

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 576**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2020 PCT/EP2020/073403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2021 WO21032853**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2020 E 20761197 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024 EP 4017984**

54 Título: **Métodos de transducción lentiviral**

30 Prioridad:

20.08.2019 GB 201911954

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

28.01.2025

73 Titular/es:

**ADAPTIMMUNE LIMITED (100.00%)
60 Jubilee Avenue Milton Park
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RX, GB**

72 Inventor/es:

**SILK, JONATHAN;
MCEWEN-SMITH, ROSANNA;
JAPELJ, NIKA y
HAMILTON, GARTH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 994 576 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de transducción lentiviral

5 Campo

La presente invención se refiere a la transducción lentiviral de células de mamífero, en particular, células T y progenitoras de las mismas, por ejemplo, para su uso en terapia celular adoptiva (ACT).

10 Antecedentes

Las células T (o linfocitos T) se encuentran ampliamente distribuidas dentro de los tejidos y el entorno tumoral. Las células T se distinguen de otros linfocitos en la presencia de receptores de células T (TCR) sobre la superficie celular. El TCR es un complejo transmembrana de múltiples subunidades que media la activación específica de antígeno de células T. El TCR confiere especificidad de antígeno a la célula T, reconociendo un ligando peptídico de antígeno que se presenta en la célula diana por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Aunque los péptidos derivados de proteínas alteradas o mutadas en células diana tumorales pueden reconocerse como extraños por células T que expresan TCR específicos, muchos antígenos en las células tumorales simplemente se regulan por incremento o se sobreexpresan (los llamados autoantígenos) y no inducen una respuesta de células T funcionales. Por lo tanto, los estudios se han centrado en identificar antígenos tumorales diana que se expresan, o se expresan altamente, en el tipo celular maligno pero no en el normal. Ejemplos de tales dianas incluyen el antígeno testicular de cáncer (CT) NY-ESO-1, que se expresa en una amplia gama de cánceres humanos pero muestra una expresión restringida en tejidos normales (Chen Y-T et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94(5):1914-1918), y la familia

20 **25** **30** **35** **40** **45** **50** **55** **60** **65**

MAGE-A de antígenos CT que se expresan en un número muy limitado de tejidos sanos (Scanlan M. J. et al. Immunol Rev. 2002; 188:22-32).

La identificación de tales antígenos ha promovido el desarrollo de inmunoterapia basada en células T dirigidas, que tiene el potencial de proporcionar una terapia contra el cáncer específica y efectiva (Ho, W.Y. et al. Cancer Cell 2003; 3:1318-1328; Morris, E.C. et al. Clin. Exp. Immunol. 2003; 131 :1-7; Rosenberg, S.A. Nature 2001; 411:380-384; Boon, T. y van der Bruggen P. J. Exp. Med. 1996; 183:725-729).

Dishart et al (2003) J Mol Cell Cardiol 35 (2003) 739-748 notifica que la presencia de poloxámero P-407 aumenta la transducción lentiviral de células endoteliales y del músculo liso. El documento WO2013/127964 y Höfig et al. J Gene Med 2012 14 549-560 notifican que los poloxámeros de 12,8-15 kDa, tal como Synperonic F108, mejoran la transducción celular con vectores lentivirales.

Se requieren métodos de transducción robustos y eficientes para transducir células T y células progenitoras de las mismas con vectores de expresión que codifican receptores, incluyendo receptores de células T (TCR) y receptores de antígeno quimérico (CAR), que reconocen antígenos tumorales. Estos métodos serían útiles, por ejemplo, para proporcionar células T para su uso en la terapia adoptiva de células T, en particular en la terapia contra el cáncer.

Sumario

Los presentes inventores han reconocido que la eficacia de los poloxámeros para aumentar la eficiencia de la transducción puede mejorarse exponiendo células de mamífero a un poloxámero durante 6 horas o más antes de que las células se expongan a un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G. Esto puede ser útil, por ejemplo, en la transducción de células T o células progenitoras que se diferencian en células T.

Un aspecto de la invención proporciona un método de transducción de células de mamífero que comprende:

- (i) exponer una población de células de mamífero a un poloxámero en ausencia de un vector lentiviral durante 6 horas o más para producir una población de células de mamífero cebadas por transducción y
- (ii) exponer la población de células de mamífero cebadas por transducción a un vector lentiviral, de modo que las células de mamífero se transducen con el vector lentiviral; y
- (iii) separar las células de mamífero transducidas del poloxámero,

en donde el vector lentiviral es un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G.

El vector lentiviral comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un receptor de antígeno, tal como un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico.

Preferiblemente, la población de células de mamífero se expone al poloxámero en ausencia del vector lentiviral durante aproximadamente 1 día.

Preferiblemente, las células de mamífero transducidas se separan del poloxámero después de aproximadamente 3

días de exposición al vector lentiviral.

En algunas realizaciones, un método de transducción de células de mamífero puede comprender:

- 5 (i) exponer una población de células de mamífero el día 0 a un poloxámero en ausencia de un vector lentiviral para producir una población de células T cebadas por transducción y
- (ii) exponer la población de células de mamífero cebadas por transducción en el día 1 a un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G, de modo que las células T se transducen con el vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G; y
- 10 (iii) separar las células de mamífero transducidas en el día 4 del poloxámero.

Preferiblemente, las células de mamífero son células T o células que son capaces de diferenciarse en células T, tal como células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células mesodérmicas (MC), células endoteliales hemogénicas (HEC), células madre hematopoyéticas (HPC) y células T progenitoras.

15 Otros aspectos y realizaciones de la invención se describen con más detalle a continuación.

Breve descripción de las figuras

20 La Figura 1 muestra la transducción de células T por lentivirus que codifica MAGE-A10, NY-ESO-1 y MAGE-A4 TCR en presencia de 0,25 mg/ml, 1 mg/ml o 4 mg/ml de poloxámero.

La Figura 2 muestra el número de células T transducidas en el día 7 después de la transducción en el día 1 por lentivirus en presencia o ausencia de 1 mg/ml de poloxámero (F108; LentiBOOST™) con o sin lavado celular en el día 4.

La Figura 3 muestra la eficiencia de la transducción lentiviral de células T después de la transducción en el día 1 por lentivirus con 1 mg/ml de poloxámero (F108; LentiBOOST™) añadido en el día 0, día 1 - 6 horas (día 0 + 18 horas) y día 1.

30 La Figura 4 muestra una vista esquemática de un ejemplo de un método de seis fases para generar células T a partir de iPSC.

La Figura 5 muestra la expresión de un TCR en células T diferenciadas a partir de iPSC donde el gen que codifica el TCR se introdujo mediante la transducción mejorada con poloxámero de lentivirus pseudotipificado con VSV-G que contiene el gen.

La Figura 6 muestra el aumento en el LDL-R de la superficie celular provocado por la incubación de las células T en concentraciones variables del poloxámero F108.

40 Descripción detallada

Esta invención se refiere a la transducción *in vitro* de células de mamífero usando un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G. Las células de mamífero se ceban por transducción a través de la exposición a un poloxámero antes de exponerse al vector lentiviral. En el presente documento se muestra que el cebado previo de las células de mamífero con el poloxámero durante seis horas o más antes de la exposición al lentivirus aumenta inesperadamente la eficiencia de la transducción lentiviral.

50 Preferiblemente, las células de mamífero son células humanas.

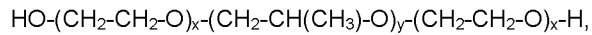
En algunas realizaciones, las células de mamífero pueden ser células T.

En otras realizaciones, las células de mamífero pueden ser células progenitoras, por ejemplo, células no diferenciadas o parcialmente diferenciadas, que son capaces de diferenciarse en células T. Las células progenitoras pueden incluir células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células mesodérmicas (MC), células endoteliales hemogénicas (HEC), células madre hematopoyéticas (HPC) o células T progenitoras (células proT).

Las células de mamífero se ceban en la transducción mediante exposición a poloxámero. Esta exposición mejora la eficiencia de la transducción cuando las células de mamífero cebadas se ponen en contacto con vector lentiviral.

60 Un poloxámero (n.º de CAS 9003-11-6) es un copolímero tribloque no iónico de óxido de etileno y óxido de propileno. Un poloxámero se compone de una cadena hidrófoba central de polioxipropileno flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (es decir, un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno o un copolímero de óxido de polietileno-óxido de polipropileno).

65 Un poloxámero puede tener la fórmula (1):



en donde x e y son independientemente números enteros de aproximadamente 10 a 200 o más. Por ejemplo, x puede ser de aproximadamente 60 a aproximadamente 150 e y puede ser de aproximadamente 25 a aproximadamente 60.

Los poloxámeros adecuados incluyen un poloxámero de fórmula 1, teniendo x un valor de aproximadamente 101 y teniendo y un valor de aproximadamente 56 (P 407); un poloxámero de fórmula 1 teniendo x un valor de aproximadamente 141 y teniendo y un valor de aproximadamente 44 (P 338); un poloxámero de fórmula 1 teniendo x un valor de aproximadamente 64 y teniendo y un valor de aproximadamente 37 (P 237); un poloxámero de fórmula 1 teniendo x un valor de aproximadamente 80 y teniendo y un valor de aproximadamente 27 (P 188); y un poloxámero de fórmula 1 teniendo x un valor de aproximadamente 12 y teniendo y un valor de aproximadamente 20 (P 124). Un poloxámero puede comprender especies poliméricas heterogéneas de longitudes de cadena variables y los valores x e y anteriores pueden ser los valores promedio de todas las especies que están presentes.

