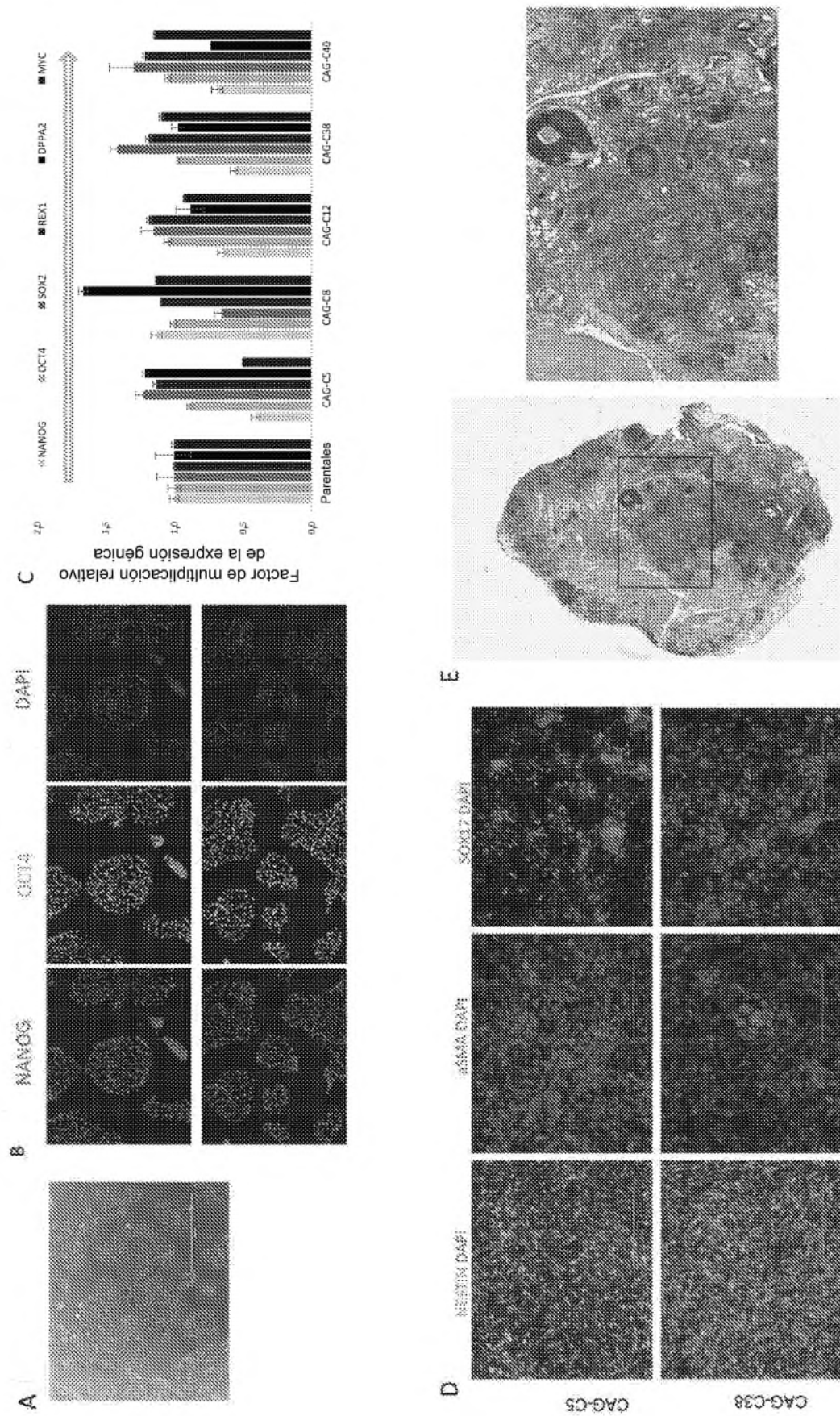


Figura 5

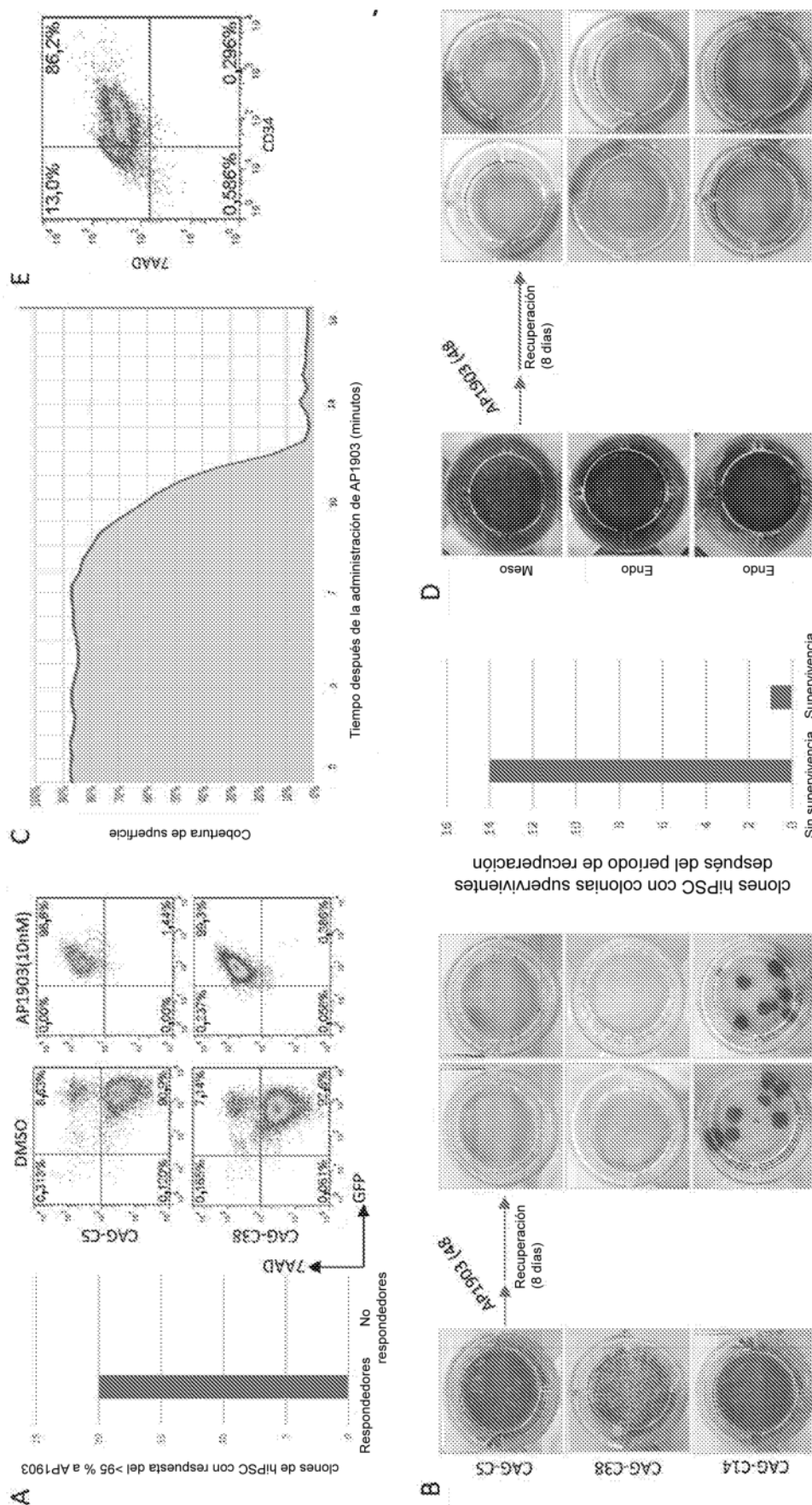


Figura 6

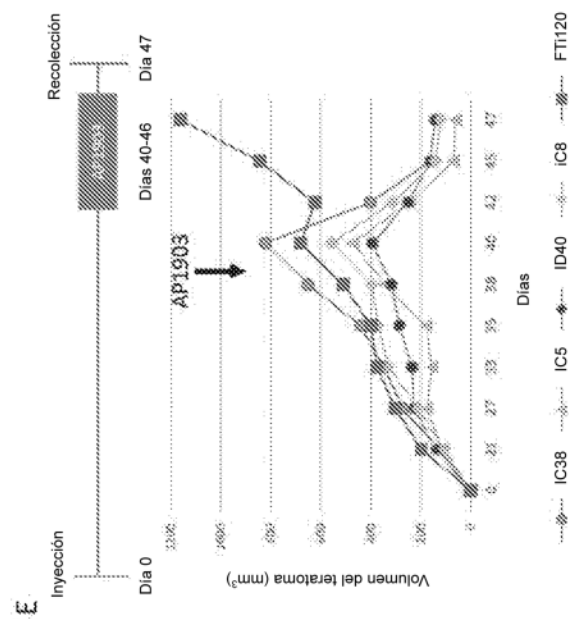
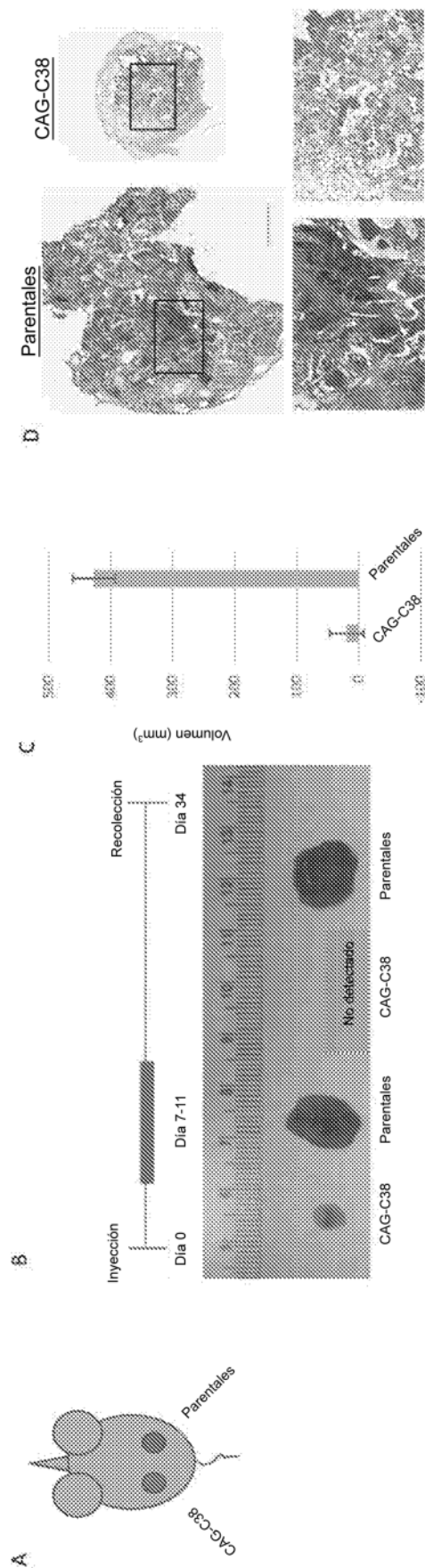