La nomenclatura de los poloxámeros se refiere al peso molecular aproximado y al porcentaje de contenido de polioxietileno. Estos valores se refieren a un valor promedio en un poloxámero, en lugar de un valor absoluto de cada molécula de poloxámero individual. Los dos primeros dígitos de un número de poloxámero, multiplicado por 100, da el peso molecular aproximado del bloque de polioxipropileno hidrófobo. El último dígito, multiplicado por 10, da el porcentaje en peso aproximado del contenido de polioxietileno hidrófilo. Por ejemplo, el poloxámero 407 describe un polímero que contiene un polioxipropileno hidrófobo de aproximadamente 4000 Da, siendo el contenido de polioxietileno hidrófilo aproximadamente el 70 % del peso molecular total.

Los poloxámeros se sintetizan generalmente en dos etapas, primero construyendo el núcleo de polioxipropileno y después añadiendo polioxietileno a los extremos terminales del núcleo de polioxipropileno. Debido a la variación en las tasas de polimerización durante ambas etapas, un poloxámero puede contener especies poliméricas heterogéneas de longitudes de cadena total y pesos moleculares variables. La distribución de especies poliméricas se puede caracterizar usando técnicas convencionales que incluyen, pero sin limitación, cromatografía de permeación en gel (CPG).

Como consecuencia de la incapacidad técnica para producir poloxámeros en los que todas las especies moleculares tienen una composición idéntica, los pesos moleculares y otras características de un poloxámero pueden describirse en términos del promedio de especies moleculares del poloxámero. El peso molecular promedio como se describe en el presente documento puede ser el peso molecular promedio en número o el peso molecular promedio en peso. Los métodos adecuados para determinar el peso molecular promedio en número y el peso molecular promedio en peso son bien conocidos en la técnica.

Un poloxámero adecuado puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 6 a aproximadamente 18 KDa. Por ejemplo, de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 15 kDa, por ejemplo de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 12,6 kDa o de aproximadamente 12,6 kDa a aproximadamente 15 kDa. Se pueden generar diferentes poloxámeros que tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 15 kDa cambiando la longitud de los bloques de polímero que constituyen un poloxámero. En algunas realizaciones preferidas, el poloxámero puede ser poloxámero 407 que tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 9840-14600 kDa, por ejemplo de 12600 a 13600 kDa.

Los poloxámeros adecuados se encuentran fácilmente disponibles en la técnica o pueden sintetizarse usando técnicas convencionales. Los poloxámeros pueden ser conocidos por sus nombres comerciales de "PluronicTM", "SynperonicTM", FlocorTM, Lutrol[®] o KolliphorTM. Por ejemplo, el poloxámero 124 puede tener los nombres comerciales Kollisolv P124 o Lutrol L 44, el poloxámero 188 puede tener los nombres comerciales Kolliphor P188 o Lutrol F 68; el poloxámero 237 puede tener los nombres comerciales Kolliphor P237 o Lutrol F87; el poloxámero 338 puede tener los nombres comerciales Kolliphor P338 o Lutrol F108 (también disponible como LentiboostTM); el poloxámero 407 puede tener los nombres comerciales Kolliphor P407 o Lutrol F127. Otros poloxámeros adecuados pueden tener los nombres comerciales Synperonic[®] L122; Synperonic[®] P85; Pluronic[®] F68 y Pluronic[®] F127 y puede obtenerse de proveedores comerciales (por ejemplo, BASF o Sigma-Aldrich).

Normalmente, el poloxámero se puede disolver en agua para preparar una solución madre a 100 mg/ml y después esterilizarse usando un filtro de 0,2 µm antes de almacenarse a 4 °C antes de añadirse al medio de cebado.

La población de células de mamífero puede exponerse al poloxámero cultivando las células de mamífero en un medio de cebado que comprende el poloxámero. El medio de cebado puede comprender, por ejemplo, de 10 µg/ml a 100 mg/ml del poloxámero. Por ejemplo, de 0,1 mg/ml a 10 mg/ml o de 0,2 mg/ml a 5 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 1 mg/ml.

El medio de cebado no comprende vector lentiviral, es decir, la población de células de mamífero se ceba en ausencia de lentivirus.

Cualquier medio de cultivo celular que soporta el cultivo de células T o progenitoras de las mismas, tal como iPSC, MC, HEC, HPC o células proT, puede complementarse con poloxámero para su uso como medio de cebado. Se encuentran disponibles numerosos medios de cultivo adecuados para su uso, en particular medios completos, tal como AIM-V, medio Iscoves y RPMI-1640 (Invitrogen-GIBCO). El medio puede complementarse con otros factores tal como suero, proteínas séricas y agentes selectivos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede emplearse medio RPMI-1640 que contiene glutamina 2 mM, FBS al 10 %, HEPES 25 mM, pH 7,2, penicilina-estreptomicina al 1 % y β -mercaptoetanol 55 μ M y opcionalmente complementado con 20 ng/ml de IL-2. Otro medio adecuado puede comprender medio IMDM (Gibco) complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS), penicilina y estreptomicina al 1 %, L-glutamina al 1 % e IL-2. El medio de cultivo puede complementarse con los factores agonistas o antagonistas descritos anteriormente en concentraciones convencionales que el experto en la materia puede determinar fácilmente mediante experimentación rutinaria.

De manera conveniente, las células se cultivan a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene un 5 % de CO₂ en un medio de cultivo adecuado.

Métodos y técnicas para el cultivo de células T y otras células de mamífero son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Basic Cell Culture Protocols, C. Helgason, Humana Press Inc. U.S. (15 de octubre de 2004) ISBN: 1588295451; Human Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Medicine S.) Humana Press Inc., EE. UU. (9 de diciembre de 2004) ISBN: 1588292223; Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, R. Freshney, John Wiley & Sons Inc (2 de agosto de 2005) ISBN: 0471453293, Ho WY et al J Immunol Methods. (2006) 310:40-52).

Las células de mamífero pueden cultivarse en el medio de cebado que comprende el poloxámero durante 6 horas o más, 12 horas o más antes de la exposición al vector lentiviral, por ejemplo, 24 horas o más, 36 horas o más o 48 horas o más. Las condiciones de cultivo adecuadas para células T son bien conocidas en la técnica.

Después de la exposición al poloxámero, las células de mamífero cebadas por transducción pueden transducirse mediante exposición a un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G. La población de células de mamífero cebadas por transducción puede exponerse al vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G cultivando las células de mamífero en un medio de transducción que comprende el vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G.

En algunas realizaciones preferidas, el poloxámero puede estar presente en el medio de transducción. Por ejemplo, el medio de cebado puede complementarse con un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G para producir el medio de transducción. En otras realizaciones, el poloxámero puede estar ausente del medio de transducción.

Los lentivirus son un subtipo de retrovirus que son capaces de infectar tanto tipos de células que no se dividen como que se dividen activamente, e incluyen VIH-1, VIH-2, SIV y pSIVgml.

Un vector lentiviral es una partícula lentiviral infecciosa que contiene ácido nucleico heterólogo para ser expresado en una célula diana. Por ejemplo, un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G como se describe en el presente documento puede comprender un ácido nucleico heterólogo que codifica un receptor de antígeno, por ejemplo, un receptor de antígeno que se une específicamente a células cancerosas. La transducción de células T o progenitoras de las mismas con el vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G puede ser útil para generar células T que expresan el receptor de antígeno para su uso en terapia.

Por motivos de seguridad, los vectores lentivirales generalmente no contienen los genes requeridos para la replicación. Los vectores lentivirales adecuados pueden generarse convenientemente de acuerdo con técnicas convencionales transfectando una línea celular de empaquetamiento, tal como HEK293, con un plásmido de vector de transferencia y dos o más plásmidos auxiliares. El plásmido de transferencia contiene el ácido nucleico heterólogo que codifica el receptor de antígeno, flanqueado por secuencias repetidas terminales largas (LTR), que facilitan la integración de las secuencias de plásmido de transferencia en la célula hospedadora. Los dos o más plásmidos auxiliares pueden incluir un plásmido de empaquetamiento que codifica proteínas de virión, tal como GAG, POL, TAT y REV; y un plásmido de envoltura, que codifica una proteína de envoltura ENV, tal como VSV-G; En algunas realizaciones, se pueden emplear dos plásmidos de empaquetamiento, un primero que codifica GAG y POL y un segundo que codifica REV. Después de la transfección con el plásmido de transferencia y los plásmidos auxiliares, la línea celular de empaquetamiento genera partículas lentivirales infecciosas que comprenden el ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno. En algunas realizaciones, se puede producir un vector viral pseudotipificado con VSVb en combinación con la glicoproteína G de la envoltura vírica del virus de la estomatitis vesicular (VSVg) para producir una partícula de virus pseudotipificada. Por ejemplo, la transducción en fase sólida se puede realizar sin selección mediante cultivo en placas de cultivo tisular recubiertas con retronectina, precargadas con vector retroviral.

Las partículas lentivirales pueden recogerse del sobrenadante celular y almacenarse y/o concentrarse listas para su uso en la transfección de células T como se describe en el presente documento. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación y transformación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, la introducción de ADN en las células y la expresión génica se describen en detalle en Protocols in Molecular Biology, Segunda edición, Ausubel et al. eds. John Wiley & Sons, 1992. Los reactivos para generar vectores lentivirales se encuentran disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, Dharmacon). Técnicas

adecuadas para preparar vectores lentivirales son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Dull, T., et al (1998). *J. Virol.* 72, 8463-8471; Merten et al (2016) *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016; 3: 16017).

5 En algunas realizaciones, el receptor de antígeno codificado por el ácido nucleico heterólogo en el vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G puede ser un receptor de células T (TCR).

Los TCR son proteínas heterodiméricas ancladas a membrana unidas por disulfuro, que comprenden normalmente cadenas alfa (α) y beta (β) altamente variables expresadas como un complejo con moléculas de cadena CD3 invariables. Las células T que expresan estos tipos de TCR se denominan células T $\alpha\beta$ (o $\alpha\beta$). Una minoría de células T expresa un TCR alternativo que comprende cadenas gamma (γ) y delta (δ) variables y se denominan células T $\gamma\delta$. Los TCR se unen específicamente a los complejos principales de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie de células que presentan un fragmento peptídico de un antígeno diana. Por ejemplo, Los TCR pueden unirse específicamente a un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie de células cancerosas que presentan un fragmento peptídico de un antígeno tumoral. Un MHC es un conjunto de proteínas de superficie celular que permiten que el sistema inmunitario adquirido reconozca moléculas "extrañas". Las proteínas se degradan intracelularmente y se presentan sobre la superficie de células por el MHC. Los MHC que presentan péptidos "extraños", tal como péptidos virales o asociados al cáncer, son reconocidos por células T con los TCR apropiados, provocando rutas de destrucción celular. Los MHC sobre la superficie de células cancerosas pueden presentar fragmentos peptídicos de antígeno tumoral, es decir, un antígeno que está presente en una célula cancerosa pero no en la célula no cancerosa correspondiente. Las células T que reconocen estos fragmentos peptídicos pueden ejercer un efecto citotóxico sobre la célula cancerosa.

Preferiblemente, el TCR no se expresa naturalmente por las células T (es decir, el TCR es exógeno o heterólogo).

25 Los TCR heterólogos pueden incluir heterodímeros de $\alpha\beta$ TCR y heterodímeros de $\gamma\delta$ TCR. El TCR heterólogo adecuado puede unirse específicamente a moléculas de MHC de clase I o II que presentan fragmentos peptídicos de un antígeno diana. Por ejemplo, las células T pueden modificarse para expresar un TCR heterólogo que se une específicamente a moléculas de MHC de clase I o II que presentan fragmentos peptídicos de un antígeno tumoral expresado por las células cancerosas en un paciente con cáncer. Los antígenos tumorales expresados por células cancerosas en el paciente con cáncer pueden identificarse usando técnicas convencionales. Los antígenos tumorales preferidos incluyen NY-ESO1, PRAME, alfa-fetoproteína (AFP), MAGE A4, MAGE A1, MAGE A10 y MAGE B2, lo más preferiblemente NY-ESO-1, MAGE-A4 y MAGE-A10.

35 Los TCR heterólogos también pueden incluir TCR no convencionales, por ejemplo, los TCR no dependientes de MHC que se unen reconocen antígenos no peptídicos presentados por moléculas presentadoras de antígeno monomórficas, tal como CD1 y MR1; TCR de células NKT y TCR de linfocitos intraepiteliales (IEL).

Un TCR heterólogo puede ser un TCR sintético o artificial, es decir, un TCR que no existe en la naturaleza. Por ejemplo, un TCR heterólogo puede ser genomanipulado para aumentar su afinidad o avidéz por un antígeno tumoral (es decir, un TCR de afinidad mejorada). El TCR de afinidad mejorada puede comprender una o más mutaciones relacionadas con un TCR natural, por ejemplo, una o más mutaciones en las regiones determinantes de complementariedad hipervariables (CDR) de las regiones variables de las cadenas α y β o cadenas γ y δ de TCR. Estas mutaciones aumentan la afinidad del TCR por los MHC que presentan un fragmento peptídico de un antígeno tumoral expresado por células cancerosas. Los métodos adecuados para generar TCR de afinidad mejorada incluyen bibliotecas de selección de mutantes de TCR usando presentación en fagos o levaduras y son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Robbins et al. *J Immunol* (2008) 180(9):6116; San Miguel et al (2015) *Cancer Cell* 28 (3) 281-283; Schmitt et al (2013) *Blood* 122 348-256; Jiang et al (2015) *Cancer Discovery* 5 901). Los TCR de afinidad mejorada preferidos pueden unirse a células cancerosas que expresan uno o más de los antígenos tumorales NY-ESO1, PRAME, alfa-fetoproteína (AFP), MAGE A4, MAGE A1, MAGE A10 y MAGE B2.

50 El ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno puede codificar todas las subunidades del receptor. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un TCR puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena α de TCR y una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena β de TCR o una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena γ de TCR y una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena δ de TCR. Las secuencias de nucleótidos adecuadas con bien conocidas en la técnica.

Los TCR de afinidad mejorada preferidos pueden unirse a células cancerosas que expresan uno o más de los antígenos tumorales NY-ESO1, PRAME, alfa-fetoproteína (AFP), MAGE A4, MAGE A1, MAGE A10 y MAGE B2.

60 Como alternativa, el receptor de antígeno codificado por el ácido nucleico heterólogo en el vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G puede ser un receptor de antígeno quimérico (CAR). Los CAR son receptores artificiales que están genomanipulados para contener un dominio de unión a antígeno de inmunoglobulina, tal como un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). Un CAR puede, por ejemplo, comprender un scFv fusionado a una región transmembrana de CD3 de TCR y un endodominio. Un scFv es una proteína de fusión de las regiones variables de la cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) de inmunoglobulinas, que puede estar conectado con un péptido conector corto de aproximadamente 10 a 25 aminoácidos (Houston J.S. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(16):5879-5883). El

conector puede ser rico en glicina para la flexibilidad, y rico en serina o treonina para la solubilidad, y puede conectar el extremo N terminal de la V_H con el extremo C terminal de la V_L, o viceversa. El scFv puede ir precedido por un péptido señal para dirigir la proteína al retículo endoplasmático, y posteriormente la superficie de células T. En el CAR, el scFv puede fusionarse a un dominio transmembrana y endodominio de TCR. Puede incluirse un espaciador flexible entre el scFv y el dominio transmembrana de TCR para permitir una orientación variable y unión a antígeno. El endodominio es el dominio de transmisión de señales funcionales del receptor. Un endodominio de un CAR puede comprender, por ejemplo, dominios de señalización intracelular de la cadena ζ de CD3, o de receptores tal como CD28, 41 BB o ICOS. Un CAR puede comprender múltiples dominios de señalización, por ejemplo, pero sin limitación, CD3z-CD28-41 BB o CD3z-CD28-OX40.

El CAR puede unirse específicamente a un antígeno específico de tumor expresado por células cancerosas. Por ejemplo, las células T pueden modificarse para expresar un CAR que se une específicamente a un antígeno tumoral que se expresa por las células cancerosas en un paciente con cáncer específico. Los antígenos tumorales expresados por células cancerosas en el paciente con cáncer pueden identificarse usando técnicas convencionales.

Como alternativa, el receptor de antígeno codificado por el ácido nucleico heterólogo en el vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G puede ser un receptor de células NK (NKCR).

La expresión de un receptor de antígeno heterólogo, tal como un TCR, NKCR o CAR heterólogo puede alterar la especificidad inmunogénica de las células T producidas como se describe en el presente documento de modo que reconozcan o presenten un reconocimiento mejorado para uno o más antígenos diana, por ejemplo antígenos tumorales que están presentes sobre la superficie de las células cancerosas de un individuo con cáncer. En algunas realizaciones, las células T producidas como se describe en el presente documento pueden presentar una unión reducida o ninguna unión a células cancerosas en ausencia del receptor de antígeno heterólogo. Por ejemplo, la expresión del TCR heterólogo puede aumentar la afinidad y/o especificidad de la unión de células cancerosas de una célula T en relación con células T que no expresan el receptor de antígeno.

El término "heterólogo" se refiere a un polipéptido o ácido nucleico que es extraño a un sistema biológico particular, tal como una célula huésped o virus, y no está presente de forma natural en ese sistema. Un polipéptido o ácido nucleico heterólogo puede introducirse en un sistema biológico por medios artificiales, por ejemplo usando técnicas recombinantes. Por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido puede insertarse en una construcción de expresión adecuada que, a su vez, se usa para transformar una célula hospedadora para producir el polipéptido. Un polipéptido o ácido nucleico heterólogo puede ser sintético o artificial o puede existir en un sistema biológico diferente, tal como una especie o tipo de célula diferente. Un polipéptido o ácido nucleico endógeno es nativo de un sistema biológico particular, tal como una célula huésped, y está presente de forma natural en ese sistema. Un polipéptido recombinante se expresa a partir de un ácido nucleico heterólogo que se ha introducido en una célula por medios artificiales, por ejemplo usando técnicas recombinantes. Un polipéptido recombinante puede ser idéntico a un polipéptido que está presente de forma natural en la célula o puede ser diferente de los polipéptidos que están presentes de forma natural en esa célula.