Figura 7

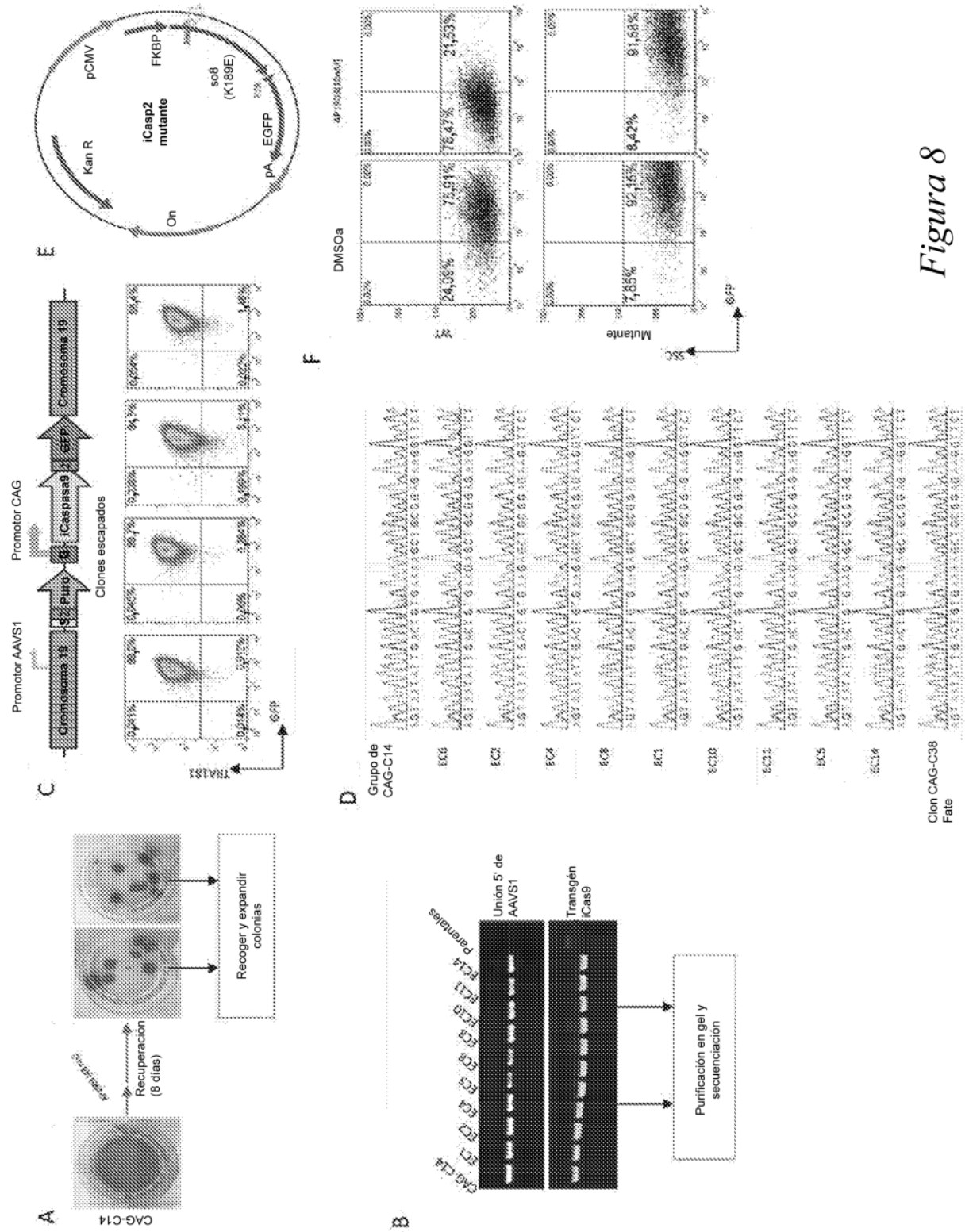


Figura 8

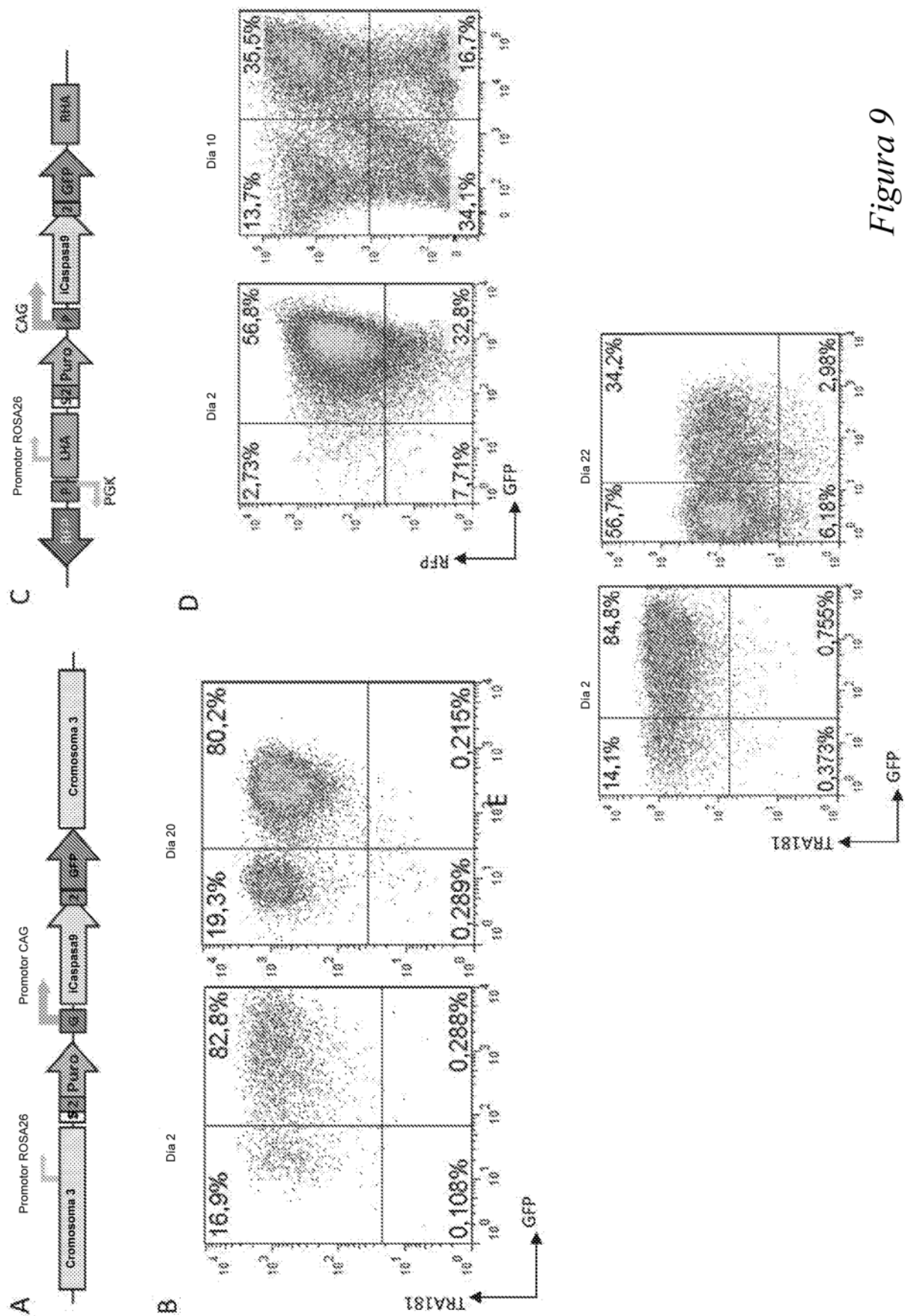


Figura 9

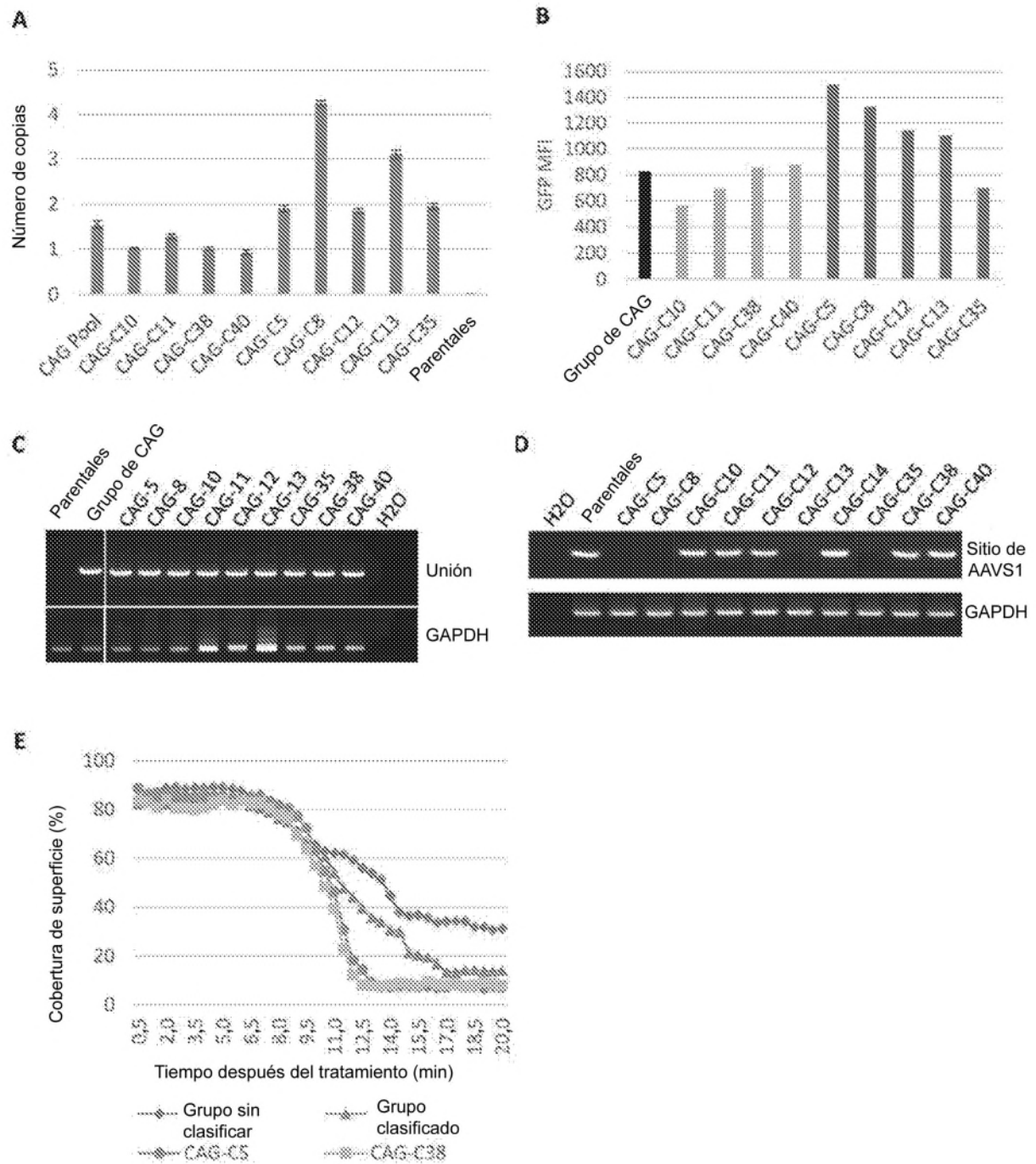


Figura 10

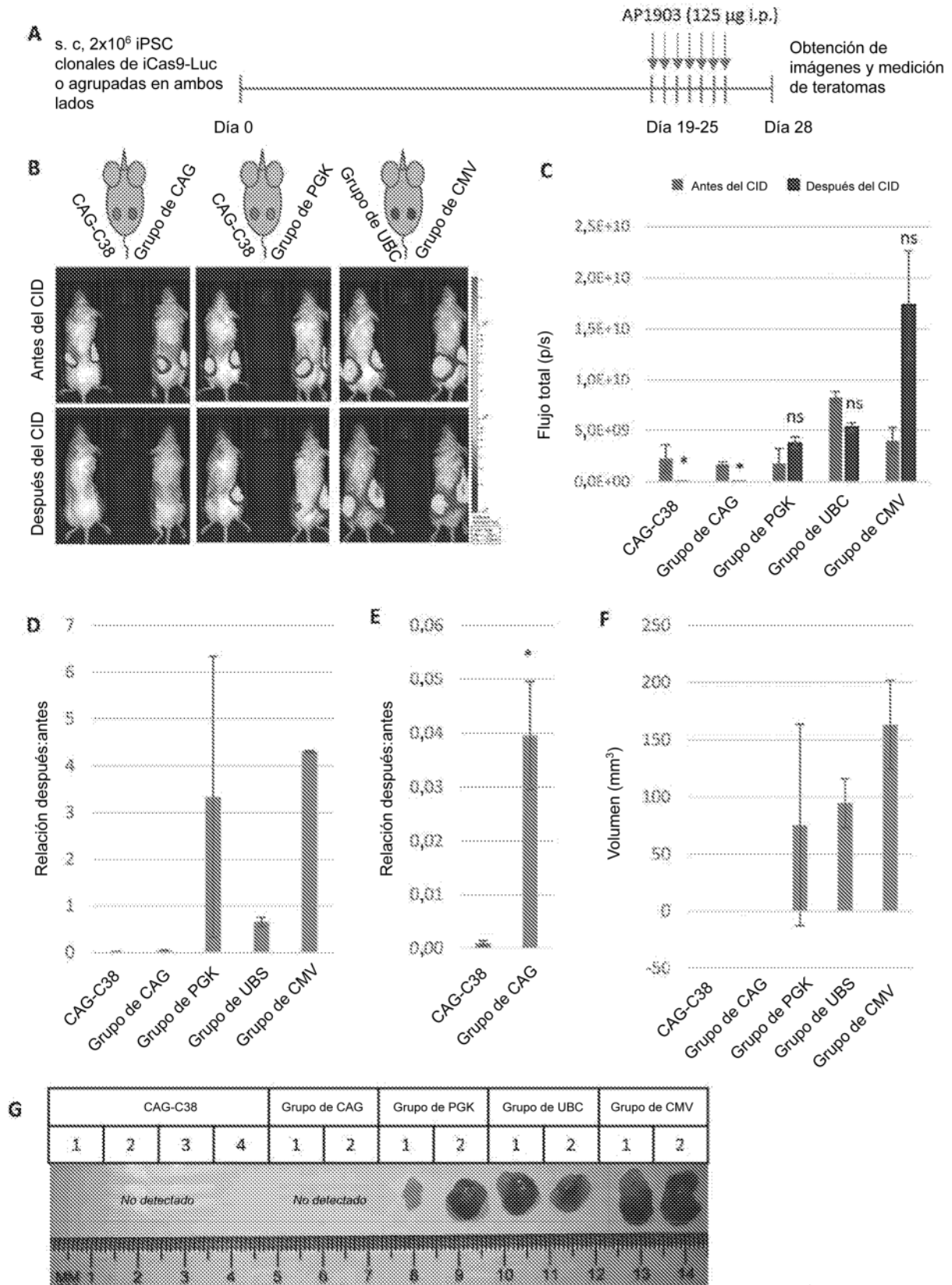


Figura 11

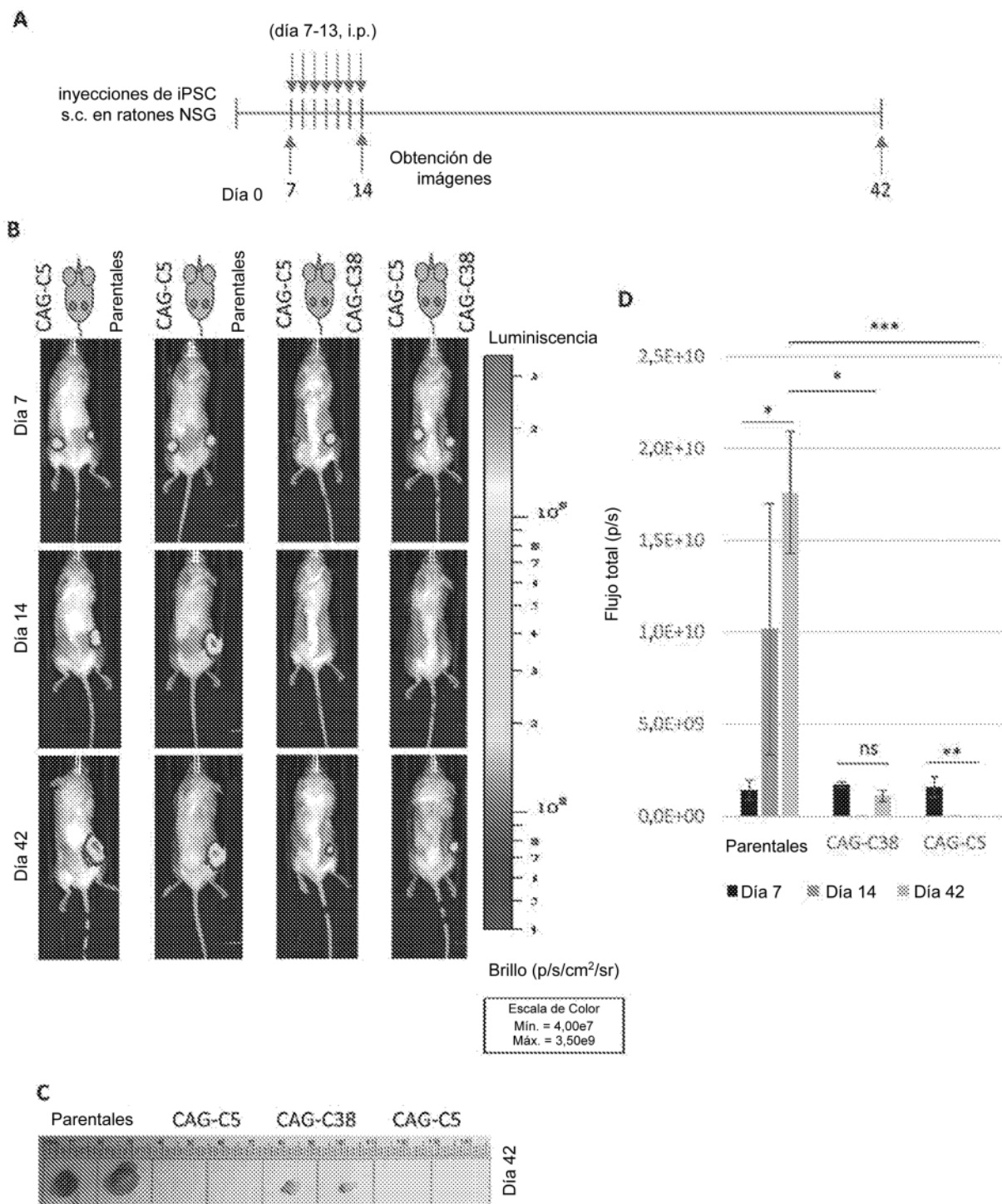


Figura 12

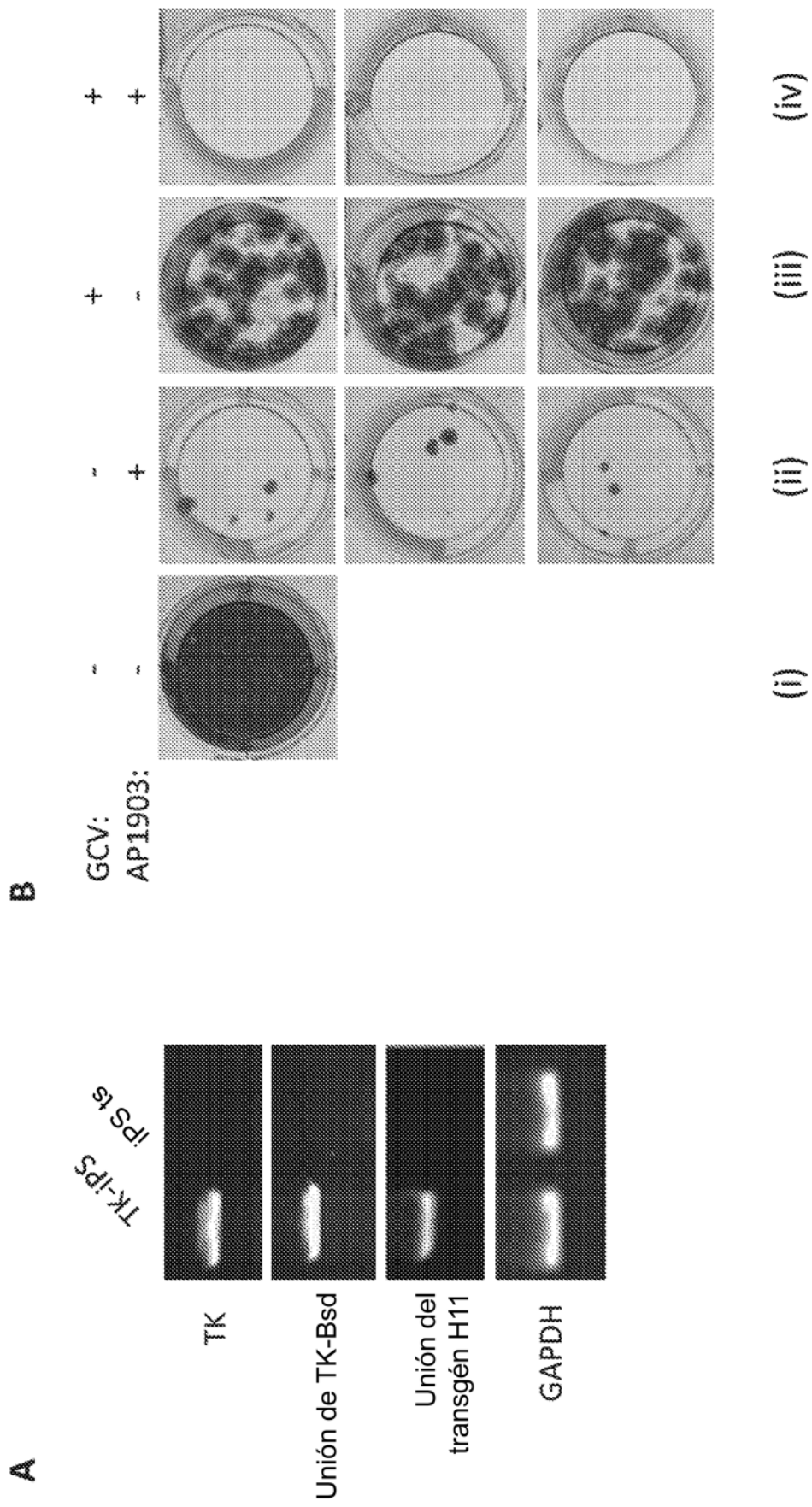