Las células T o progenitoras de las mismas se transducen para expresar un receptor de antígeno heterólogo que se une específicamente a las células diana de un paciente, por ejemplo células cancerosas de un paciente con cáncer, usando un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G como se describe en el presente documento. El paciente con cáncer puede tratarse posteriormente con las células T. Los pacientes con cáncer adecuados para el tratamiento con las células T pueden identificarse mediante un método que comprende;

obtener una muestra de células cancerosas de un individuo con cáncer e;
identificar las células cancerosas como que se unen al receptor de antígeno expresado por las células T.

Las células cancerosas pueden identificarse como que se unen al receptor de antígeno identificando uno o más antígenos tumorales expresados por las células cancerosas. Los métodos para identificar antígenos sobre la superficie de células cancerosas obtenidas de un individuo con cáncer son bien conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, un receptor de antígeno heterólogo adecuado para el tratamiento de un paciente con cáncer específico puede identificarse al;

obtener una muestra de células cancerosas de un individuo con cáncer e;
identificar un receptor de antígeno que se une específicamente a las células cancerosas.

Un receptor de antígeno que se une específicamente a las células cancerosas puede identificarse, por ejemplo, identificando uno o más antígenos tumorales expresados por las células cancerosas. Los métodos para identificar antígenos sobre la superficie de células cancerosas obtenidas de un individuo con cáncer son bien conocidos en la técnica. Un receptor de antígeno que se une al uno o más antígenos tumorales o que se une a fragmentos peptídicos presentados por MHC del uno o más antígenos, puede identificarse después, por ejemplo, a partir de receptores de antígeno de especificidades conocidas o seleccionando un panel o biblioteca de receptores de antígeno con diversas especificidades. Los receptores de antígeno que se unen específicamente a células cancerosas que tienen uno o más

antígenos tumorales definidos pueden producirse usando técnicas de rutina.

Las células T o progenitoras de las mismas pueden transducirse con un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G que codifica el receptor de antígeno identificado como se describe en el presente documento.

5 Las células cancerosas de un individuo adecuado para el tratamiento como se describe en el presente documento pueden expresar el antígeno y pueden ser del tipo de HLA correcto para unirse al receptor de antígeno.

10 Las células cancerosas pueden distinguirse de las células somáticas normales en un individuo por la expresión de uno o más antígenos (es decir, antígenos tumorales). Las células somáticas normales en un individuo pueden no expresar el uno o más antígenos o pueden expresarlos de una manera diferente, por ejemplo, en niveles inferiores, en un tejido diferente y/o en una fase de desarrollo diferente. Los antígenos tumorales pueden provocar respuestas inmunitarias en el individuo. En particular, un antígeno tumoral puede provocar una respuesta inmunitaria mediada por células T contra células cancerosas en el individuo que expresa el antígeno tumoral. Uno o más antígenos tumorales expresados por células cancerosas en un paciente pueden seleccionarse como un antígeno diana para receptores heterólogos en células T modificadas.

15 Los antígenos tumorales expresados por células cancerosas pueden incluir, por ejemplo, antígenos testiculares de cáncer (CT) codificados por genes de la línea germinal de cáncer, tal como MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, GAGE-I, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, BAGE-I, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1/CT7, MAGE-C2, NY-ESO-I, LAGE-I, SSX-I, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-I y XAGE y fragmentos inmunogénicos de los mismos (Simpson et al. Nature Rev (2005) 5, 615-625, Gure et al., Clin Cancer Res (2005) 11, 8055-8062; Velazquez et al., Cancer Immun (2007) 7, 1 1 ; Andrade et al., Cancer Immun (2008) 8, 2; Tinguely et al., Cancer Science (2008); Napoletano et al., Am J of Obstet Gyn (2008) 198, 99 e91-97).

20 Otros antígenos tumorales incluyen, por ejemplo, proteínas sobreexpresadas, reguladas por incremento o mutadas y antígenos de diferenciación, particularmente antígenos de diferenciación de melanocitos tal como p53, ras, CEA, MUC1, PMSA, PSA, tirosinasa, Melan-A, MART-1, gp100, gp75, alfa-actinina-4, proteína de fusión Bcr-Abl, Casp-8, beta-catenina, cdc27, cdk4, cdkn2a, coa-1, proteína de fusión dek-can, EF2, proteína de fusión de ETV6-AML1, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-2 y 3, neo-PAP, miosina de clase I, OS-9, proteína de fusión pml-RAR. alfa, PTPRK, K-ras, N-ras, triosafosfato isomerasa, GnTV, Herv-K-mel, NA-88, SP17 y TRP2-Int2, (MART-I), E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del virus del papiloma humano (HPV) E6 y E7, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, alfa-fetoproteína, 13HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\170K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS y proteínas relacionadas con tirosinasa tal como TRP-1, TRP-2.

30 Otros antígenos tumorales incluyen complejos de péptido-MHC fuera de marco generados por los mecanismos de iniciación de la traducción no AUG empleados por células cancerosas "estresadas" (Malarkannan et al. Immunity junio de 1999; 10(6):681-90).

35 Otros antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO00/20581; Cancer Vaccines and Immunotherapy (2000) Eds Stern, Beverley y Carroll, Cambridge University Press, Cambridge) Las secuencias de estos antígenos tumorales se encuentran fácilmente disponibles en bases de datos públicas, pero también se encuentran en los documentos WO 1992/020356 A1, WO 1994/005304 A1, WO 1994/023031 A1, WO 1995/020974 A1, WO 1995/023874 A1 y WO 1996/026214 A1.

40 Los antígenos tumorales preferidos incluyen NY-ESO1, PRAME, alfa-fetoproteína (AFP), MAGE A4, MAGE A1, MAGE A10 y MAGE B2, lo más preferiblemente NY-ESO-1 y MAGE-A10.

55 NY-ESO-1 es un antígeno tumoral humano de la familia testicular de cáncer (CT) y se expresa con frecuencia en una amplia variedad de cánceres, incluyendo melanoma, carcinoma de próstata, de vejiga de células transicionales, de mama, de pulmón, de tiroides, gástrico, de cabeza y cuello y cervical (van Rhee F. et al. Blood 2005; 105(10): 3939-3944). Además, la expresión de NY-ESO-1 generalmente se limita a células germinales y no se expresa en células somáticas (Scanlan M.J. et al. Cancer Immun. 2004; 4(1)). Los TCR de afinidad mejorada adecuados que se unen a células cancerosas que expresan NY-ESO-1 incluyen NY-ESO-1^{c259}.

60 NY-ESO-1 c²⁵⁹ es un TCR de afinidad mejorada que está mutado en las posiciones 95 y 96 de la cadena alfa 95:96LY con respecto al TCR de tipo salvaje. NY-ESO-1 c²⁵⁹ se une a un péptido que corresponde a los residuos de aminoácido 157-165 del Ag NY-ESO-1 testicular de cáncer humano (SLLMWITQC) en el contexto del alelo HLA-A2+ de clase 1 con afinidad aumentada en relación con el TCR de tipo salvaje no modificado (Robbins et al. J Immunol (2008) 180(9):6116).

MAGE-A10 es un miembro altamente inmunogénico de la familia MAGE-A de antígenos CT, y se expresa en células germinales pero no en tejido sano. MAGE-A10 se expresa en altos porcentajes de células cancerosas de varios tumores (Schultz-Thater E. et al. Int J Cancer. 2011; 129(5):1137-1148).

5 La población de células de mamífero puede exponerse al vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G cultivando las células de mamífero en un medio de transducción que comprende el vector lentiviral. Métodos adecuados de transducción lentiviral son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G empaquetado se puede introducir en las células de mamífero y las células de mamífero se incuban durante 3 días o más.

Las células de mamífero pueden cultivarse a cualquier densidad celular conveniente, normalmente entre $0,5 \times 10^6$ y 1×10^6 células/ml.

15 La multiplicidad de infección (MOI) de la transducción puede ser de 0,1 a 1000 vectores lentivirales por célula, preferiblemente de 1 a 100.

Preferiblemente, las células transducidas se lavan después de 2-4 días, por ejemplo 3 días, de exposición al vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G y al poloxámero (es decir, en los días 3-5, preferiblemente en el día 4). Las técnicas de lavado adecuadas son bien conocidas en la técnica.

20 Después de la transducción y el lavado opcional, la población de células de mamífero transducidas puede aislarse y/o purificarse, por ejemplo, usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo. Puede determinarse la expresión del receptor de antígeno heterólogo por las células de mamífero.

30 Las células de mamífero transducidas pueden cultivarse *in vitro* de modo que las células proliferen y expandan la población. Por ejemplo, una población de células T transducidas puede expandirse usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28. Las células de mamífero transducidas pueden cultivarse usando cualquier técnica conveniente para producir la población expandida. Los sistemas de cultivo adecuados incluyen fermentadores de tanque agitado, fermentadores de puente aéreo, matraces rotatorios, bolsas o placas de cultivo, y otros biorreactores, en particular biorreactores de fibra hueca. El uso de dichos sistemas es bien conocido en la técnica.

35 Opcionalmente, la población de células de mamífero transducidas como se describe en el presente documento puede almacenarse, por ejemplo por criopreservación, antes de su uso.

En algunas realizaciones preferidas, las células de mamífero para la transducción como se describe en el presente documento son células T.

40 Las células T (también denominadas linfocitos T) son glóbulos blancos que desempeñan un papel fundamental en la inmunidad celular. Las células T pueden distinguirse de otros linfocitos en la presencia de un receptor de células T (TCR) sobre la superficie celular. Hay varios tipos de células T, teniendo cada tipo una función distinta. Las células T auxiliares (células T_H) se conocen como células T CD4⁺ porque expresan la glicoproteína de superficie CD4. Las células T CD4⁺ desempeñan un papel importante en el sistema inmunitario adaptativo y ayudan a la actividad de otras células inmunitarias liberando citocinas de células T y ayudando a suprimir o regular las respuestas inmunitarias. Son esenciales para la activación y el crecimiento de células T citotóxicas. Las células T citotóxicas (células T_c, CTL, células T citocidas) se conocen como células T CD8⁺ porque expresan la glicoproteína de superficie CD8. Las células T CD8⁺ actúan para destruir células infectadas por virus y células tumorales. La mayoría de las células T CD8⁺ expresan TCR que pueden reconocer un antígeno específico presentado sobre la superficie de células infectadas o dañadas por una molécula de MHC de clase I. La unión específica del TCR y la glicoproteína CD8 al antígeno y la molécula de MHC conduce a la destrucción mediada por células T de las células infectadas o dañadas.

50 Las células T para la transducción como se describe en el presente documento pueden ser células T CD4⁺ positivas sencillas; células T CD8⁺ positivas sencillas; y/o células T CD4⁺ CD8⁺ doblemente positivas. Por ejemplo, las células T pueden ser una población mixta de células T CD4⁺ y células T CD8⁺.

60 Las células T para la transducción como se describe en el presente documento pueden ser células T CD3⁺ maduras. Por ejemplo, las células pueden tener un fenotipo TCR⁺ CD3⁺. En algunas realizaciones, las células T también pueden expresar CD45 y CD28.

65 En algunas realizaciones, Las células T para la transducción como se describe en el presente documento pueden obtenerse de un individuo donante. Un método descrito en el presente documento puede comprender la etapa de obtener células T de un individuo donante y/o aislar células T de una muestra obtenida de un individuo donante. En otras realizaciones, se pueden emplear células T obtenidas previamente de un individuo donante o aisladas previamente de una muestra obtenida de un individuo donante. El individuo donante puede ser un individuo sano o un individuo con cáncer.

El individuo donante puede ser la misma persona que el individuo receptor al que se administrarán las células T después de la modificación y expansión como se describe en el presente documento (tratamiento autólogo). Como alternativa, el individuo donante puede ser una persona diferente del individuo receptor al que se administrarán las células T después de la modificación y expansión como se describe en el presente documento (tratamiento alogénico). Por ejemplo, el individuo donante puede ser un individuo sano que es compatible en cuanto al antígeno leucocitario humano (HLA) (ya sea antes o después de la donación) con un individuo receptor que padece cáncer.

Una población de células T puede aislarse de una muestra de sangre obtenida del individuo donante. Los métodos adecuados para el aislamiento de células T y otras células de sangre periférica son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS: véase, por ejemplo, Rheinherz et al. (1979) PNAS 76 4061), cribado celular (véase, por ejemplo, Lum et al (1982) Cell Immunol 72 122) y aislamiento usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos (véase, por ejemplo, Gaudernack et al 1986 J Immunol Methods 90 179).

Las células T CD4⁺ y CD8⁺ pueden aislarse de la población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenida a partir de una muestra de sangre. Las PBMC pueden extraerse de una muestra de sangre usando técnicas convencionales. Por ejemplo, puede usarse Ficoll en combinación con centrifugación en gradiente (Böyum A. Scand J Clin Lab Invest. 1968; 21 (Suplemento 97):77-89), para separar la sangre completa en una capa superior de plasma, seguido de una capa de PBMC y una fracción inferior de células polimorfonucleares y eritrocitos. En algunas realizaciones, las PBMC pueden empobrecerse de células CD14⁺ (monocitos).

Tras el aislamiento, las células T pueden activarse. Los métodos adecuados para activar células T son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células T aisladas pueden exponerse a un agonista de receptor de células T (TCR). Los métodos adecuados para activar y expandir células T son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células T pueden exponerse a un agonista de receptor de células T (TCR) en condiciones de cultivo apropiadas. Los agonistas de TCR adecuados incluyen ligandos, tal como péptidos presentados en una molécula de MHC de clase I o II (complejos de MHC-péptido) sobre la superficie de una perla o una célula presentadora de antígeno, tal como una célula dendrítica, y factores solubles, tal como anticuerpos anti-TCR, por ejemplo, anticuerpos de anti-CD28, y complejos multiméricos de MHC-péptido, tal como tetrameros, pentámeros o dextrámeros de MHC-péptido.

La activación se refiere al estado de una célula T que se ha estimulado suficientemente para inducir una proliferación celular detectable. La activación también puede asociarse con la producción de citocinas inducida y funciones efectoras detectables. La expresión "células T activadas" se refiere a, entre otras cosas, células T que están experimentando división celular.

Un anticuerpo anti-TCR puede unirse específicamente a un componente del TCR, tal como ϵ CD3, α CD3 o α CD28. Los anticuerpos anti-TCR adecuados para la estimulación de TCR son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, OKT3) y se encuentran disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, eBioscience CO USA). En algunas realizaciones, las células T pueden activarse mediante exposición a anticuerpos anti- α CD3 e IL2, IL7 o IL15. Más preferiblemente, las células T se activan mediante exposición a anticuerpos anti- α CD3 y anticuerpos anti- α CD28. La activación puede ocurrir en presencia o ausencia de monocitos CD14⁺. Las células T pueden activarse con perlas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Por ejemplo, PBMC o subconjuntos de células T que incluyen células CD4⁺ y/o CD8⁺ pueden activarse, sin células alimentadoras (células presentadoras de antígeno) o antígeno, usando perlas recubiertas con anticuerpos, por ejemplo, perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, tal como activadoras de linfocitos T Humanos CD3/CD28 Dynabeads® (ThermoFisher Scientific). En otras realizaciones, complejos de anticuerpos tetraméricos solubles que se unen a ligandos de la superficie celular CD3, CD28 y CD2, tal como activador de células T CD3/CD28/CD2 humanas o activador de células T CD3/CD28 humanas ImmunoCult™, pueden usarse para activar las células T. En otras realizaciones, las células T pueden activarse con un complejo MHC-péptido, preferiblemente un complejo multimérico MHC-péptido, opcionalmente en combinación con un anticuerpo anti-CD28. Las células T que expresan un receptor de antígeno quimérico pueden activarse usando un antígeno soluble para el receptor. El antígeno puede estar en una forma multimérica o sobre la superficie de una perla y puede usarse opcionalmente junto con un anticuerpo anti-TCR, tal como un anticuerpo anti-CD28.

Después del aislamiento y/o la activación, las células T obtenidas del individuo donante pueden cebarse para la transducción lentiviral usando un poloxámero como se describe en el presente documento.

En otras realizaciones, las células T para la transducción como se describe en el presente documento pueden generarse a partir de una población de iPSC.

Las iPSC son células pluripotentes que se derivan de células no pluripotentes, células donantes o antecedentes completamente diferenciadas. Las iPSC son capaces de autorrenovarse *in vitro* y exhiben un fenotipo no diferenciado y son potencialmente capaces de diferenciarse en cualquier tipo de célula fetal o adulta de cualquiera de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y endodermo). La población de iPSC puede ser clonal, es decir, células genéticamente idénticas que descienden de una única célula progenitora común. Las iPSC pueden expresar uno o más de los siguientes marcadores asociados a pluripotencia: POU5f1 (Oct4), Sox2, Fosfatasa Alcalina, SSEA-3,

Nanog, SSEA-4, Tra-1-60, KLF4 y c-myc, preferiblemente uno o más de POU5f1, NANOG y SOX2. Una iPSC puede carecer de marcadores asociados con destinos diferenciativos específicos, tal como Bra, Sox17, FoxA2, α FP, Sox1, NCAM, GATA6, GATA4, Hand1 y CDX2. En particular, una iPSC puede carecer de marcadores asociados con destinos endodérmicos.

5 Preferiblemente, las iPSC son IPSC humanas (hiPSC).

En algunas realizaciones, las iPSC pueden editarse genéticamente, por ejemplo, para inactivar o eliminar genes HLA u otros genes asociados con inmunogenicidad o EICH.

10 Las iPSC pueden derivarse o reprogramarse a partir de células donantes, que pueden ser células somáticas u otras células antecedentes obtenidas de una fuente, tal como un individuo donante. Las células donantes pueden ser de mamífero, preferiblemente células humanas. Las células donantes adecuadas incluyen fibroblastos adultos y células sanguíneas, por ejemplo células de sangre periférica, tal como HPC o células mononucleares.

15 Las células donantes adecuadas para la reprogramación en iPSC como se describe en el presente documento pueden obtenerse a partir de un individuo donante. En algunas realizaciones, el individuo donante puede ser la misma persona que el individuo receptor al que se administrarán las células T después de la producción como se describe en el presente documento (tratamiento autólogo). En otras realizaciones, el individuo donante puede ser una persona diferente del individuo receptor al que se administrarán las células T después de la producción como se describe en el presente documento (tratamiento alogénico). Por ejemplo, el individuo donante puede ser un individuo sano que es compatible en cuanto al antígeno leucocitario humano (HLA) (ya sea antes o después de la donación) con un individuo receptor que padece cáncer. En otras realizaciones, el individuo donante puede no ser compatible en cuanto a HLA con el individuo receptor. Preferiblemente, el individuo donante puede ser un neonato (recién nacido), por ejemplo, las células de donante pueden obtenerse a partir de una muestra de sangre de cordón umbilical.