Figura 13

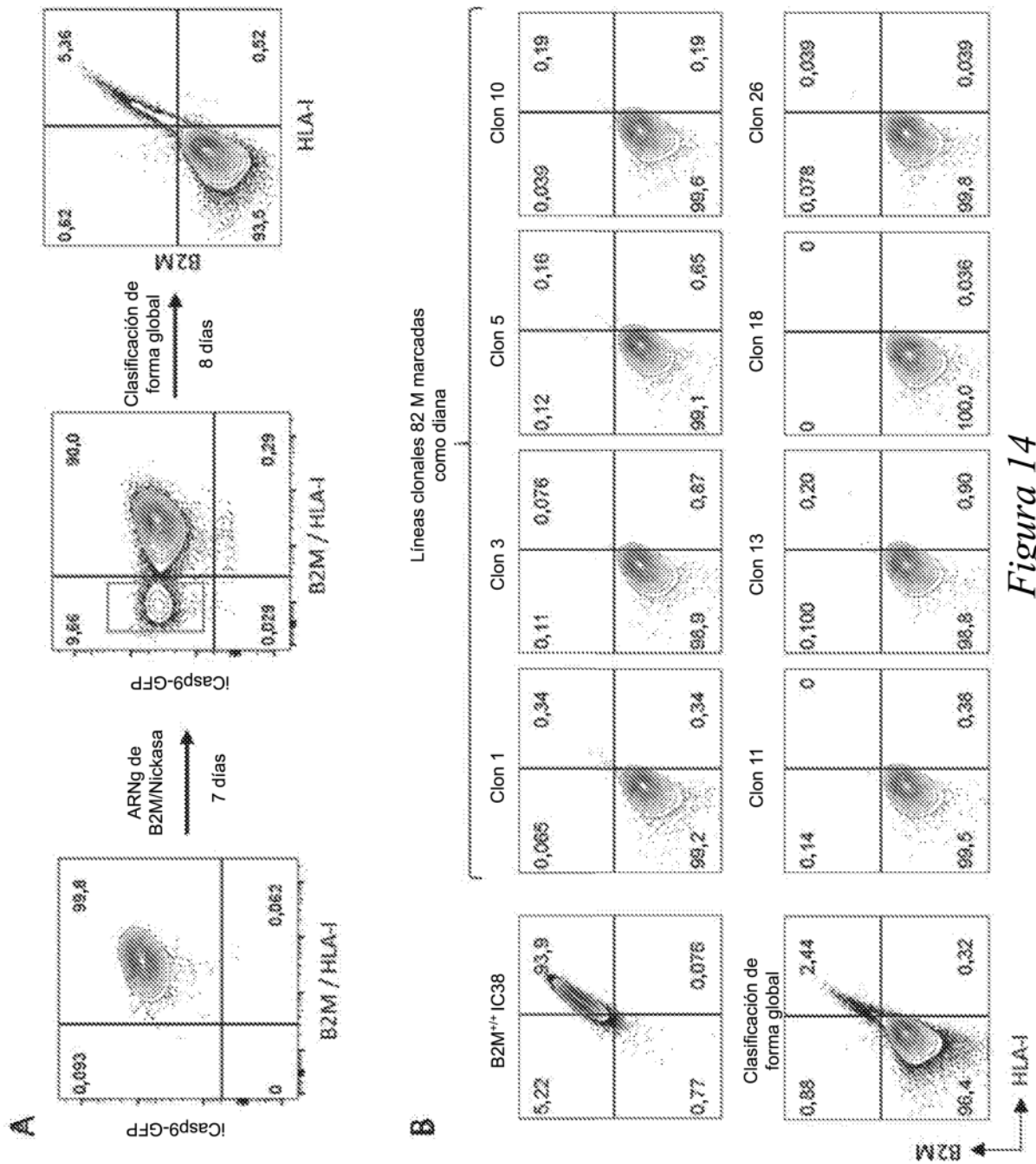


Figura 14

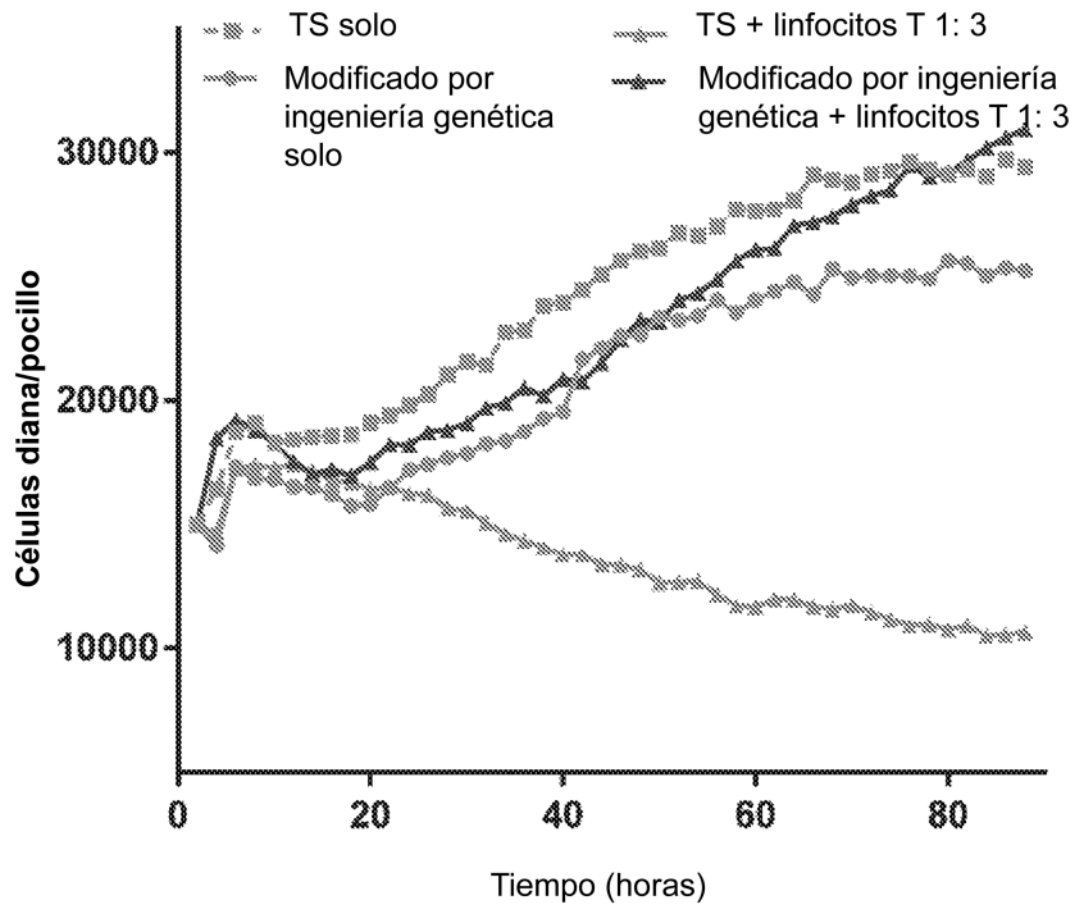


Figura 15A

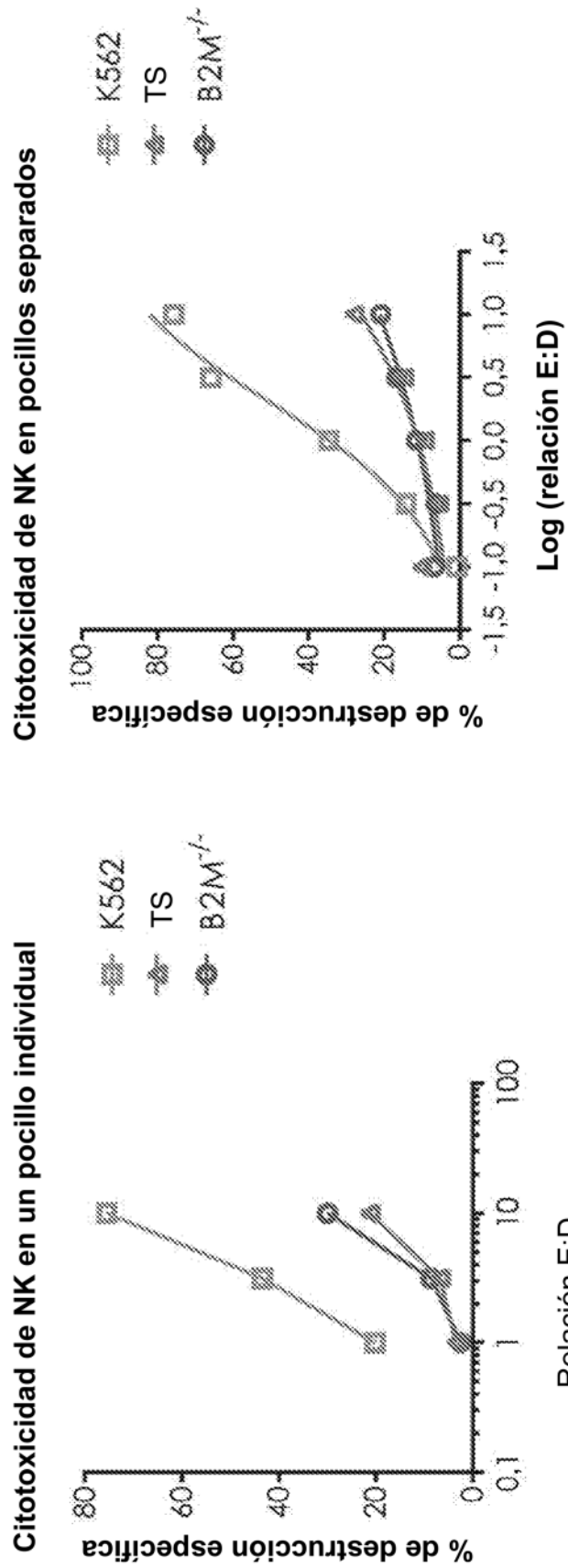


Figura 15C

Figura 15B

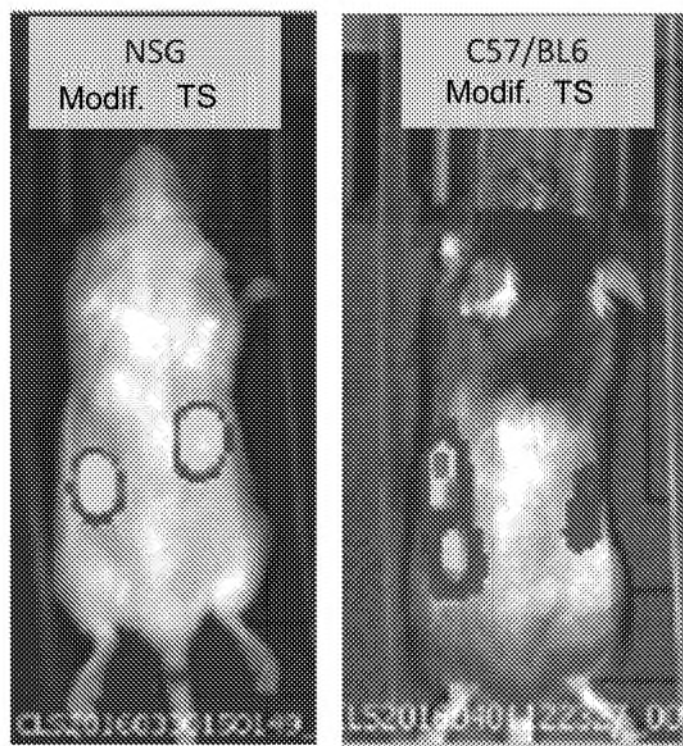


Figura 15D

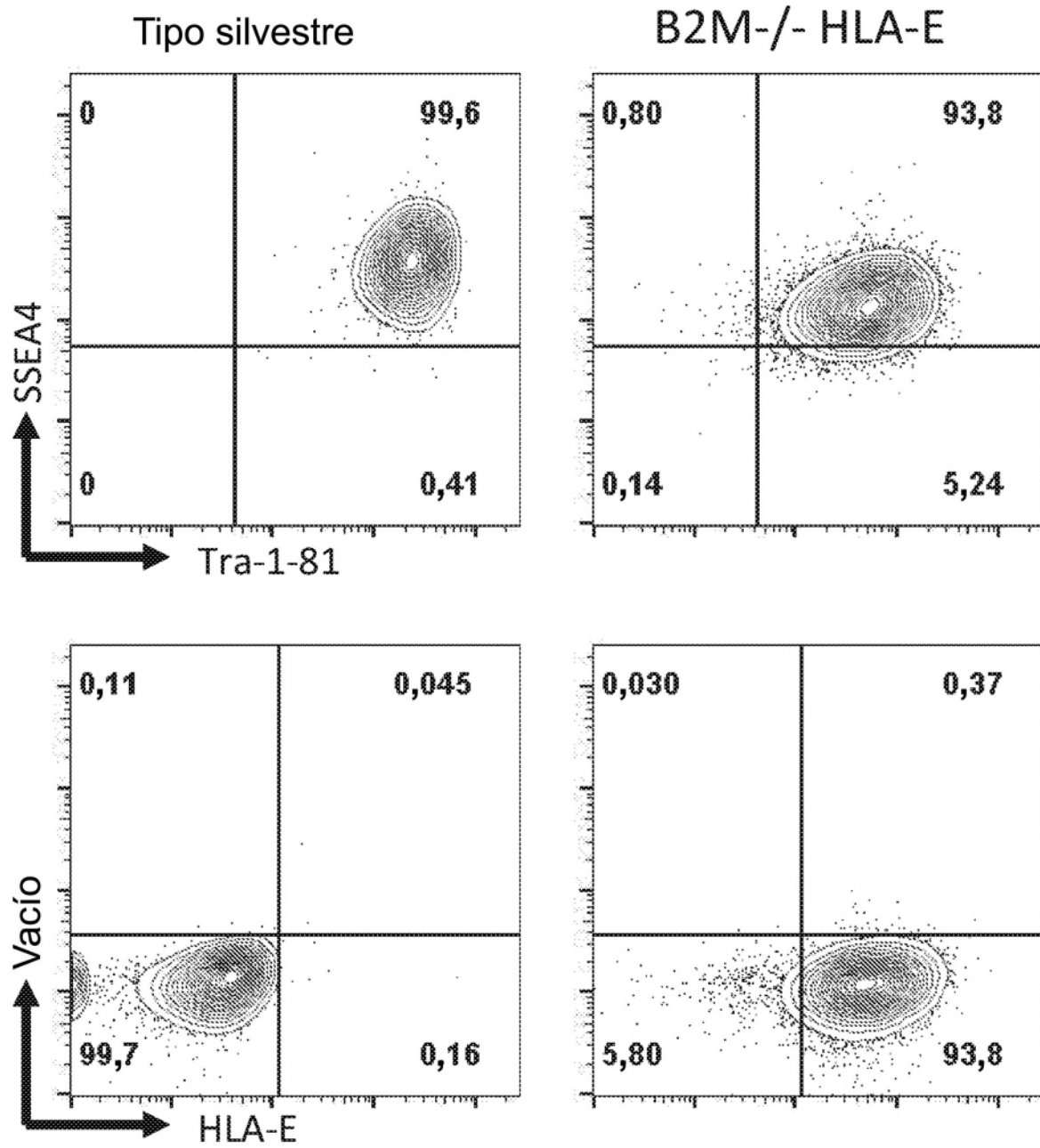