Los individuos donantes adecuados están preferiblemente libres de virus transmisibles (por ejemplo, VIH, VPH, CMV) y agentes adventicios (por ejemplo, bacterias, micoplasma), y libres de anomalías genéticas conocidas.

30 En algunas realizaciones, una población de células de sangre periférica, tal como células progenitoras hematopoyéticas (HPC), para la reprogramación pueden aislarse a partir de una muestra de sangre, preferiblemente una muestra de cordón umbilical, obtenida del individuo donante como se ha descrito anteriormente. Las HPC pueden identificarse en una muestra de células sanguíneas mediante la expresión de CD34. En otras realizaciones, una población de fibroblastos para la reprogramación puede aislarse de una biopsia de piel después de la dispersión usando colagenasa o tripsina y el crecimiento en condiciones de cultivo celular apropiadas.

40 En algunas realizaciones, Las IPSC pueden derivarse de células T específicas de antígeno. Por ejemplo, las células T pueden comprender ácido nucleico que codifica TCR $\alpha\beta$ que se unen a un antígeno, tal como un antígeno tumoral, presentado en complejo con un MHC de clase I. Las células T específicas de antígeno para su uso en la generación de iPSC pueden obtenerse seleccionando una población diversa de células T con epítopos peptídicos del antígeno objetivo presentado en una molécula de MHC de clase I o II sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno, tal como una célula dendrítica, o aislándola de una muestra tumoral de un paciente con cáncer.

45 Las células donantes se reprograman normalmente en iPSC mediante la introducción de factores de reprogramación, tal como Oct4, Sox2 y Klf4 en la célula. Los factores de reprogramación pueden ser proteínas o ácidos nucleicos codificantes y pueden introducirse en las células diferenciadas mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo plásmido, transposón o más preferiblemente, transfección viral o suministro directo de proteínas. Otros factores de reprogramación, por ejemplo, genes Klf tal como Klf-1, -2, -4 y -5; genes Myc tal como C-myc, L-myc y N-myc; Nanog; antígeno T grande del SV40; Lin28; y horquillas cortas (ARNhc) dirigidas a genes tal como p53, también se puede introducir en la célula para aumentar la eficiencia de inducción. Después de la introducción de los factores de reprogramación, las células donantes pueden cultivarse. Las células que expresan marcadores de pluripotencia pueden aislarse y/o purificarse para producir una población de iPSC. Las técnicas para la producción de iPSC son bien conocidas en la técnica (Yamanaka et al. Nature 2007; 448:313-7; Yamanaka 6 7 de junio de 2007; 1(1):39-49; Kim et al. Nature. 31 de julio de 2008; 454(7204):646-50; Takahashi Cell. 30 de noviembre de 2007; 131(5):861-72. Park et al. Nature. 10 de enero de 2008; 451(7175):141-6; Kimet et al. Cell Stem Cell. 5 de junio de 2009;4(6):472-6; Vallier, L., et al. Stem Cells, 2009. 9999(999A): p. N/A; Baghbaderani et al. 2016; Stem Cell Rev. agosto de 2016; 12(4):394-420; Baghbaderani et al. (2015) Stem Cell Reports, 5(4), 647-659).

60 Pueden emplearse técnicas convencionales para el cultivo y mantenimiento de iPSC (Vallier, L. et al. Dev. Biol. 275, 403-421 (2004), Cowan, C.A. et al. N. Engl. J. Med. 350, 1353-1356 (2004), Joannides, A. et al. Stem Cells 24, 230-235 (2006) Klimanskaya, I. et al. Lancet 365, 1636-1641 (2005), Ludwig, T.E. et al. Nat. Biotechnol. 24, 185-187 (2006)). Las IPSC para su uso en los presentes métodos pueden cultivarse en condiciones definidas o en células alimentadoras. Por ejemplo, las iPSC pueden cultivarse convencionalmente en una placa de cultivo en una capa de células alimentadoras, tal como fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (MEF), a una densidad apropiada (por ejemplo, 10^5 a 10^6 células/placa de 60 mm), o en un sustrato apropiado, en un medio de mantenimiento de iPSC acondicionado o definido por el alimentador. Las iPSC para su uso en los presentes métodos pueden pasarse por

medios enzimáticos o mecánicos. En algunas realizaciones, las iPSC pueden pasarse en Matrigel™ o una proteína de la MEC, tal como vitronectina, en un medio de mantenimiento de iPSC, tal como medio de cultivo mTeSR1 (StemCell Technologies) o E8 flex (Life Thermo).

5 Las células T pueden producirse a partir de una población de iPSC mediante un método que comprende;

- (i) diferenciar la población de iPSC en células mesodérmicas (MC),
- (ii) diferenciar las MC para producir una población de células endoteliales homogénicas (HEC),
- (iii) diferenciar las HEC en una población de células progenitoras hematopoyéticas (HPC),
- 10 (iv) diferenciar la población de HPC en células T progenitoras (proT);
- (v) madurar las células T progenitoras para producir una población de células T CD4+ CD8+ doblemente positivas, y
- (vi) expandir y/o activar las células T CD4+ CD8+ doblemente positivas para producir una población de células T CD4+ o CD8+ positivas individuales.

15 Las células de mamífero pueden transducirse con un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G usando un método descrito en el presente documento en una cualquiera de las fases (i) a (vi). Por ejemplo, una cualquiera de las (a) iPSC, (b) MC (c) HEC (d) HPC, (e) células T progenitoras, (f) células T positivas dobles o (g) células T positivas individuales pueden transfectarse o transducirse con un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G como se describe en el presente documento.

20 La diferenciación y maduración de las poblaciones celulares en las etapas de los métodos descritos en el presente documento se induce cultivando las células en un medio de cultivo complementado con un conjunto de factores de diferenciación. El conjunto de factores de diferenciación que se enumera para cada medio de cultivo es preferiblemente exhaustivo y el medio puede estar desprovisto de otros factores de diferenciación. En realizaciones preferidas, los medios de cultivo son medios químicamente definidos. Por ejemplo, un medio de cultivo puede consistir en un medio nutriente químicamente definido que se complementa con una cantidad efectiva de uno o más factores de diferenciación, tal como se describe a continuación. Un medio nutriente químicamente definido puede comprender un medio basal que se complementa con uno o más complementos de medio de cultivo sin suero.

25 Los factores de diferenciación son factores que modulan, por ejemplo, promueven o inhiben, una ruta de señalización que media la diferenciación en una célula de mamífero. Los factores de diferenciación pueden incluir factores de crecimiento, citocinas y moléculas pequeñas que modulan una o más de las rutas de señalización de la Activina/Nodal, FGF, Wnt o BMP. Los ejemplos de factores de diferenciación incluyen Activina/Nodal, FGF, BMP, ácido retinoico, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor citoblástico (SCF), ligandos de TGFβ, GDF, LIF, Interleucinas, inhibidores de GSK-3 e inhibidores de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K).

30 Los factores de diferenciación que se usan en uno o más de los medios descritos en el presente documento incluyen ligandos de TGFβ, tal como activina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), proteína morfogenética ósea (BMP), factor citoblástico (SCF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhibidores de GSK-3 (tal como CHIR-99021), interleucinas y hormonas, tal como IGF-1 y angiotensina II. Un factor de diferenciación puede estar presente en un medio descrito en el presente documento en una cantidad que es efectiva para modular una ruta de señalización en células cultivadas en el medio.

35 En algunas realizaciones, un factor de diferenciación enumerado anteriormente o a continuación puede reemplazarse en un medio de cultivo por un factor que tiene el mismo efecto (es decir, estimulación o inhibición) sobre la misma ruta de señalización. Los factores adecuados son conocidos en la técnica e incluyen proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos y moléculas pequeñas.

40 El grado de diferenciación de la población celular durante cada etapa puede determinarse monitorizando y/o detectando la expresión de uno o más marcadores celulares en la población de células en diferenciación. Por ejemplo, se puede determinar un aumento en la expresión de marcadores característicos del tipo celular más diferenciado o una disminución en la expresión de marcadores característicos del tipo celular menos diferenciado. La expresión de marcadores celulares puede determinarse mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, RT-PCR, inmunotransferencia, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), y análisis enzimático. En realizaciones preferidas, se puede decir que una célula expresa un marcador si el marcador es detectable sobre la superficie celular. Por ejemplo, una célula que se establece en el presente documento que no expresa un marcador puede presentar transcripción activa y expresión intracelular del gen marcador, pero niveles detectables del marcador pueden no estar presentes sobre la superficie de la célula.

45 Una población de células parcialmente diferenciadas que se produce mediante una etapa en los métodos descritos en el presente documento puede cultivarse, mantenerse o expandirse antes de la siguiente etapa de diferenciación. Las células parcialmente diferenciadas pueden expandirse mediante cualquier técnica conveniente.

50 Después de cualquier etapa, la población de células parcialmente diferenciadas que se produce mediante esa etapa puede contener un 1 % o más, 5 % o más, 10 % o más o 15 % o más de células parcialmente diferenciadas, después

del cultivo en el medio. Si es necesario, la población de células parcialmente diferenciadas puede purificarse mediante cualquier técnica conveniente, tal como MAC o FACS.

5 Las células pueden cultivarse en una monocapa, en ausencia de células alimentadoras, sobre una superficie o sustrato recubierto con proteína de la matriz extracelular, tal como fibronectina, laminina o colágeno. Las técnicas adecuadas para el cultivo celular son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Basic Cell Culture Protocols, C. Helgason, Humana Press Inc. U.S. (15 de octubre de 2004) ISBN: 1588295451; Human Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Medicine S.) Humana Press Inc., EE. UU. (9 de diciembre de 2004) ISBN: 1588292223; Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, R. Freshney, John Wiley & Sons Inc (2 de agosto de 2005) ISBN: 0471453293, 10 Ho WY et al J Immunol Methods. (2006) 310:40-52, Handbook of Stem Cells (ed. R. Lanza) ISBN: 0124366430 Basic Cell Culture Protocols' de J. Pollard y J. M. Walker (1997), "Mammalian Cell Culture: Essential Techniques" de A. Doyle y J. B. Griffiths (1997), "Human Embryonic Stem Cells" de A. Chiu y M. Rao (2003), Stem Cells: From Bench to Bedside" de A. Bongso (2005), Peterson & Loring (2012) Human Stem Cell Manual: A Laboratory Guide Academic Press y "Human Embryonic Stem Cell Protocols" de K. Turksen (2006). Los medios y los ingredientes de los mismos pueden 15 obtenerse de fuentes comerciales (por ejemplo, Gibco, Roche, Sigma, Europa bioproducts, R&D Systems). Se pueden emplear condiciones de cultivo de células de mamífero convencionales para las etapas de cultivo anteriores, por ejemplo, 37 °C, oxígeno al 5 % o 21 %, dióxido de carbono al 5 %. El medio se cambia preferiblemente cada dos días y las células se dejan sedimentar por gravedad.

20 Las células pueden cultivarse en un recipiente de cultivo. Los recipientes de cultivo celular adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen placas de cultivo, platos, matraces, biorreactores y placas de múltiples pocillos, por ejemplo placas de 6 pocillos, 12 pocillos o de 96 pocillos.

25 Los recipientes de cultivo se tratan preferiblemente para el cultivo tisular, por ejemplo, recubriendo una o más superficies del recipiente con una proteína de la matriz extracelular, tal como fibronectina, laminina o colágeno. Los recipientes de cultivo pueden tratarse para el cultivo tisular usando técnicas convencionales, por ejemplo, incubando con una solución de recubrimiento, como se describe en el presente documento, o puede obtenerse pretratado de proveedores comerciales.

30 En una primera fase, las iPSC pueden diferenciarse en células mesodérmicas cultivando la población de iPSC en condiciones adecuadas para promover la diferenciación del mesodermo. Por ejemplo, las células iPSC pueden cultivarse secuencialmente en un primer, segundo y tercer medio de inducción del mesodermo para inducir la diferenciación en células mesodérmicas.

35 Un primer medio de inducción del mesodermo adecuado puede estimular las rutas de señalización mediadas por SMAD2 y SMAD3. Por ejemplo, el primer medio de inducción del mesodermo puede comprender activina.

40 Un segundo medio de inducción del mesodermo adecuado puede (i) estimular las rutas de señalización mediadas por SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 y SMAD9 y (ii) tener actividad de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Por ejemplo, el segundo medio de inducción del mesodermo puede comprender activina, preferiblemente activina A, BMP, preferiblemente BMP4 y FGF, preferiblemente bFGF.

45 Un tercer medio de inducción del mesodermo adecuado puede (i) estimular las rutas de señalización mediadas por SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 y SMAD9 (ii) tener actividad de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y (iii) inhibir la glucógeno sintasa quinasa $\beta 3$. Por ejemplo, el tercer medio de inducción del mesodermo puede comprender activina, preferiblemente activina A, BMP, preferiblemente BMP4, FGF, preferiblemente bFGF y un inhibidor de GSK3, preferiblemente CHIR99021.

50 El primer, segundo y tercer medio de inducción del mesodermo pueden estar desprovistos de factores de diferenciación distintos de los factores de diferenciación expuestos anteriormente.

55 Las rutas de señalización intracelular mediadas por SMAD2 y SMAD3 pueden estimularse mediante el primer, segundo y tercer medio de inducción del mesodermo a través de la presencia en el medio de un primer ligando de TGF β . El primer ligando de TGF β puede ser activina. Activina (Activina A: ID gen de NCBI: 3624 secuencia de referencia de ácido nucleico NM_002192.2 GI: 62953137, secuencia de referencia de aminoácidos NP_002183.1 GI: 4504699) es un polipéptido dimérico que ejerce una gama de efectos celulares a través de la estimulación de la ruta de Activina/Nodal (Vallier et al., Cell Science 118:4495-4509 (2005)). La activina se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, Stemgent Inc. MA EE. UU.; Miltenyi Biotec GmbH, DE). De manera conveniente, la concentración de Activina en un medio descrito en el presente documento puede ser de 1 a 100 ng/ml, preferiblemente 60 de aproximadamente 5 a 50 ng/ml.

65 La actividad de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) del segundo y tercer medios de inducción del mesodermo puede proporcionarse por la presencia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) en los medios. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es un factor de proteína que estimula el crecimiento celular, la proliferación y diferenciación celular mediante la unión a un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). Los factores de crecimiento de fibroblastos adecuados incluyen cualquier miembro de la familia de FGF, por ejemplo, uno

cualquiera de FGF1 a FGF14 y FGF15 a FGF23. Preferiblemente, el FGF es FGF2 (también conocido como bFGF, ID de gen del NCBI: 2247, secuencia de ácido nucleico NM_002006.3 GI: 41352694, secuencia de aminoácidos NP_001997.4 GI: 41352695); FGF7 (también conocido como factor de crecimiento de queratinocitos (o KGF), ID de gen del NCBI: 2247, secuencia de ácido nucleico NM_002006.3 GI: 41352694, secuencia de aminoácidos NP_001997.4 GI: 41352695); o FGF10 (ID de gen del NCBI: 2247, secuencia de ácido nucleico NM_002006.3 GI: 41352694, secuencia de aminoácidos NP_001997.4 GI: 41352695). Lo más preferiblemente, el factor de crecimiento de fibroblastos es FGF2.

De manera conveniente, la concentración de FGF, tal como FGF2 en un medio descrito en el presente documento puede ser de 0,5 a 50 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 5 ng/ml. factores de crecimiento de fibroblastos, tal como FGF2, FGF7 y FGF10, pueden producirse usando técnicas recombinantes de rutina u obtenerse de proveedores comerciales (por ejemplo, R&D Systems, Minneapolis, MN; Stemgent Inc, EE.UU.; Miltenyi Biotec GmbH, DE).

SMAD1, Las rutas de señalización intracelular mediadas por SMAD5 y SMAD9 pueden estimularse por el segundo y tercer medio de inducción del mesodermo a través de la presencia en el medio de un segundo ligando de TGF β . El segundo ligando de TGF β puede ser una proteína morfogénica ósea (BMP). Las proteínas morfogénicas óseas (BMP) se unen a los receptores de proteínas morfogénicas óseas (BMPR) y estimulan la señalización intracelular a través de rutas mediadas por SMAD1, SMAD5 y SMAD9. Las proteínas morfogénicas óseas adecuadas incluyen cualquier miembro de la familia de las BMP, por ejemplo BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 o BMP7. preferiblemente, el segundo ligando de TGF β es BMP2 (ID de gen del NCBI: 650, secuencia de ácido nucleico NM_001200.2 GI: 80861484; secuencia de aminoácidos NP_001191.1 GI: 4557369) o BMP4 (ID de gen del NCBI: 652, secuencia de ácido nucleico NM_001202.3 GI: 157276592; secuencia de aminoácidos NP_001193.2 GI: 157276593). Las BMP adecuadas incluyen BMP4. De manera conveniente, la concentración de una proteína morfogénica ósea, tal como BMP2 o BMP4 en un medio descrito en el presente documento puede ser de 1 a 500 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 10 ng/ml. Las BMP pueden producirse usando técnicas recombinantes de rutina u obtenerse de proveedores comerciales (por ejemplo, R&D, Minneapolis, EE.UU., Stemgent Inc, EE.UU.; Miltenyi Biotec GmbH, DE).

La actividad de inhibición de GSK3 β del tercer medio de inducción del mesodermo puede proporcionarse por la presencia de un inhibidor de GSK3 β en el medio. Los inhibidores de GSK3 β inhiben la actividad de la glucógeno sintasa quinasa 3 β (ID de gen 2932: EC2.7.11.26). Los inhibidores preferidos inhiben específicamente la actividad de la glucógeno sintasa quinasa 3 β . Los inhibidores adecuados incluyen CHIR99021 (6-((2-((4-(2,4-Diclorofenil)-5-(4-metil-1H-imidazol-2-il)pirimidin-2-il)amino)etil)amino)nicotinonitrilo; Ring D. B. et al., Diabetes, 52:588-595 (2003)) alsterpauillone, kenpauillone, BIO(6-bromoindirrubin-3'-oxima (Sato et al. Nat Med. enero de 2004;10(1):55-63), SB216763 (3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona), Lito y SB415286 (3-((3-cloro-4-hidroxifenil)amino)-4-(2-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona; Coghlan et al. Chem Biol. octubre de 2000;7(10):793-803). En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor de GSK3 β es CHIR99021. Se pueden obtener inhibidores de glucógeno sintasa quinasa 3 β adecuados de proveedores comerciales (por ejemplo, Stemgent Inc. MA EE. UU.; Cayman Chemical Co. MI EE. UU.; Selleckchem, MA EE. UU.). Por ejemplo, el tercer medio de inducción del mesodermo puede contener de 0,1 a 100 μ M de un inhibidor de GSK3 β , tal como CHIR99021, preferiblemente aproximadamente 10 μ M.