Figura 16A

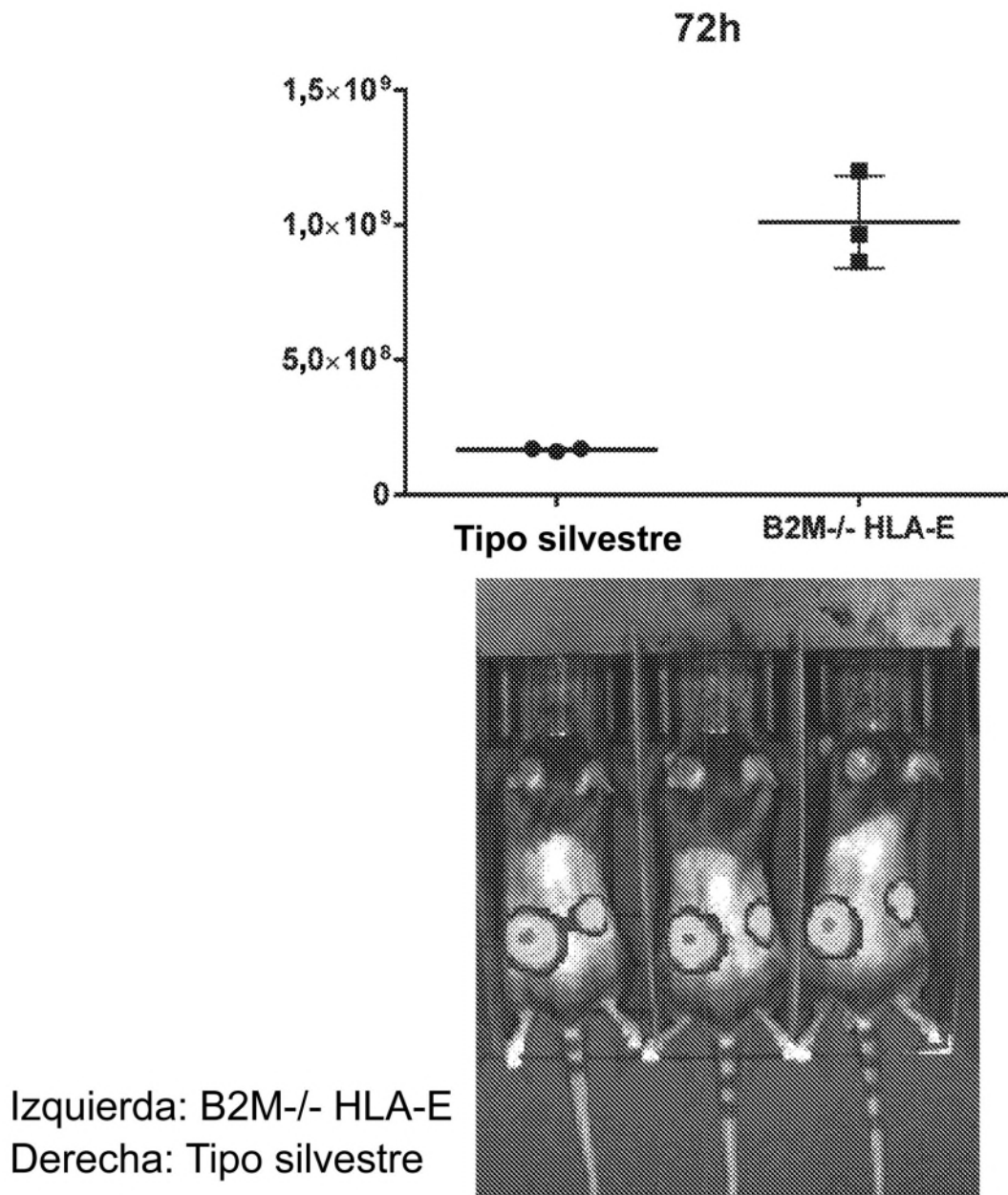


Figura 16B

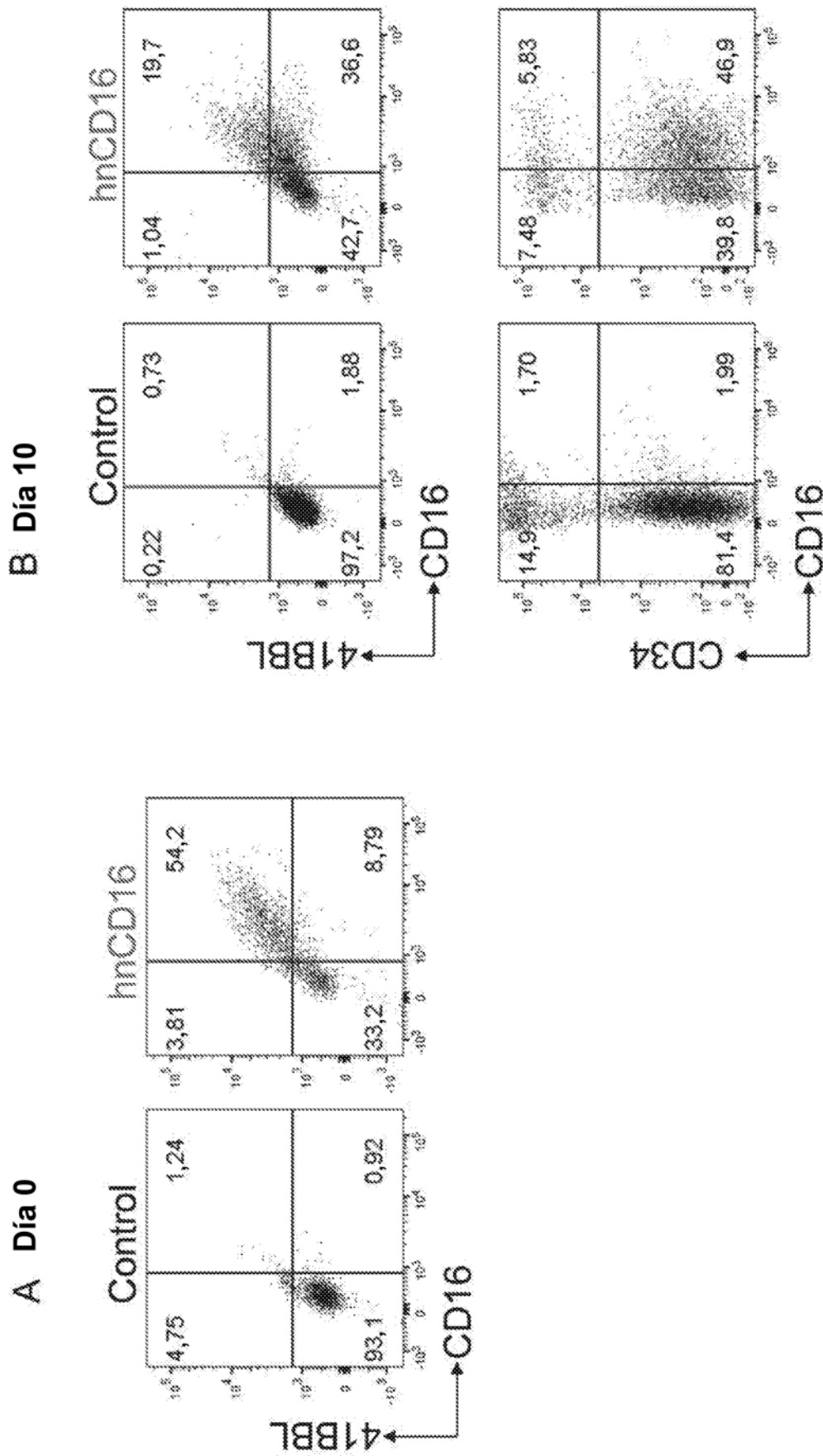


Figura 17

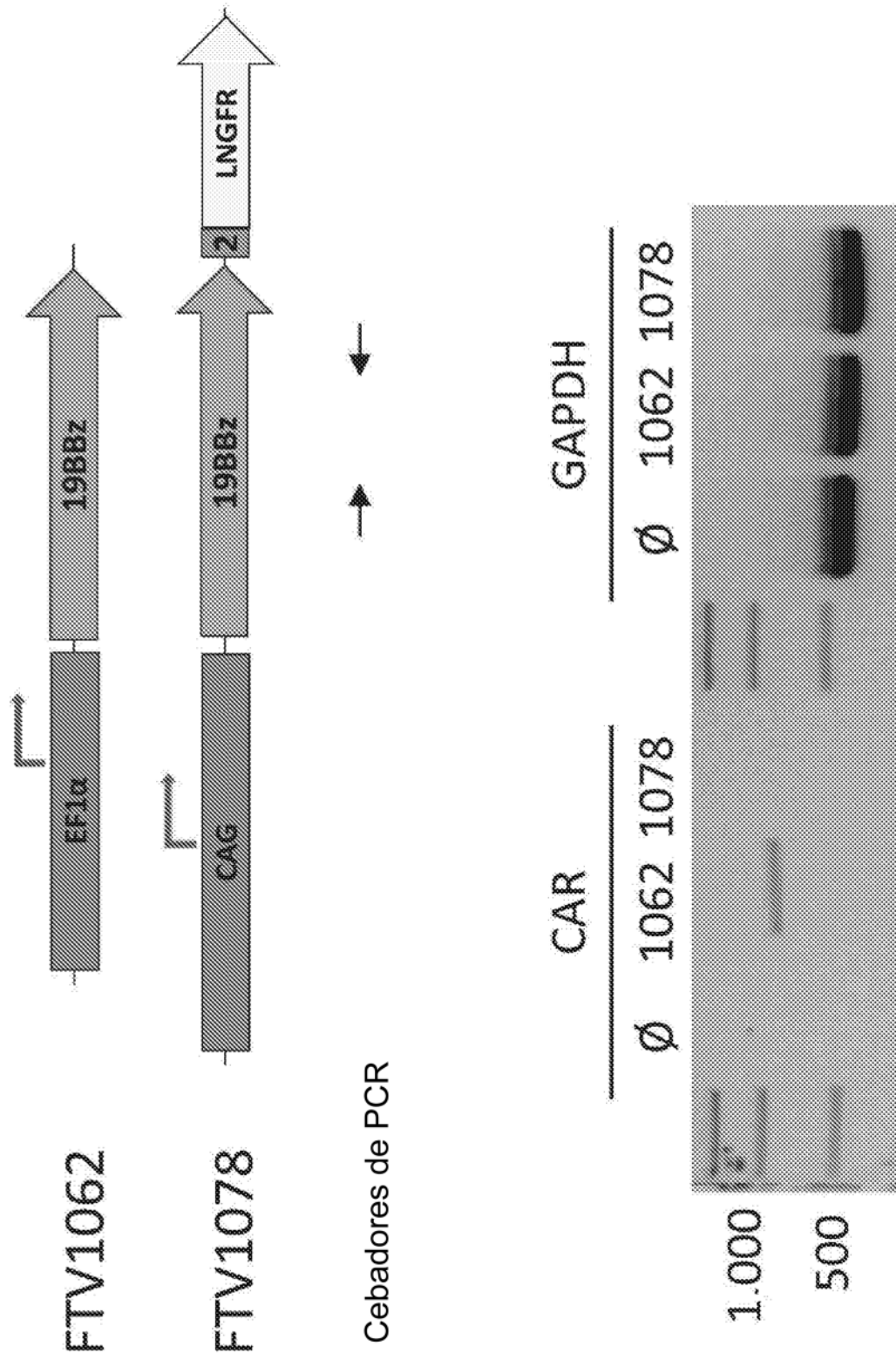


Figura 18

Día 0

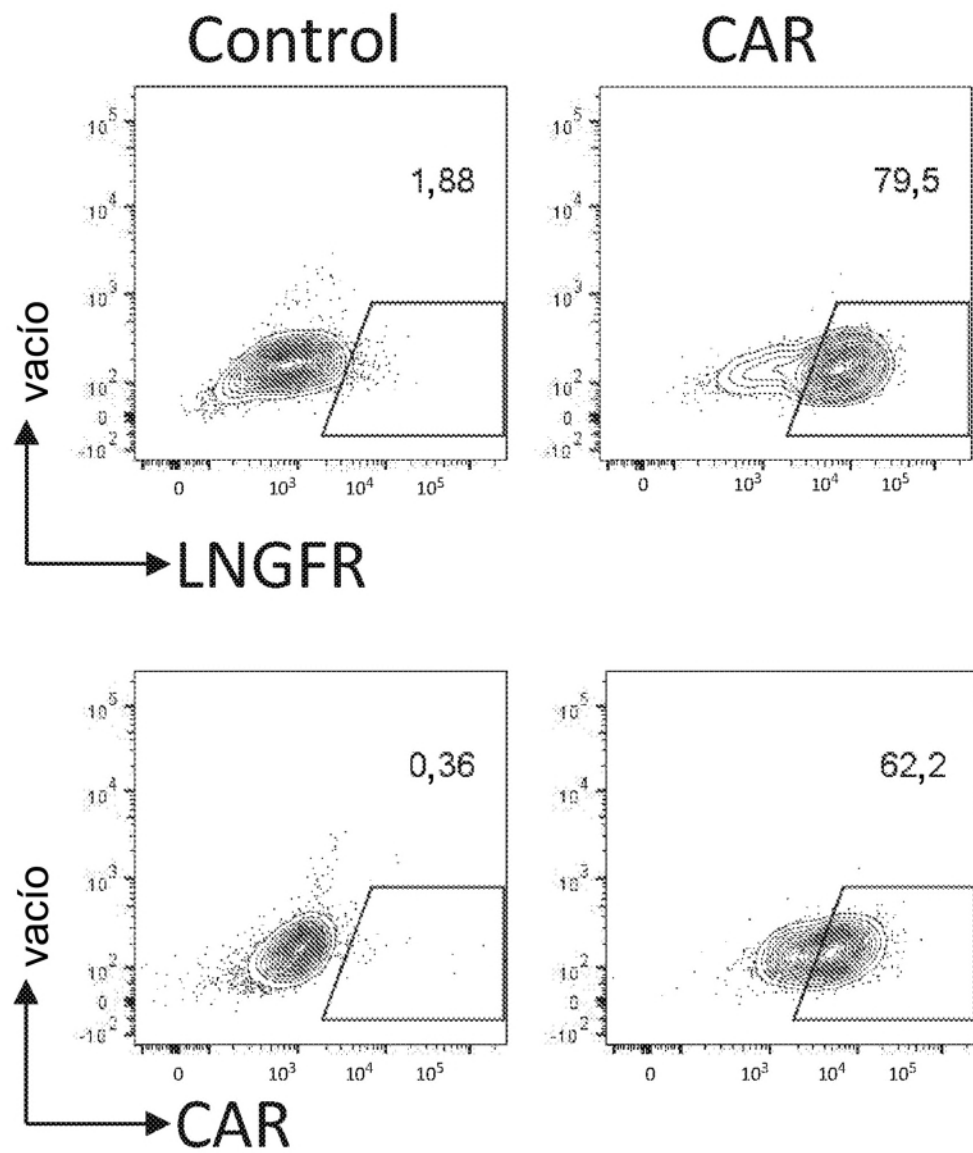


Figura 19A

Día 10

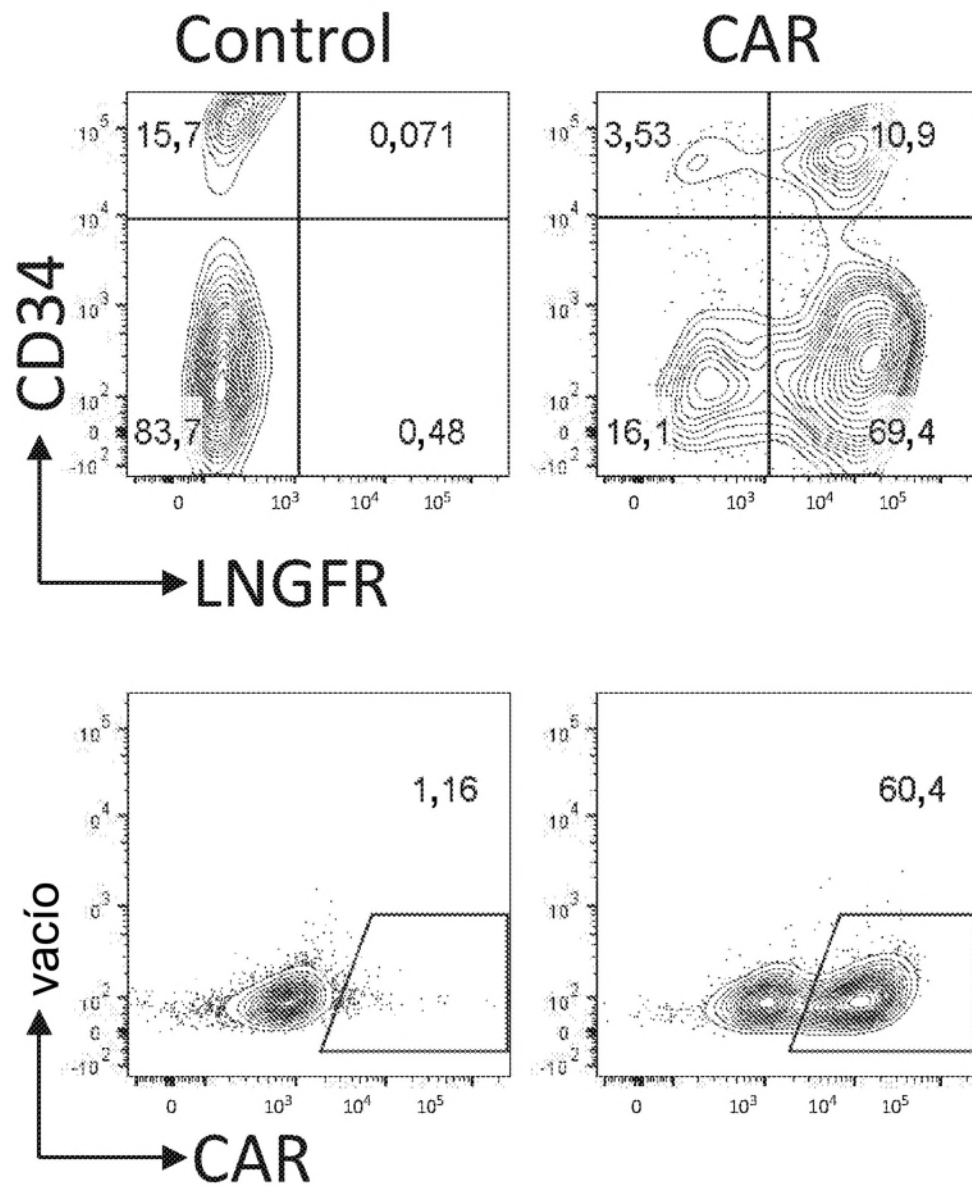


Figura 19B

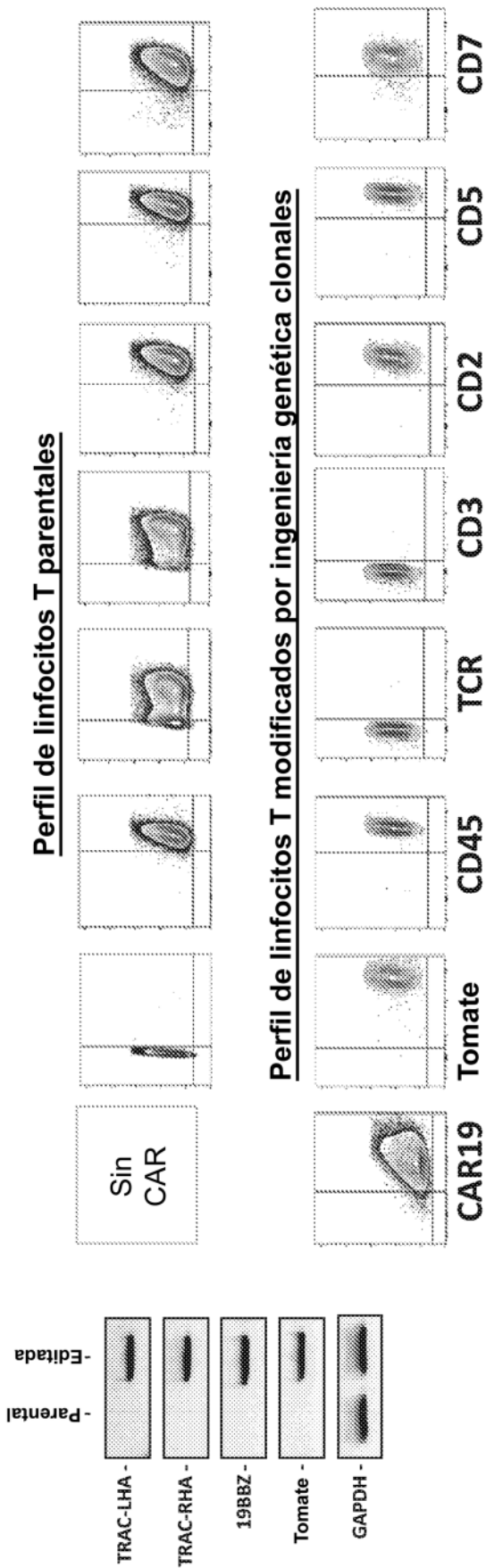


Figura 20

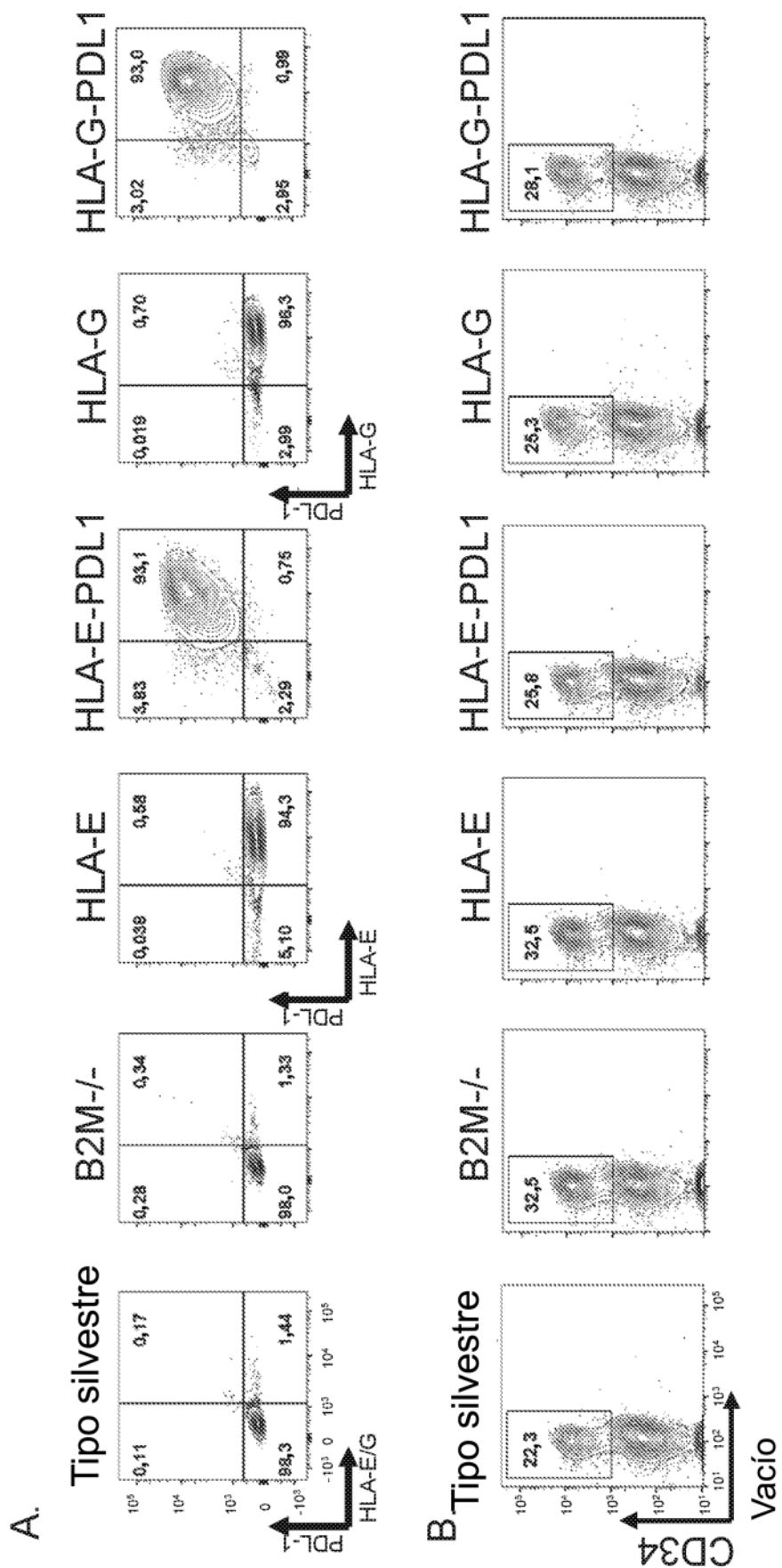


Figura 21

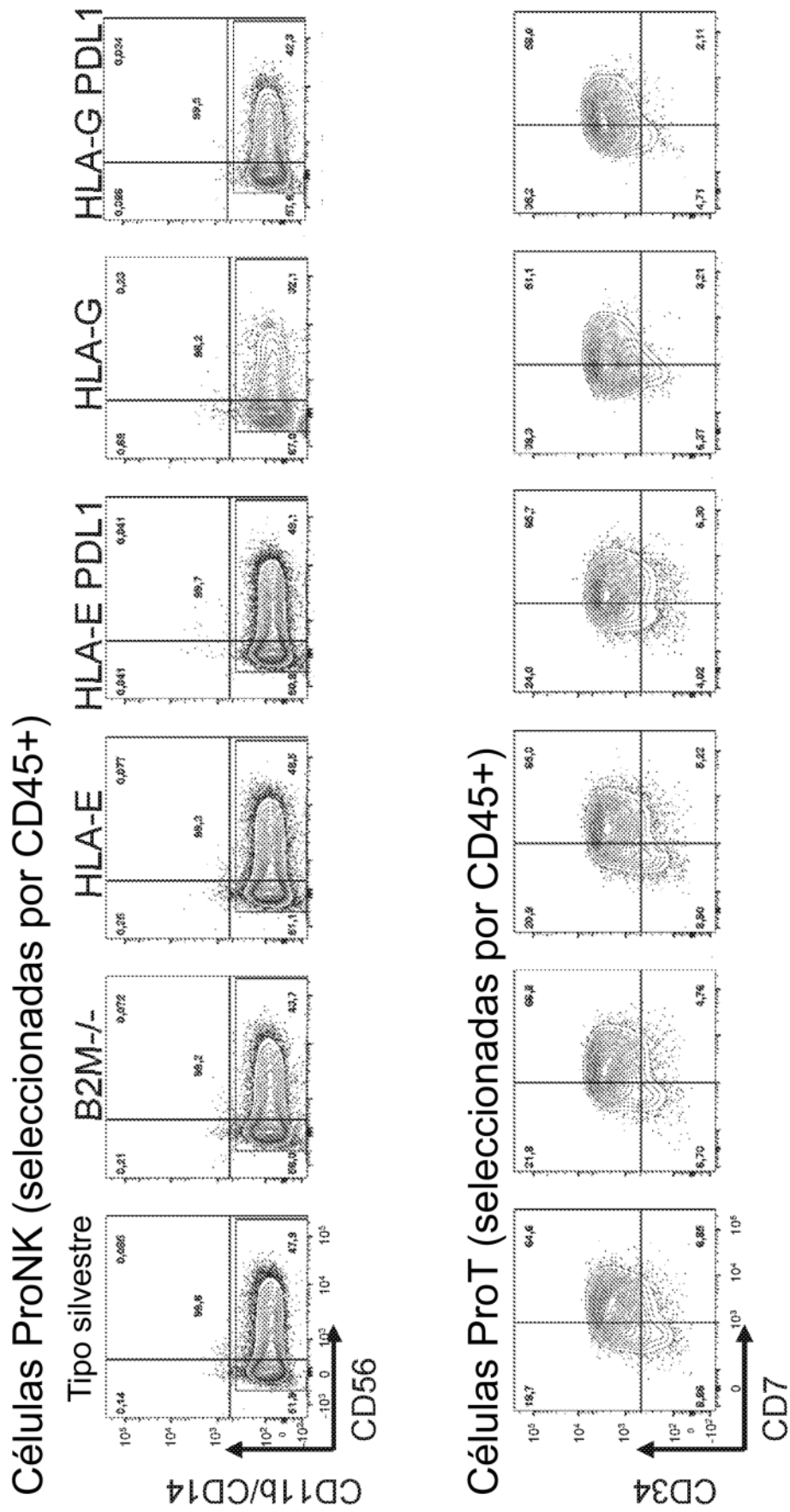


Figura 22

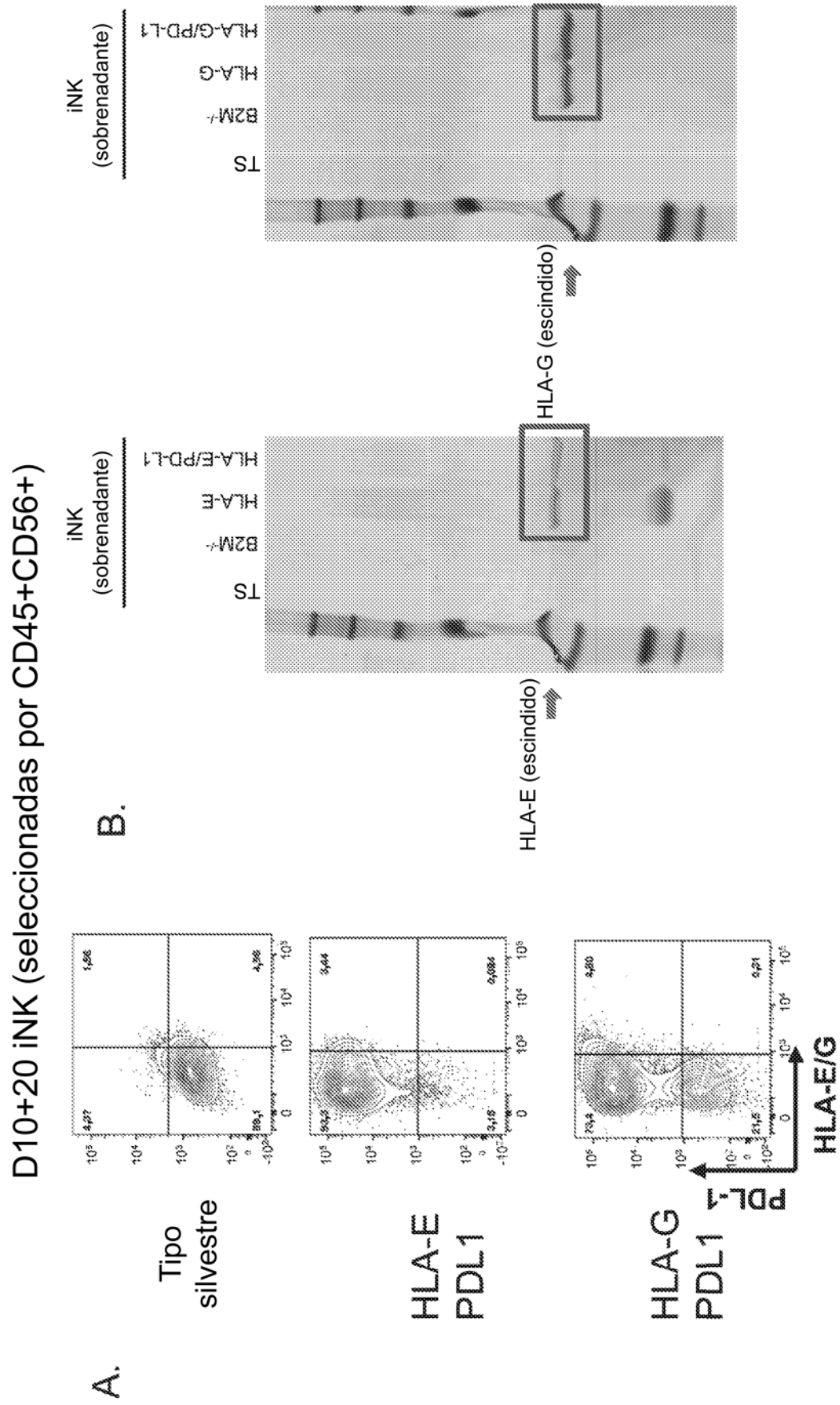


Figura 23

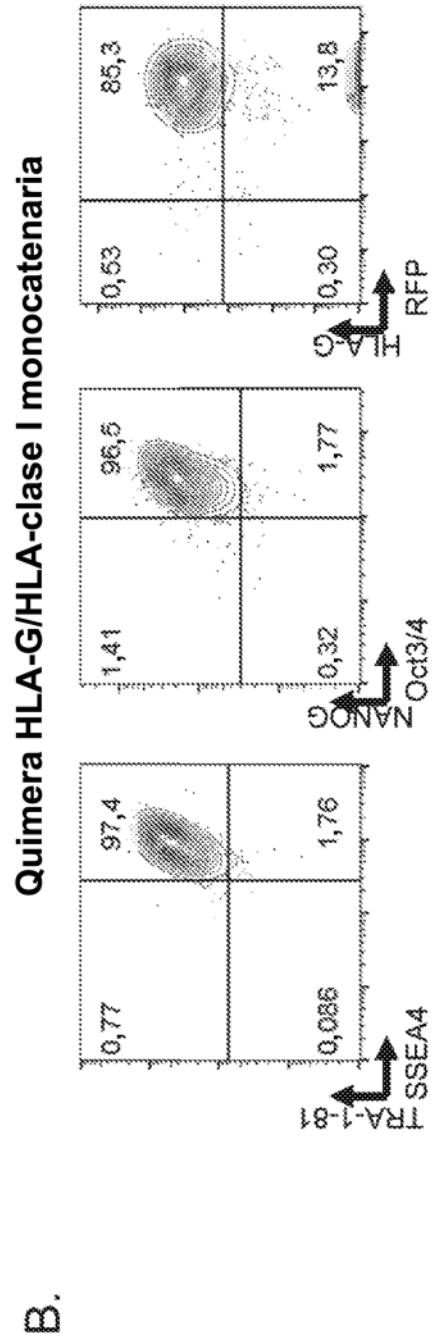
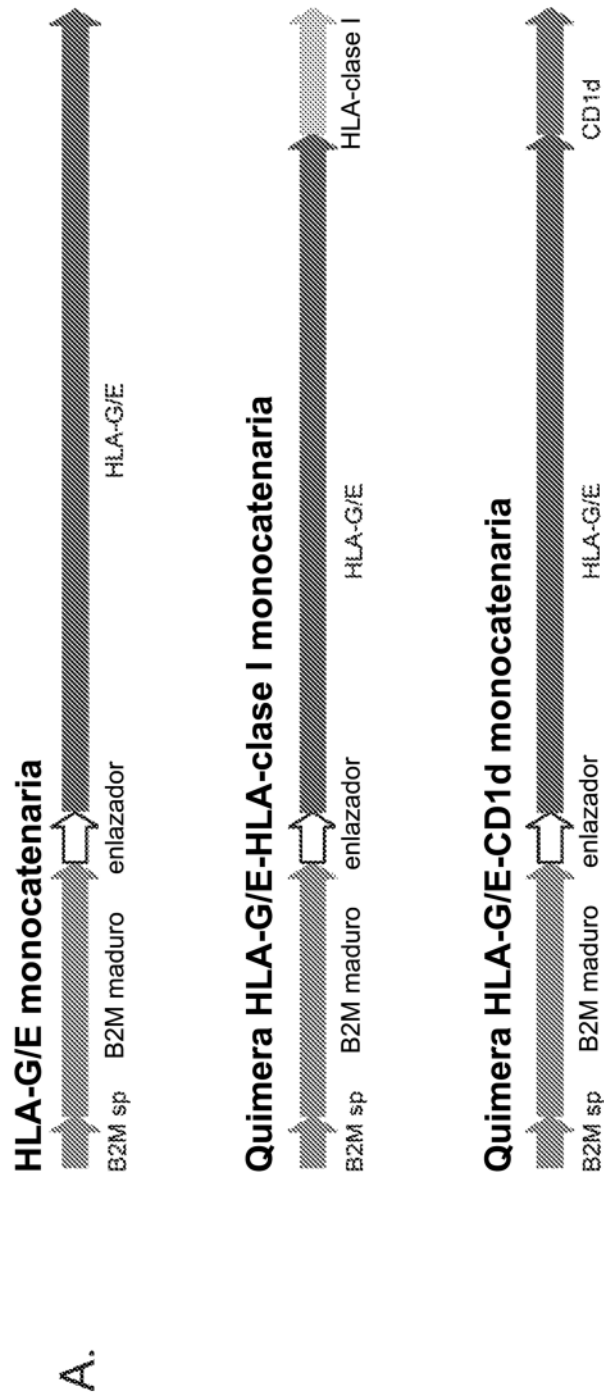


Figura 24

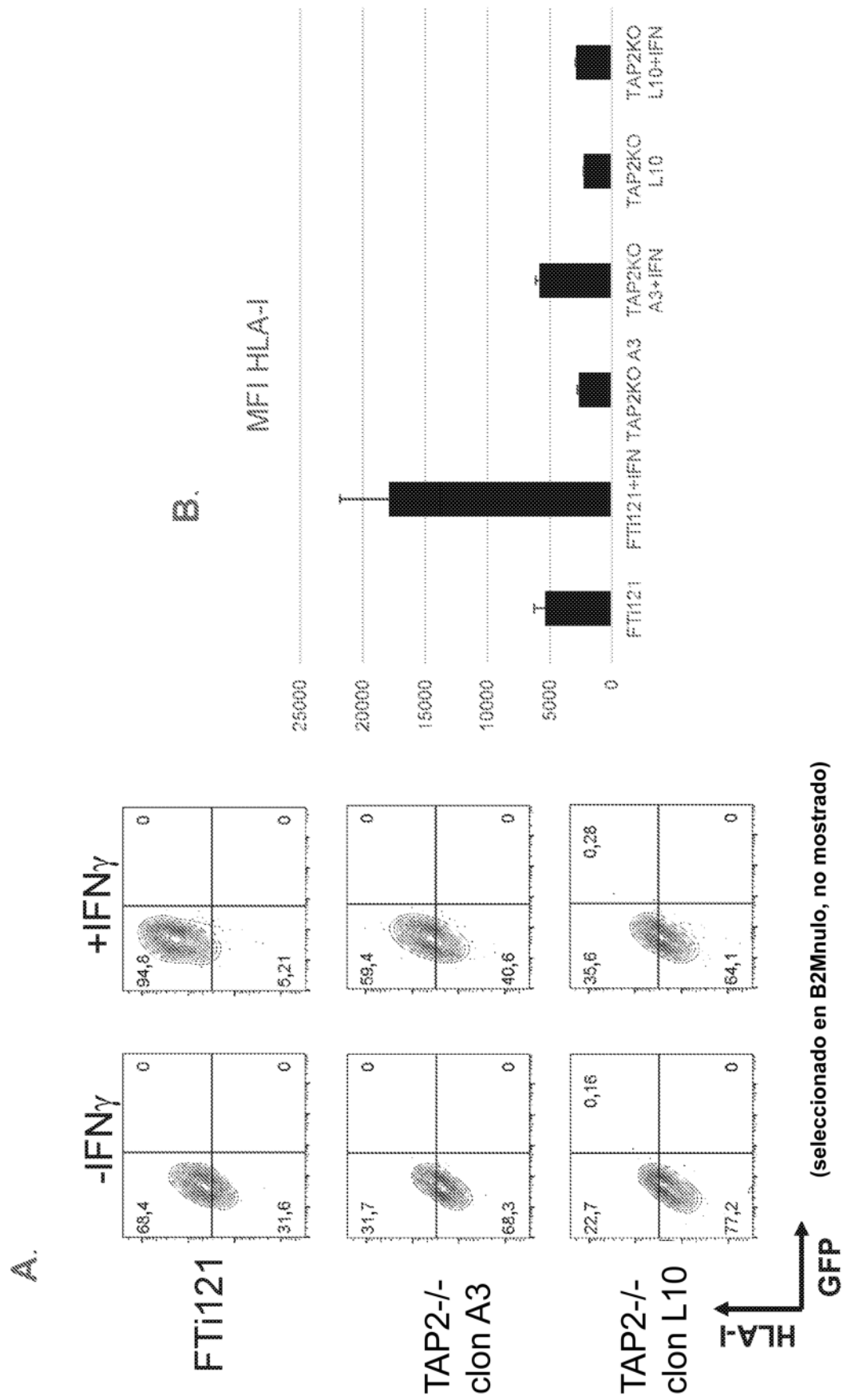


Figura 25

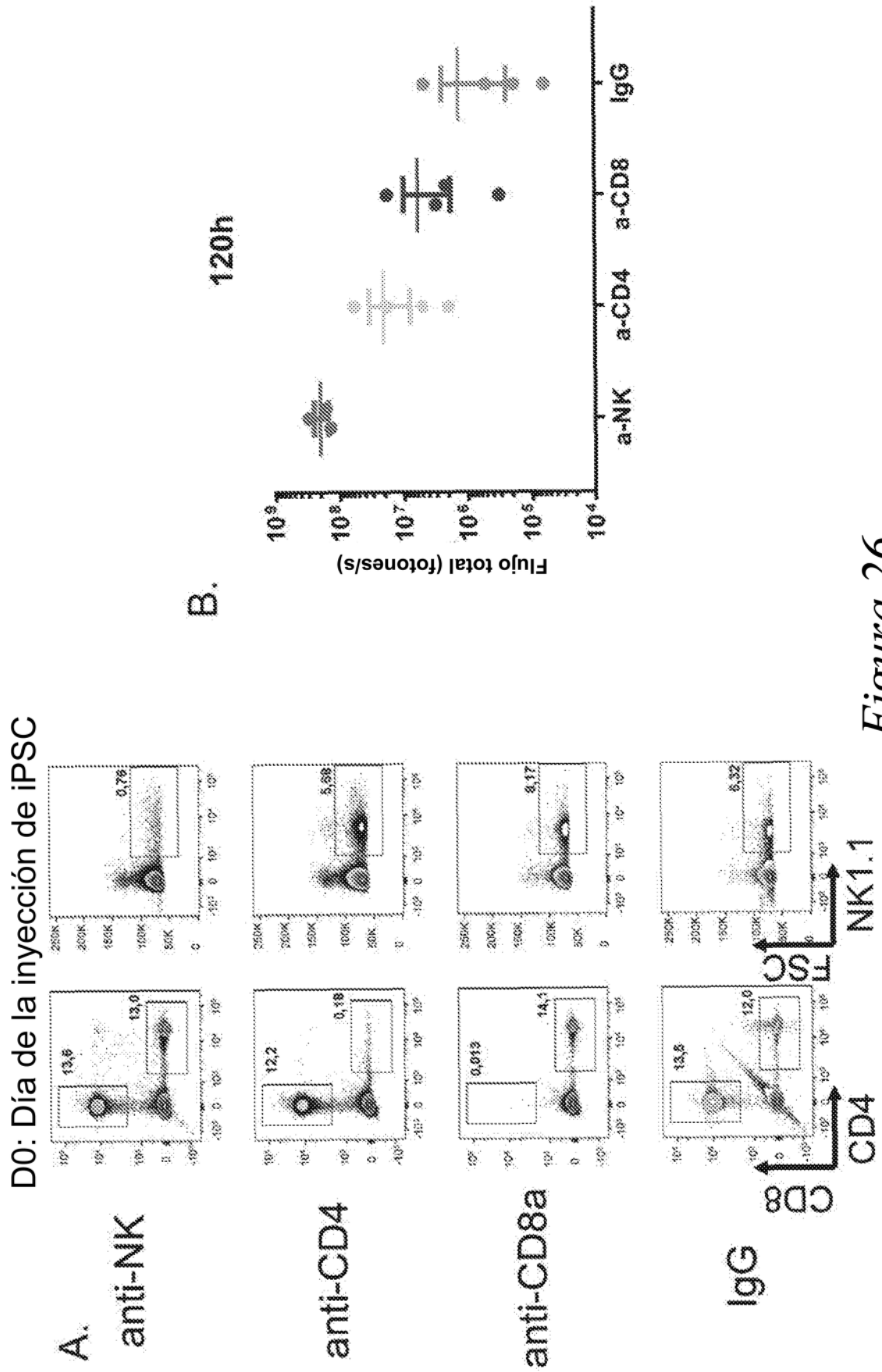


Figura 26

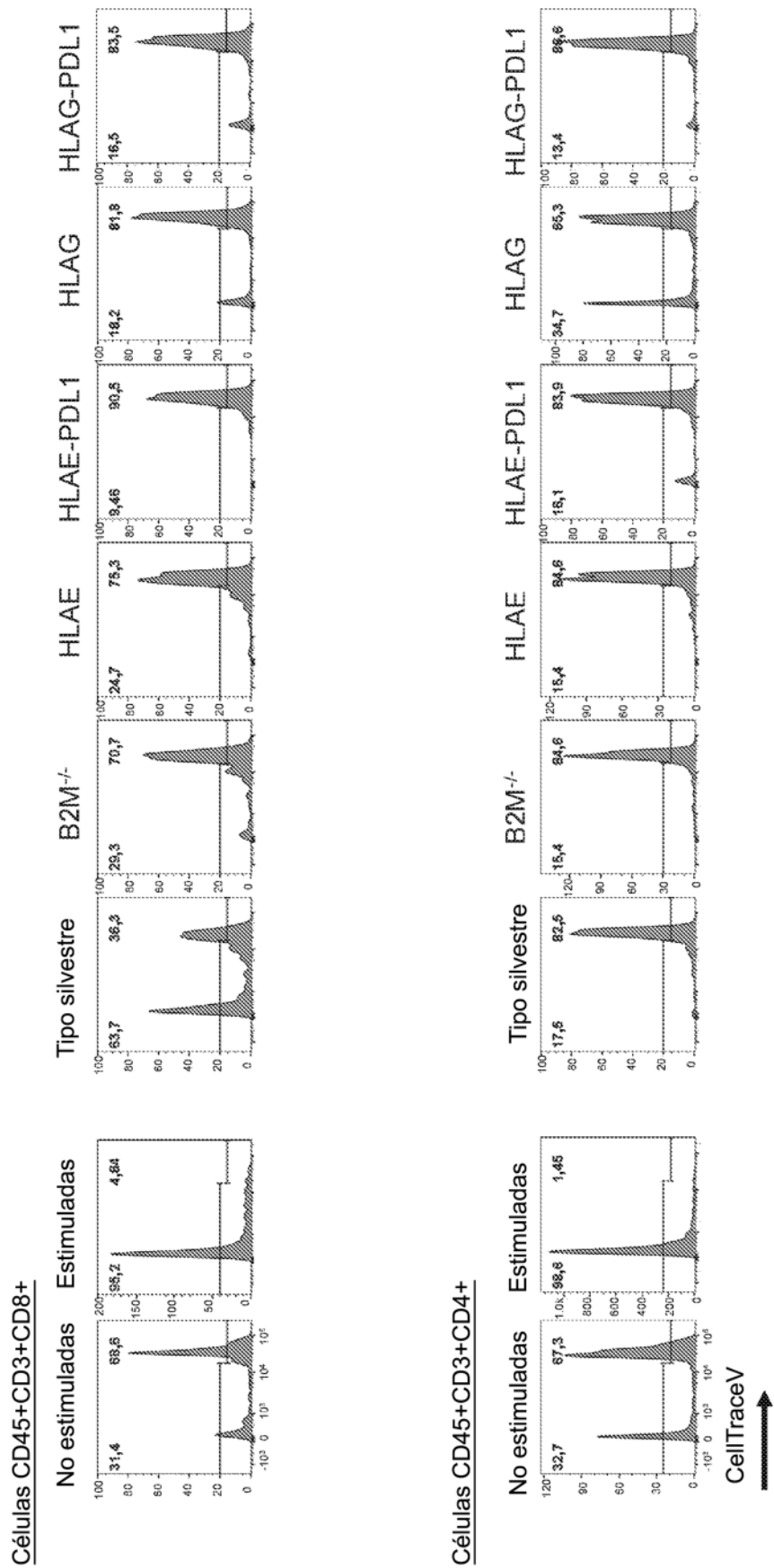


Figura 27A

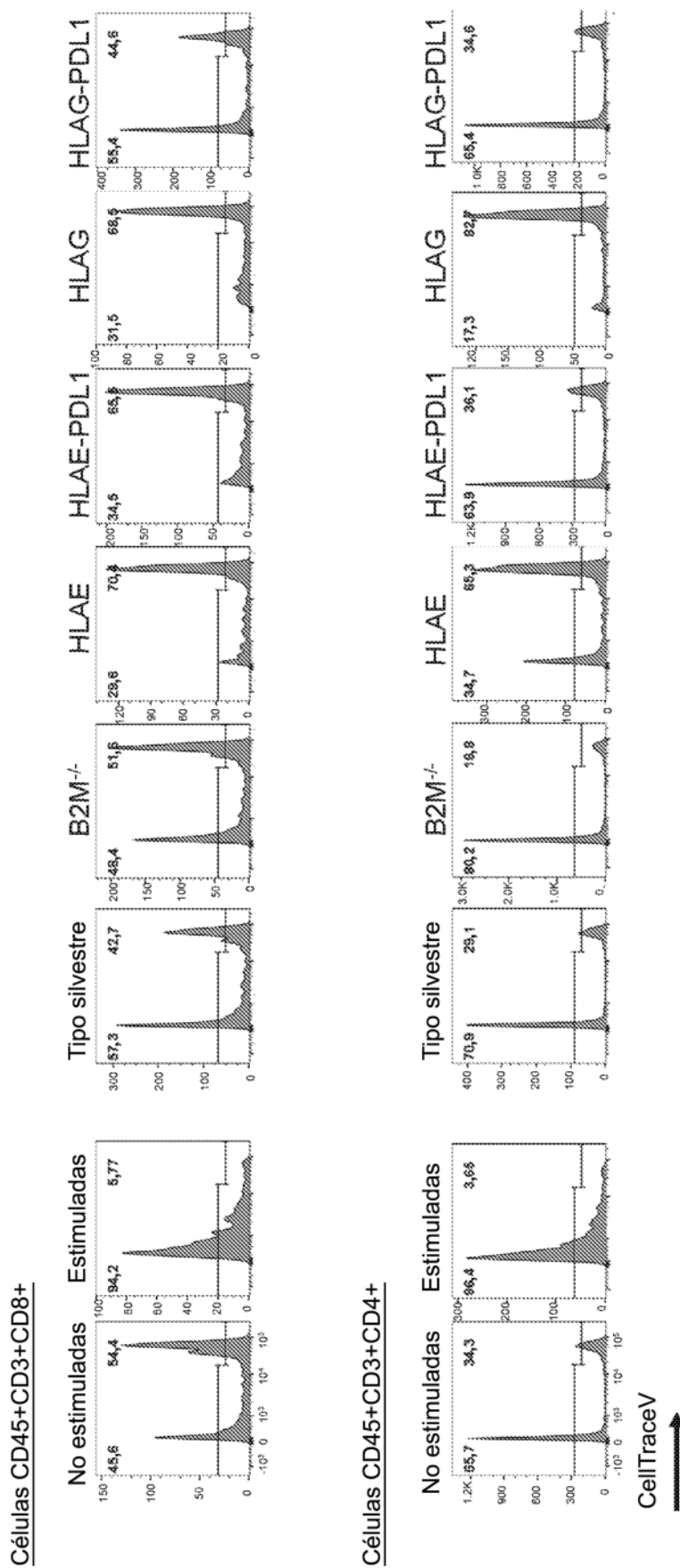


Figura 27B

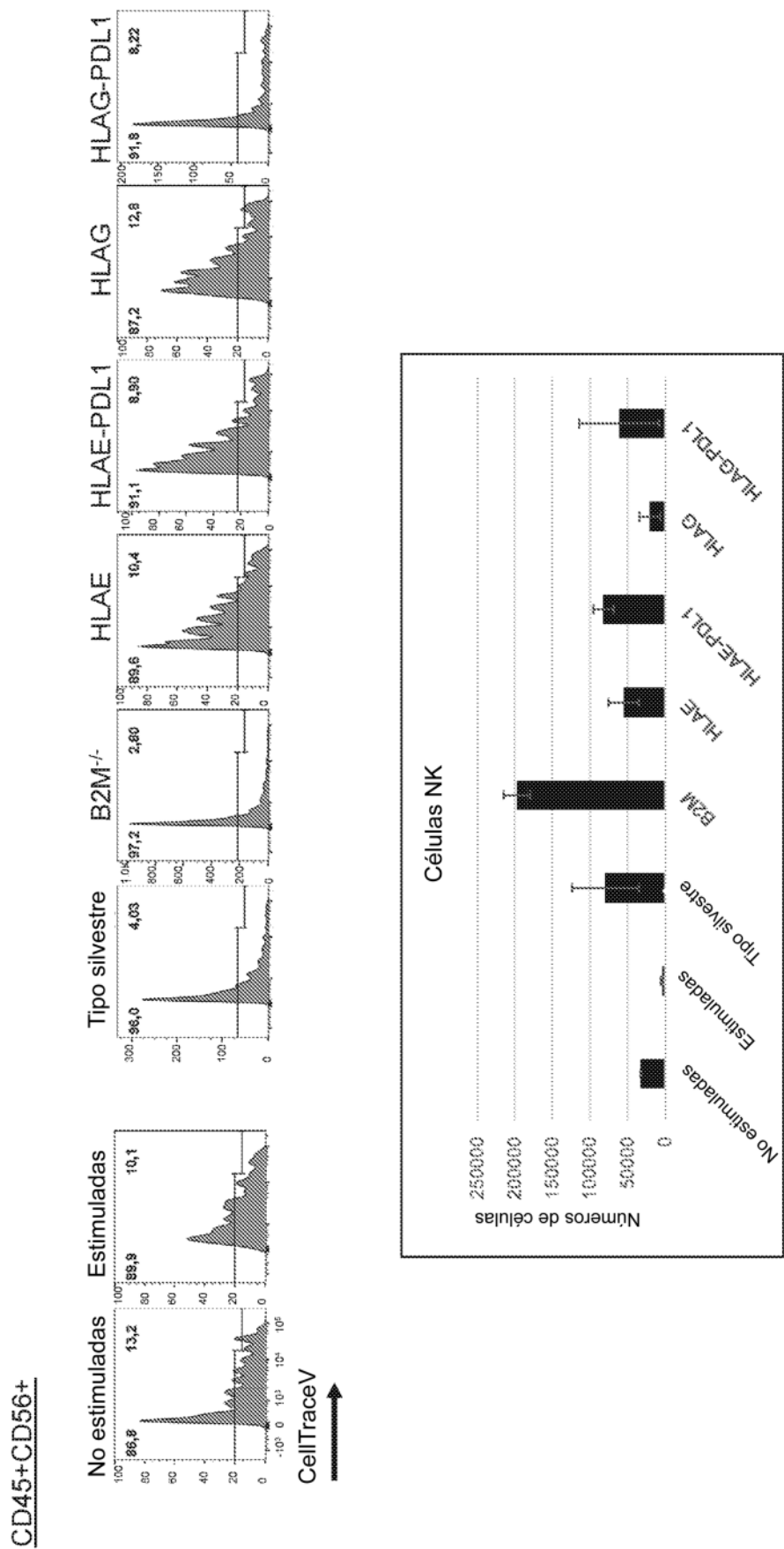


Figura 27C

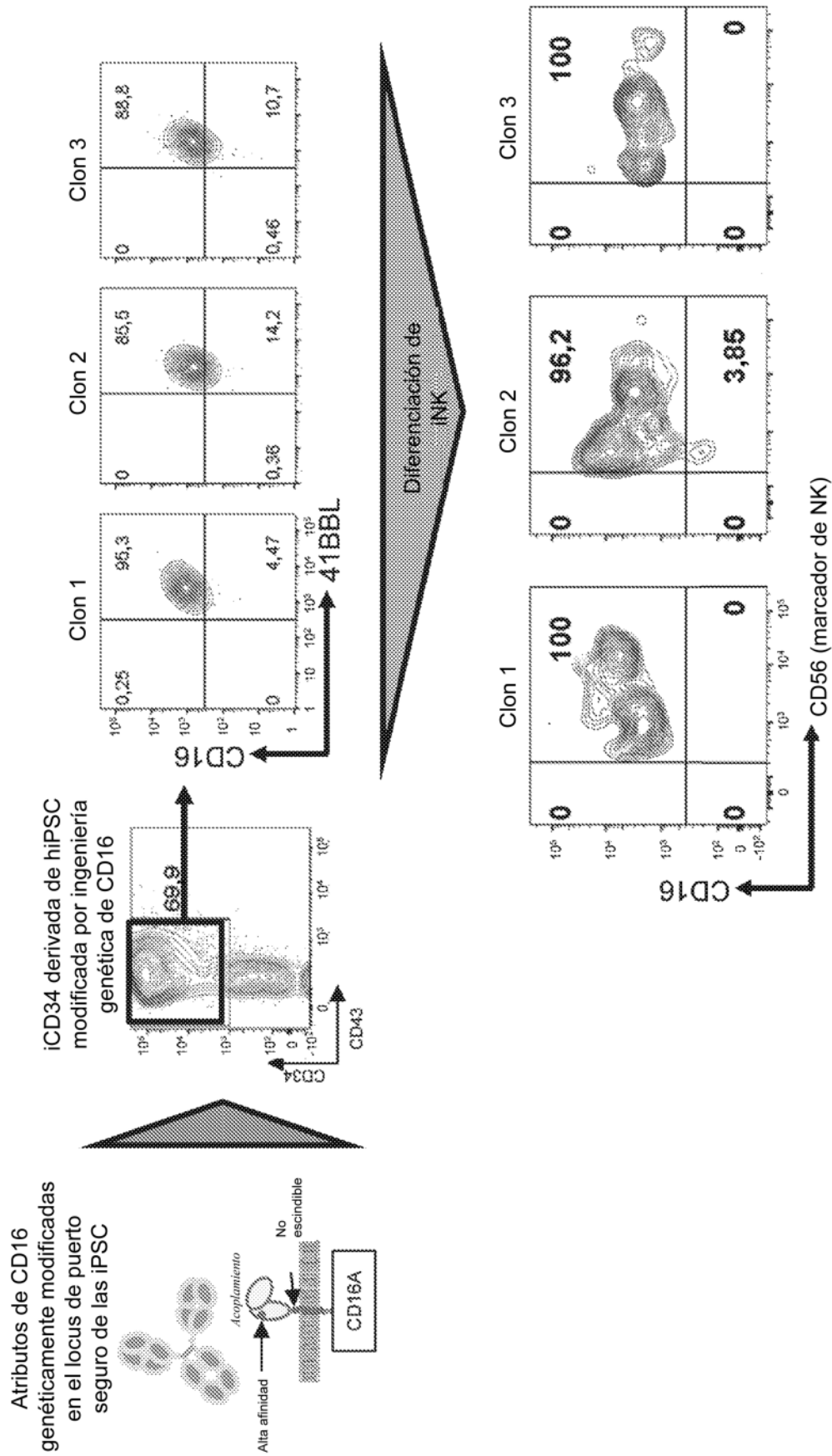
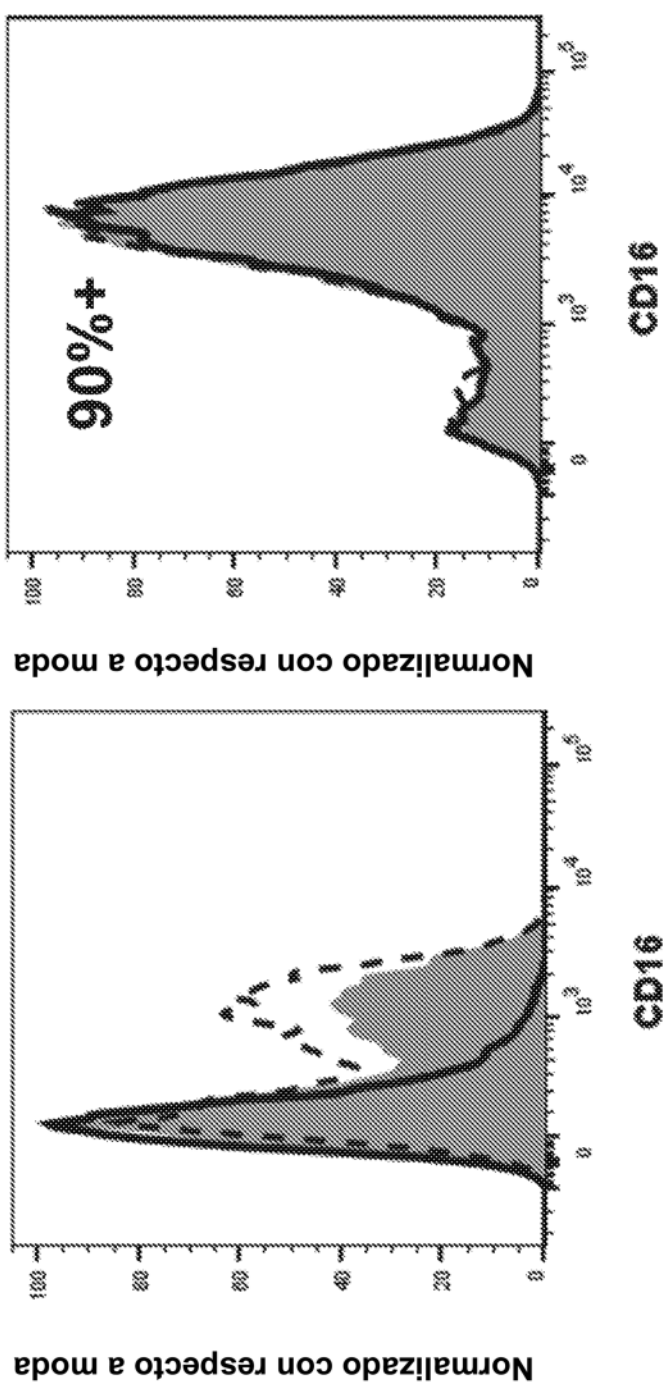


Figura 28A

iNK modificadas por ingeniería genética de hnCD16

NK derivadas de PB



Gris = Control (homeostasis en cultivo)

Discontinua = tratado con inhibidor de TACE/ADAM (inhibe la escisión)

Negra = Estimulado con K562 (desprendimiento de CD16 inducido por la activación)

Figura 28B

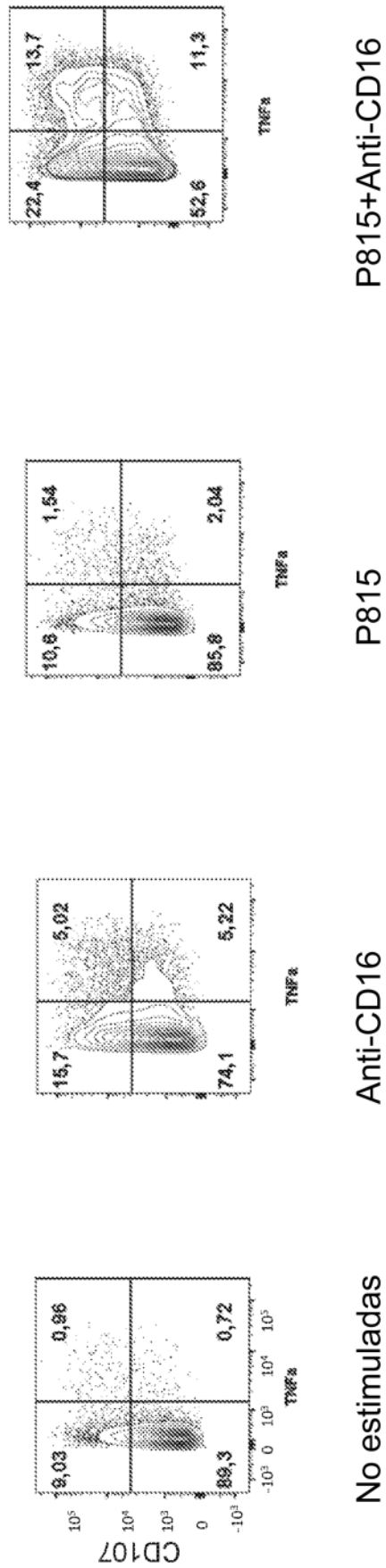


Figura 29A

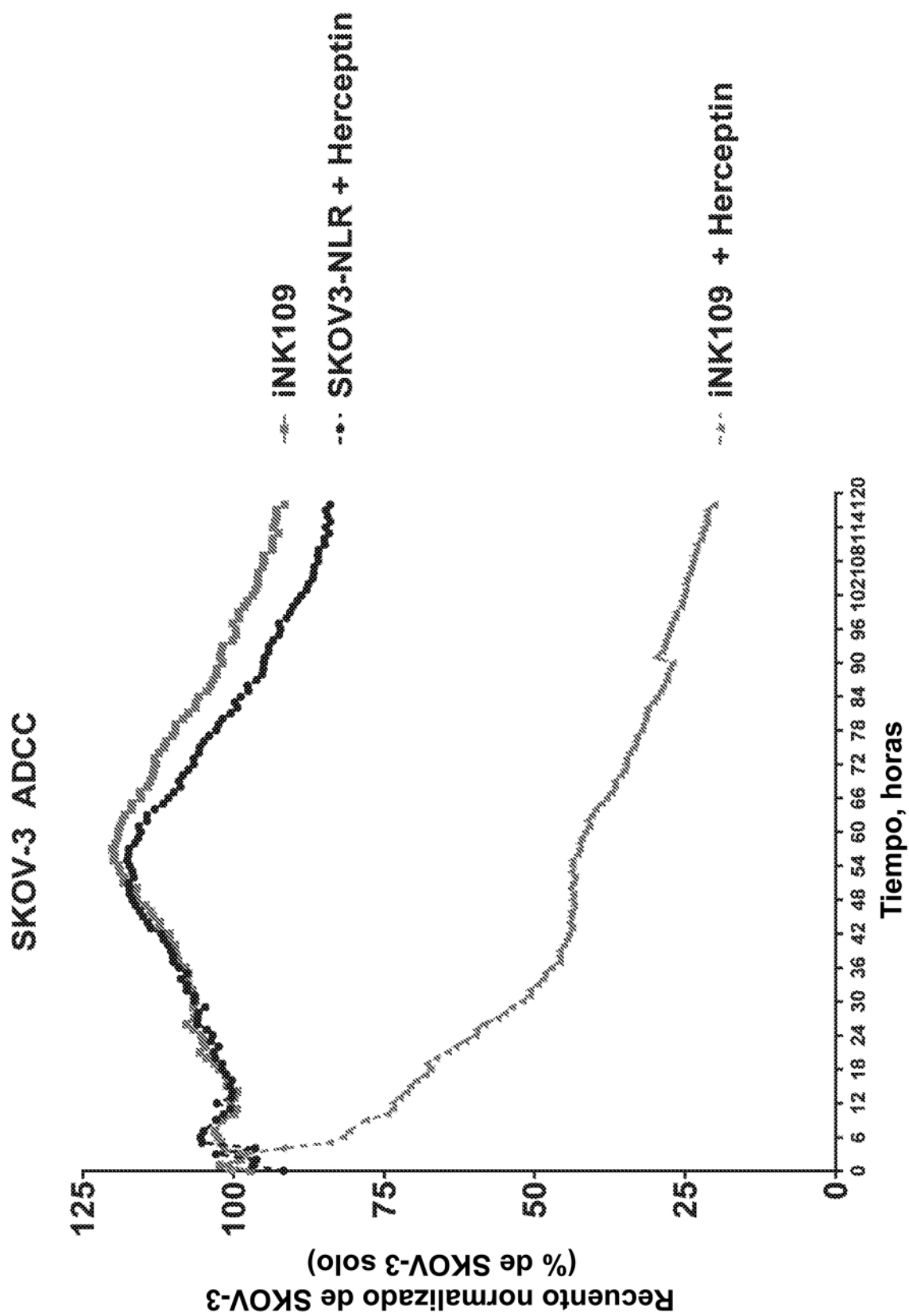


Figura 29B

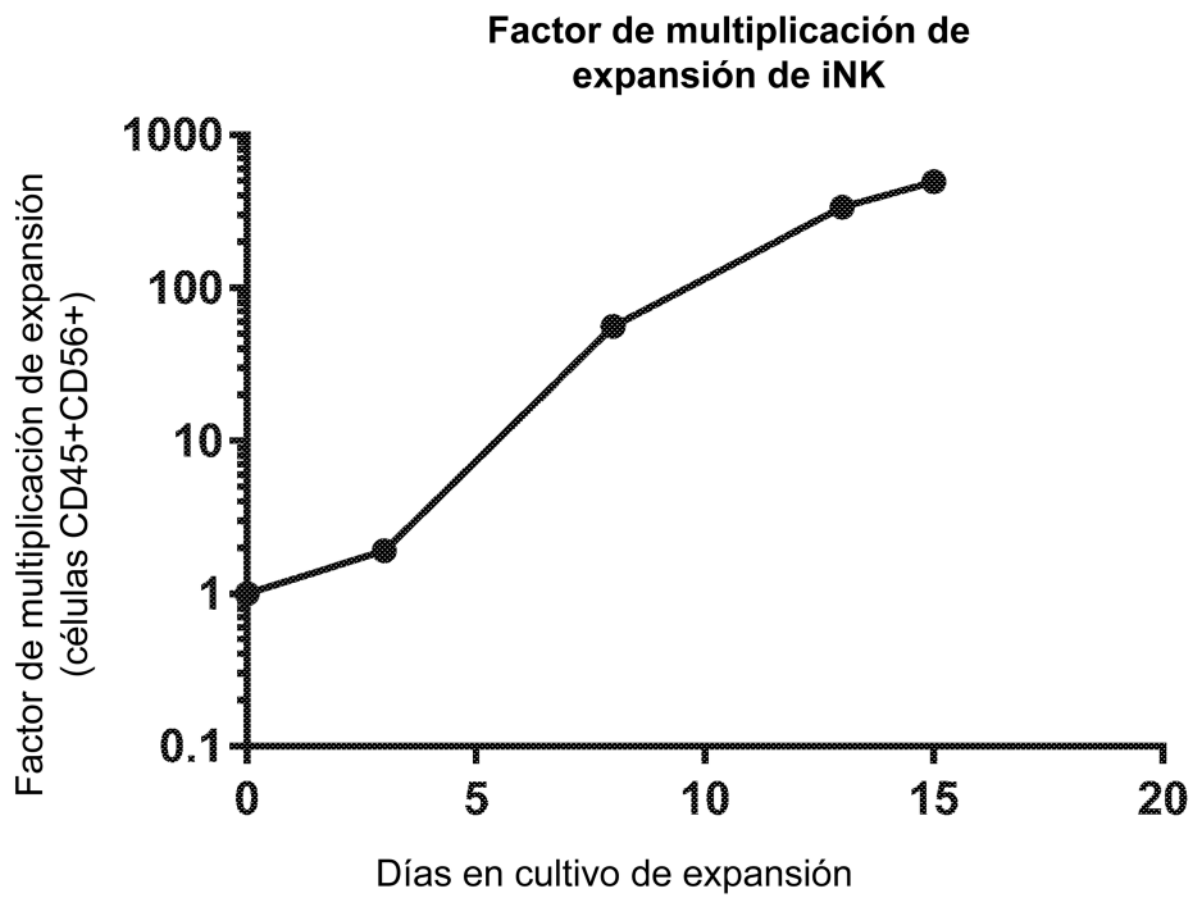


Figura 30

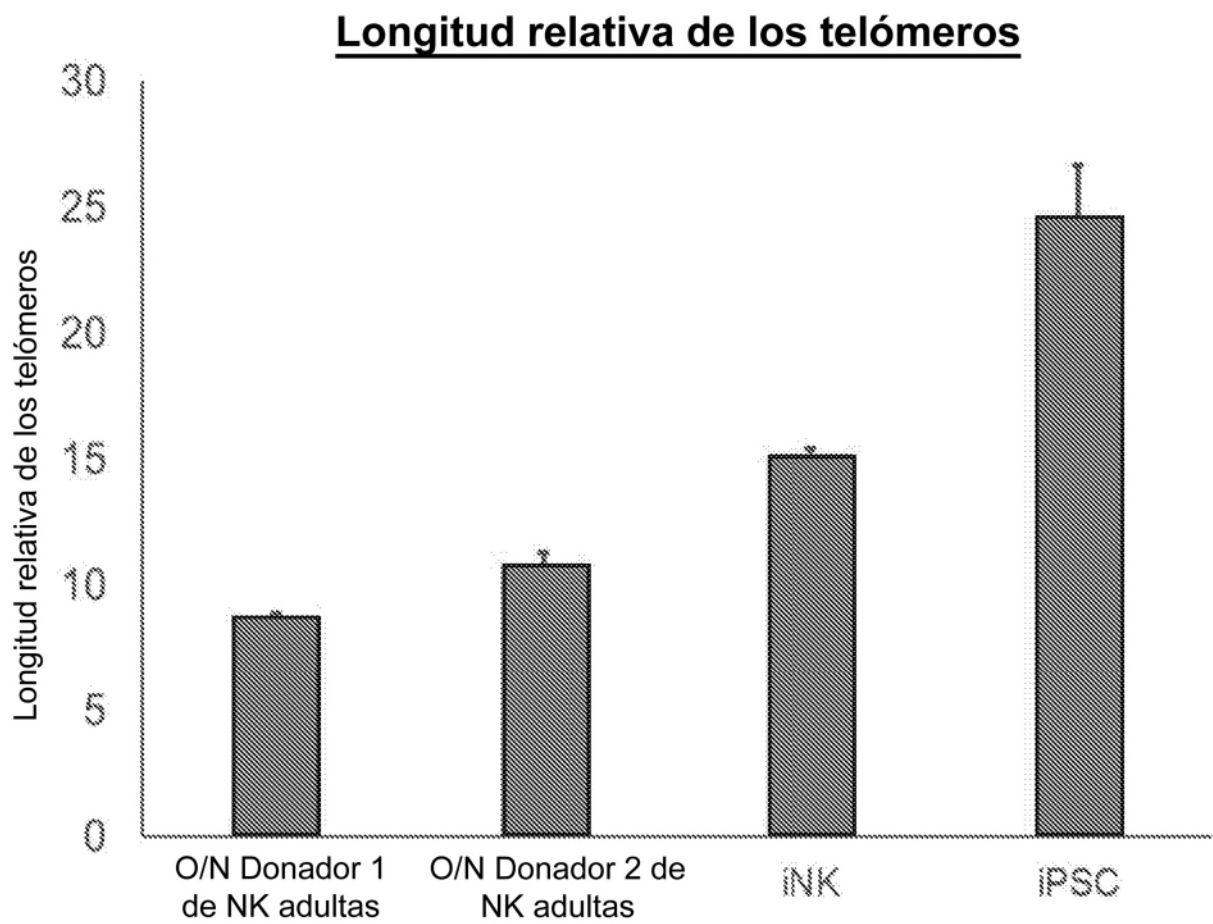


Figura 31

Expresión de CAR-2A-LNGFR inducible por Tet en
iPSC transducidas

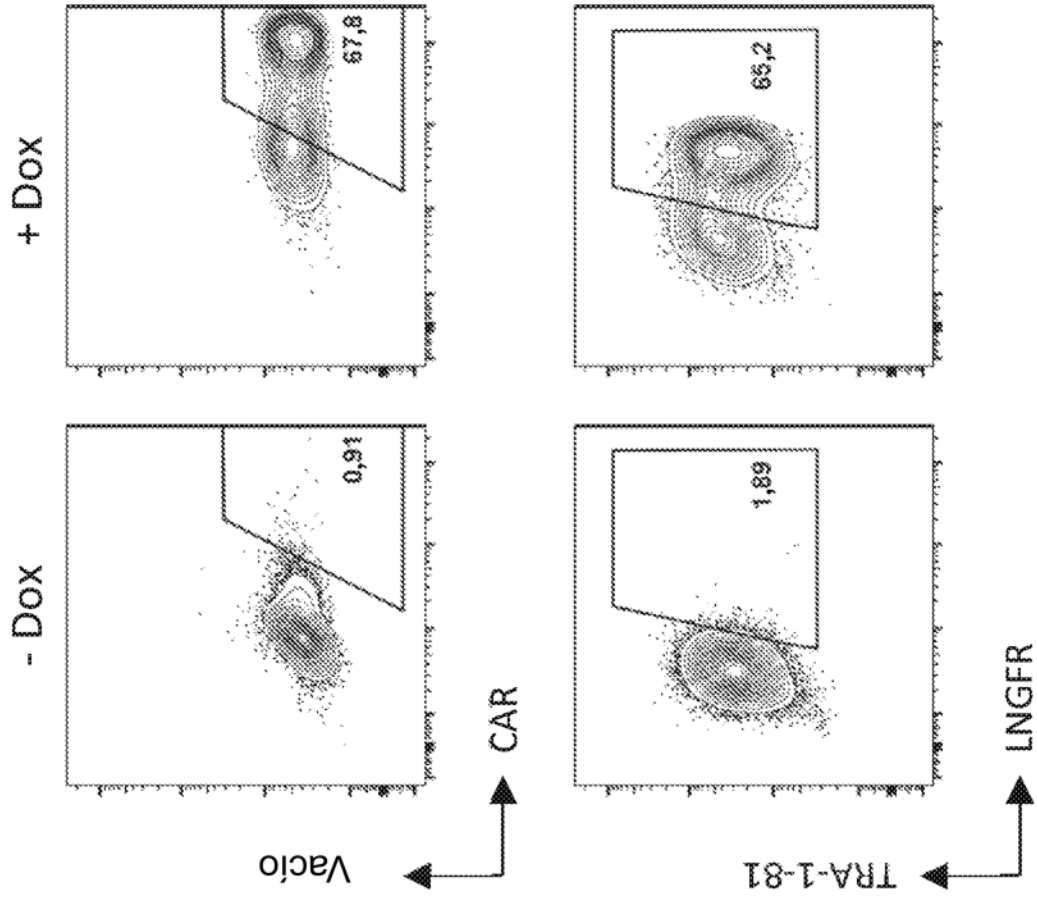


Figura 32A

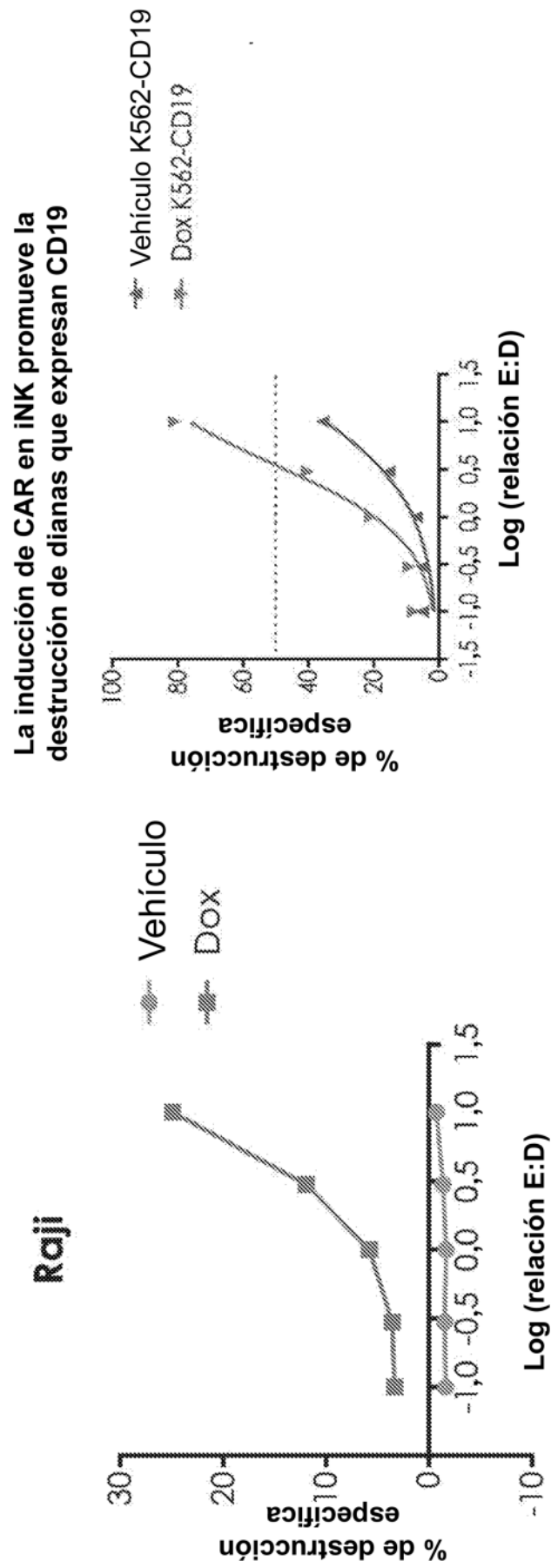


Figura 32B

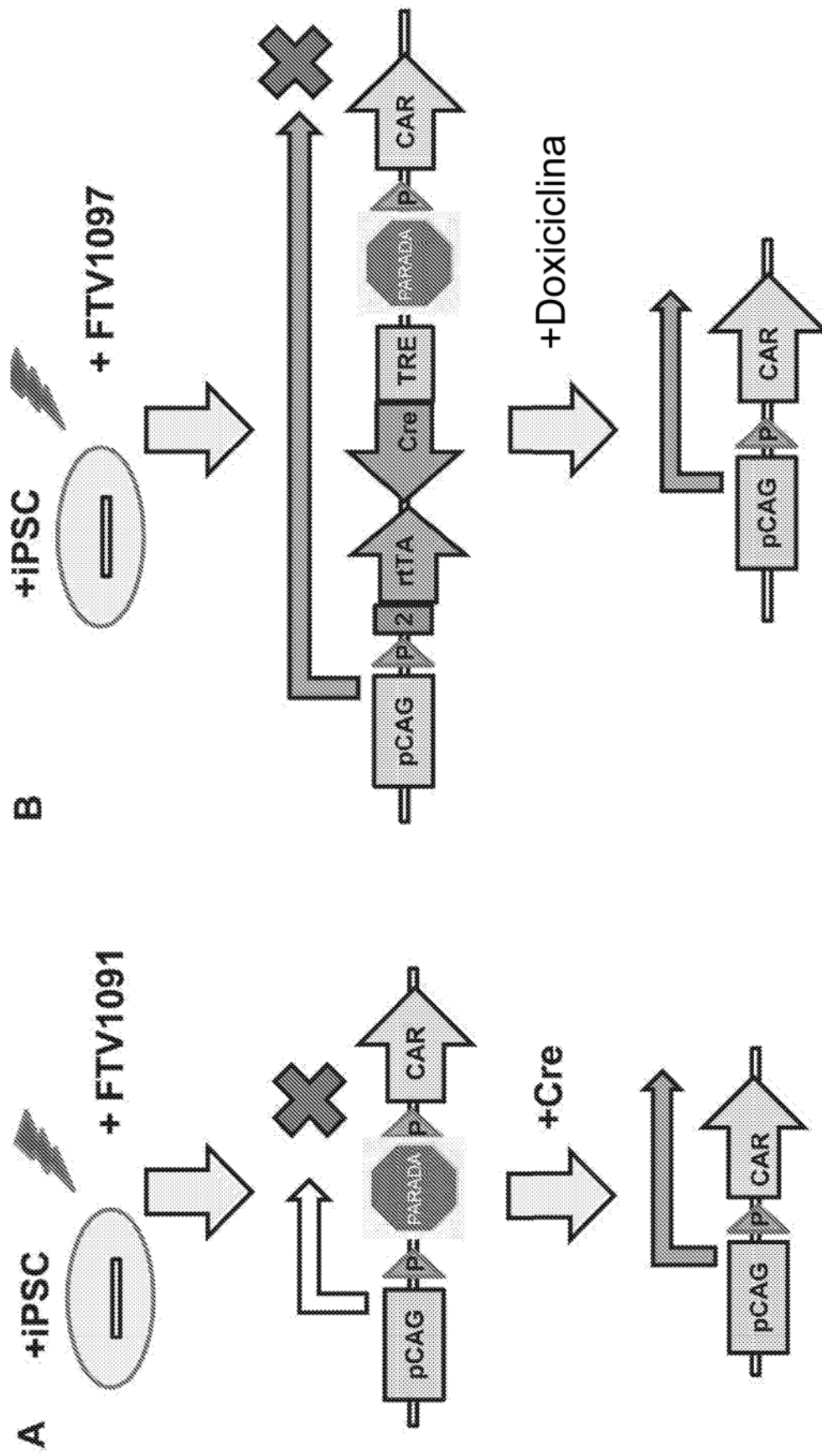


Figura 33

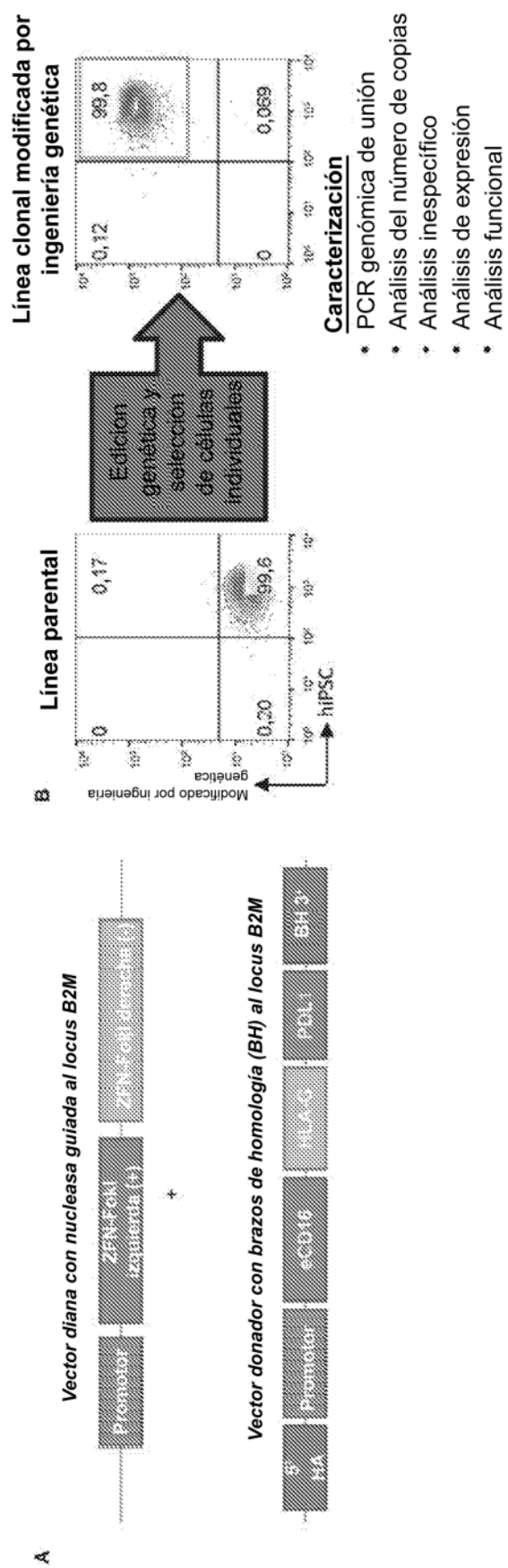
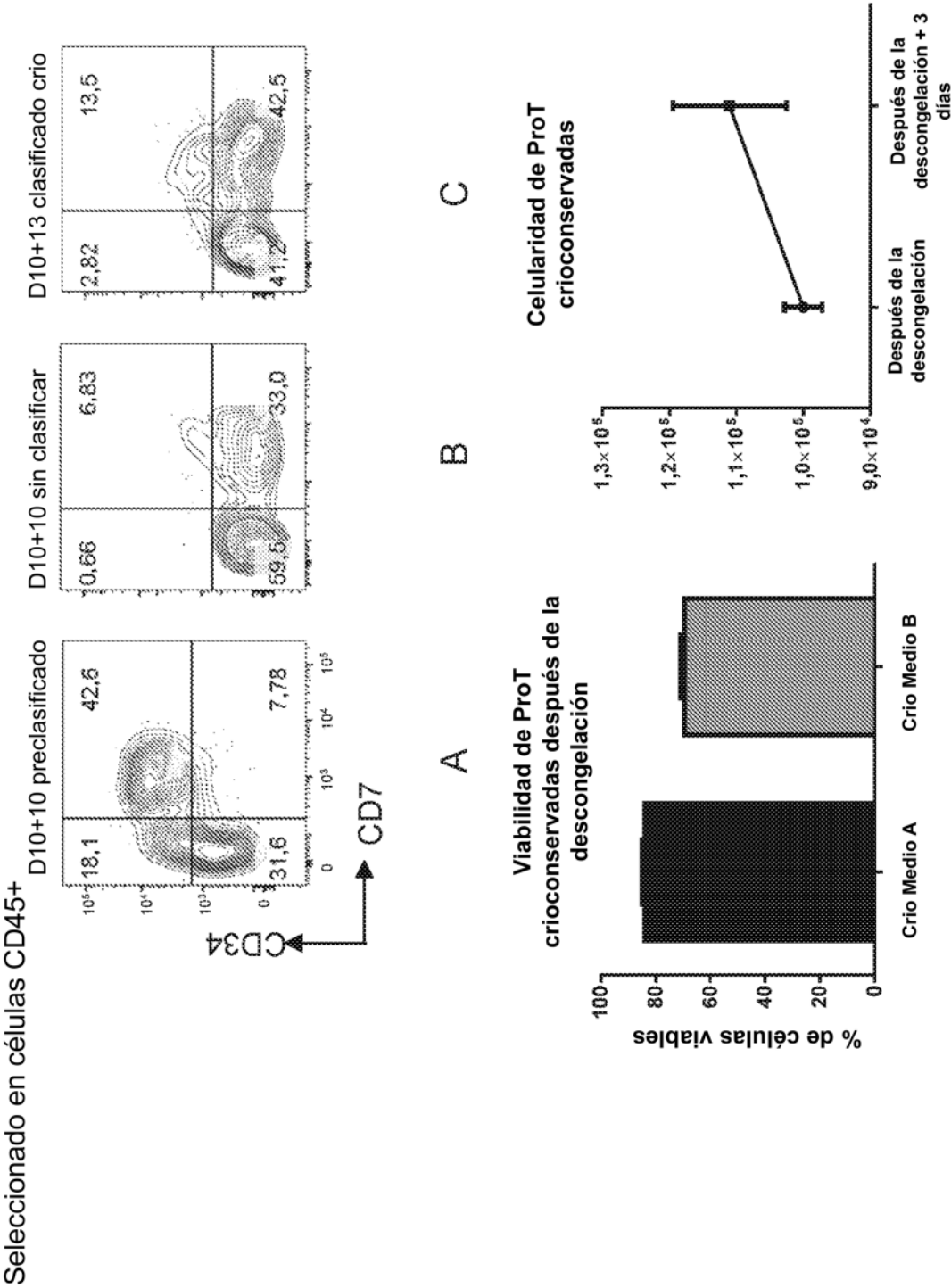


Figura 34



D *Figura 35* E

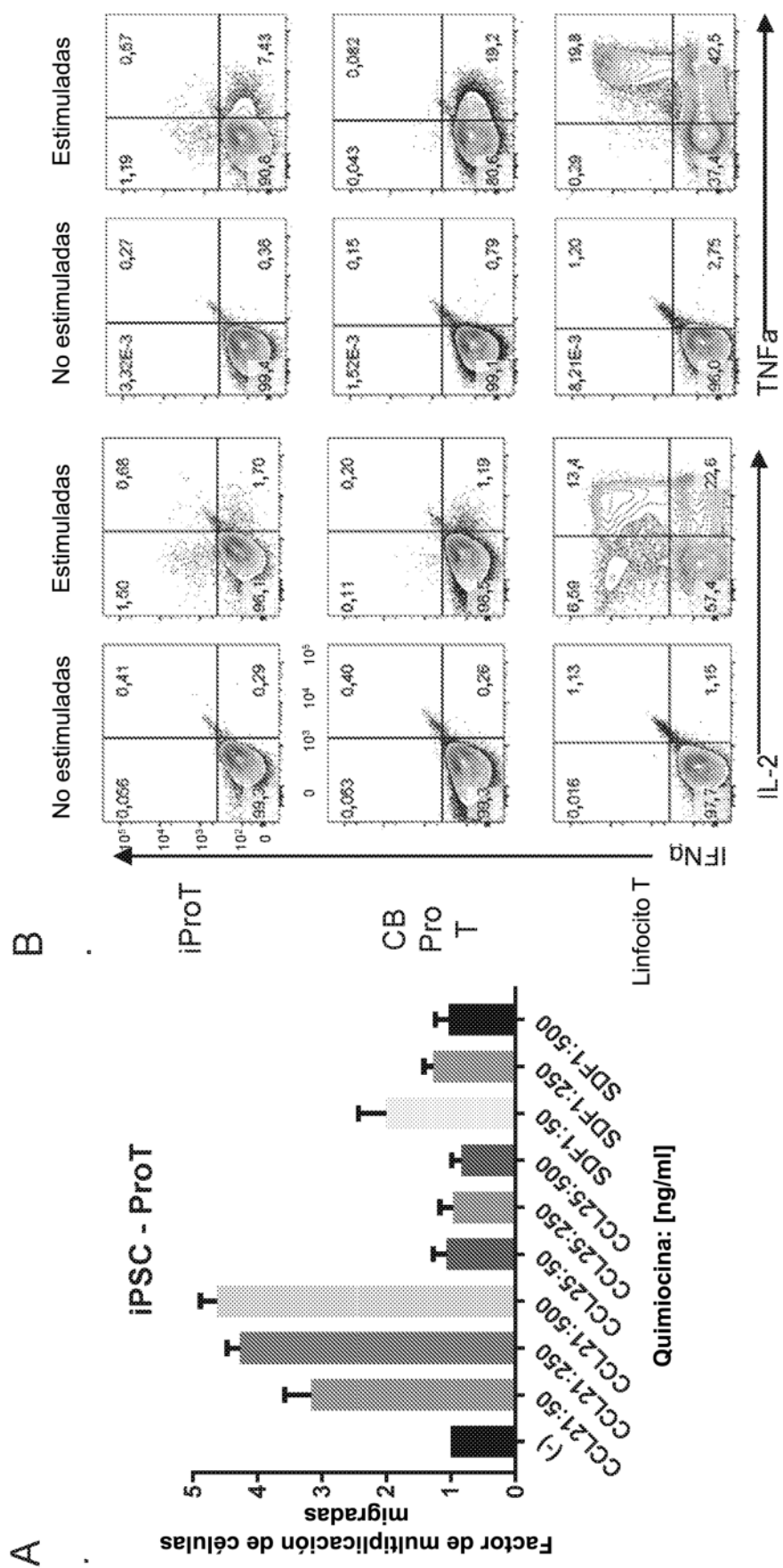


Figura 36

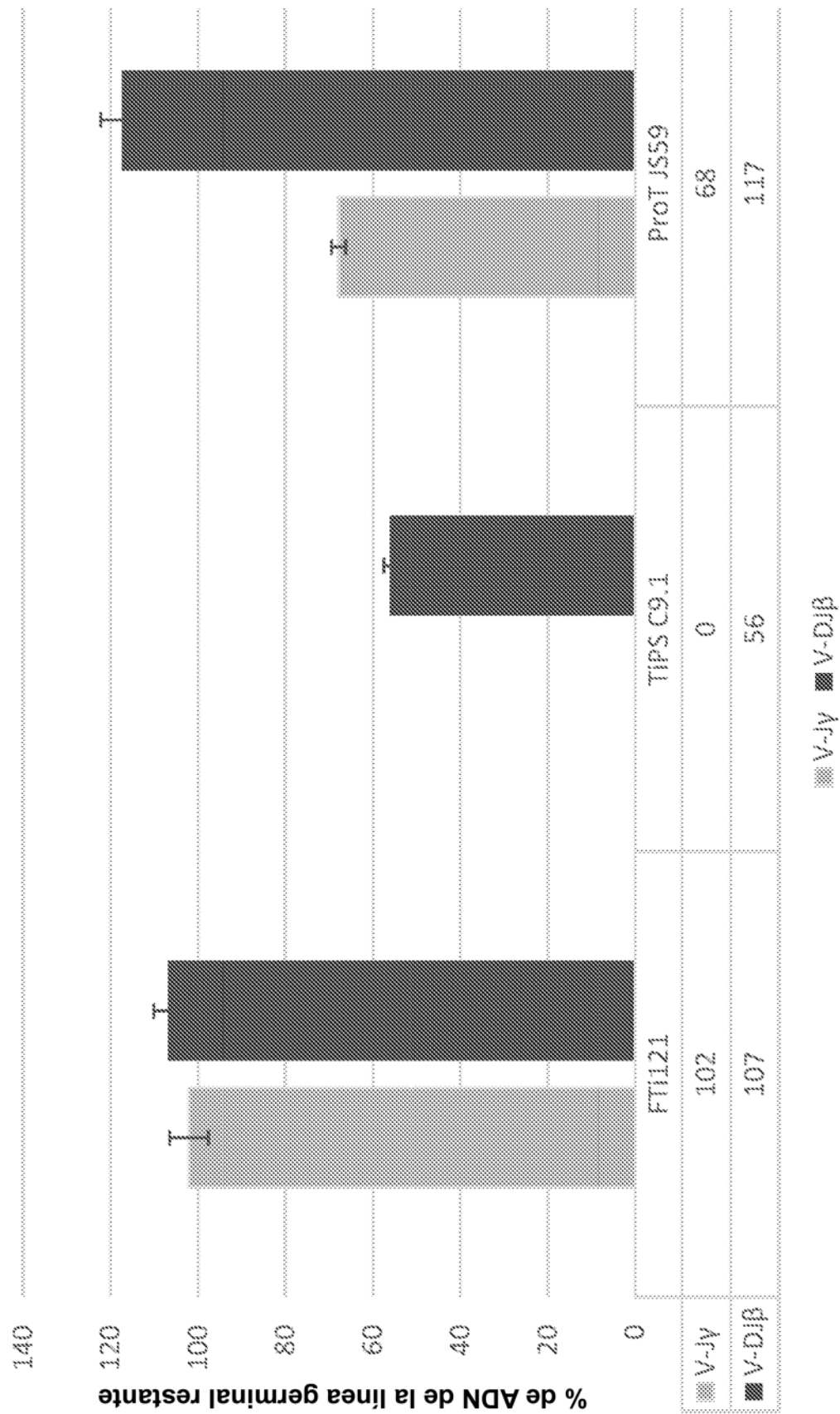


Figura 37