En realizaciones preferidas, el primer, segundo y tercer medio de inducción del mesodermo son medios químicamente definidos. Por ejemplo, el primer medio de inducción del mesodermo puede consistir en un medio nutriente químicamente definido complementado con una cantidad efectiva de activina, preferiblemente activina A, por ejemplo, 50 ng/ml de activina A; el segundo medio de inducción del mesodermo puede consistir en un medio nutriente químicamente definido complementado con una cantidad efectiva de activina, preferiblemente activina A, por ejemplo, 5 ng/ml de activina A, BMP, preferiblemente BMP4, por ejemplo 10 ng/ml de BMP4; y FGF, preferiblemente bFGF (FGF2), por ejemplo 5 ng/ml de bFGF; y el tercer medio de inducción del mesodermo puede consistir en un medio nutriente químicamente definido complementado con una cantidad efectiva de activina, preferiblemente activina A, por ejemplo, 5 ng/ml de activina A, BMP, preferiblemente BMP4, por ejemplo 10 ng/ml de BMP4; FGF, preferiblemente bFGF (FGF2), por ejemplo 5 ng/ml de bFGF; e inhibidor de GSK3, preferiblemente CHIR-99021, por ejemplo CHIR-99021 10 μ M.

Un medio químicamente definido (CDM) es una solución nutritiva para cultivar células que contiene solo componentes especificados, preferiblemente componentes de estructura química conocida. Un CDM está desprovisto de componentes o constituyentes indefinidos que incluyen componentes indefinidos, tal como células alimentadoras, células estromales, suero y matrices extracelulares complejas, tal como Matrigel™. Por ejemplo, un CDM no contiene células estromales, tal como células OP9, que expresan ligandos Notch, tal como DLL1 o DLL4.

El medio nutriente químicamente definido puede comprender un medio basal químicamente definido. Los medios basales químicamente definidos adecuados incluyen medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), Ham's F12, Medio de Eagle modificado por Dulbecco avanzado (DMEM) (Price et al. Focus (2003), 25 3-6), Williams E (Williams, G.M. et al. Exp. Cell Research, 89, 139-142 (1974)), RPMI-1640 (Moore, G.E. y Woods L.K., (1976) Tissue Culture Association Manual. 3, 503-508) y StemPro™-34 PLUS (ThermoFisher Scientific).

El medio basal puede complementarse con suplementos de medio de cultivo sin suero y/o componentes adicionales

5 en el medio. Suplementos adecuados y componentes adicionales se describen anteriormente y pueden incluir L-glutamina o sustitutos, tal como GlutaMAX-1™, ácido ascórbico, monolioliglicerol (MTG), antibióticos tal como penicilina y estreptomina, seroalbúmina humana, por ejemplo seroalbúmina humana recombinante, tal como Cellastim™ (Merck/Sigma) y Recombumin™ (albumedix.com), insulina, transferrina y 2-mercaptoetanol. Un medio basal puede complementarse con un sustituto de suero, tal como sustituto de suero desactivado (KOSR; Invitrogen).

10 Las iPSC pueden cultivarse en el primer medio de inducción del mesodermo durante 1 a 12 horas, preferiblemente aproximadamente 4 horas; después se cultivan en el segundo medio de inducción del mesodermo durante 30 a 54 horas, preferiblemente aproximadamente 44 horas; y después se cultivan en el tercer medio de inducción del mesodermo durante 36 a 60 horas, preferiblemente aproximadamente 48 horas para producir una población de células mesodérmicas.

15 Las células mesodérmicas son células progenitoras parcialmente diferenciadas que están comprometidas con linajes mesodérmicos y son capaces de diferenciarse en condiciones apropiadas en todos los tipos de células en el mesénquima (fibroblasto), músculo, hueso, tejido adiposo, sistemas vasculares y hematopoyéticos. Las células mesodérmicas pueden expresar uno o más marcadores mesodérmicos. Por ejemplo, las células mesodérmicas pueden expresar uno cualquiera, dos, tres, cuatro, cinco, seis o los siete de Brachyury, Goosecoid, Mix11, KDR, FoxA2, GATA6 y PDGFaR.

20 En una segunda fase, las células mesodérmicas pueden diferenciarse en células endoteliales hemogénicas (HEC) cultivando la población de células mesodérmicas en condiciones adecuadas para promover la diferenciación endotelial hemogénica (HE). Por ejemplo, las células iPSC pueden cultivarse en un medio de inducción HE.

25 Un medio de inducción HE adecuado puede (i) estimular las rutas de señalización mediadas por el receptor cKIT (CD117) y (ii) estimular las rutas de señalización mediadas por VEGFR. Por ejemplo, el medio de inducción HE puede comprender SCF y VEGF.

30 El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un factor de proteína de la familia de PDGF que se une a los receptores de tirosina quinasa de VEGFR y estimula la vasculogénesis y la angiogénesis. Los VEGF adecuados incluyen cualquier miembro de la familia de VEGF, por ejemplo, uno cualquiera de VEGF-A a VEGF-D y PlGF. Preferiblemente, el VEGF es VEGF-A (también conocido como VEGF, ID de gen del NCBI: 7422, secuencia de ácido nucleico NM_001025366.2, secuencia de aminoácidos NP_001020537.2). VEGF se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE. UU.). De manera conveniente, la concentración de VEGF en un medio de inducción HE descrito en el presente documento puede ser de 1 a 100 ng/ml, por ejemplo cualquiera de aproximadamente 5, 7, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 15 ng/ml.

40 En algunos ejemplos de medios de inducción HE, VEGF puede reemplazarse por un activador o agonista de VEGF que estimula las rutas de señalización mediadas por VEGFR. Los activadores de VEGF adecuados son conocidos en la técnica e incluyen proteínas, tal como Gremlin (Mitola et al (2010) Blood 116(18) 3677-3680) ácidos nucleicos, tal como ARNhp (por ejemplo Turunen et al. Circ Res. 11 de septiembre de 2009; 105(6):604-9), plásmidos basados en CRISPR (por ejemplo, plásmido de activación de VEGF CRISPR; Santa Cruz Biotech, EE. UU.), anticuerpos y moléculas pequeñas.

45 El factor de células madre (SCF) es una citocina que se une al receptor KIT (protooncogén KIT, receptor tirosina quinasa) (CD117; SCFR) y está implicado en la hematopoyesis. SCF (también denominado KITLG, ID de gen del NCBI: 4254) puede tener la secuencia de ácido nucleico de referencia NM_000899.5 o NM_03994.5 y la secuencia de aminoácidos de referencia NP_000890.1 o NP_003985.5. SCF se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE. UU.). De manera conveniente, la concentración de SCF en un medio de inducción HE descrito en el presente documento puede ser de 1 a 1000 ng/ml, por ejemplo cualquiera de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 100 ng/ml.

55 En realizaciones preferidas, el medio de inducción HE es un medio químicamente definido. Por ejemplo, el medio de inducción HE puede consistir en un medio nutriente químicamente definido complementado con cantidades efectivas de VEGF, por ejemplo 15 ng/ml de VEGF; y SCF, por ejemplo 100 ng/ml de SCF.

60 Los medios nutrientes químicamente definidos adecuados se describen anteriormente e incluyen StemPro™-34 (ThermoFisher Scientific).

Las células mesodérmicas pueden cultivarse en el medio de inducción HE durante 2 a 6 días, preferiblemente aproximadamente 4 días, para producir una población de células HE.

65 Las células endoteliales hemogénicas (HEC) son células progenitoras endoteliales parcialmente diferenciadas que tienen potencial hematopoyético y son capaces de diferenciarse en condiciones apropiadas en linajes hematopoyéticos. Las células HE pueden expresar CD34. En algunas realizaciones, las HEC pueden no expresar

CD73 o CXCR4 (CD184). Por ejemplo, las células HE pueden tener el fenotipo CD34+ CD73- o CD34+ CD73- CXCR4-

5 En una tercera fase, las células endoteliales hemogénicas (HE) pueden diferenciarse en células progenitoras hematopoyéticas (HPC) cultivando la población de células HE en condiciones adecuadas para promover la diferenciación hematopoyética. Por ejemplo, las células HE pueden cultivarse en un medio de inducción hematopoyética.

10 Un medio de inducción hematopoyética adecuado puede estimular las siguientes (i) rutas de señalización mediadas por el receptor cKIT (CD117), (ii) rutas de señalización mediadas por VEGFR, (iii) rutas de señalización mediadas por MPL (CD110) (iv) rutas de señalización mediadas por FLT3 (v) rutas de señalización mediadas por IGF1R (vi) rutas de señalización mediadas por SMAD1, 5 y 9 (vii) rutas de señalización de Hedgehog (viii) ruta de señalización mediada por EpoR y (ix) rutas de señalización mediadas por AGTR2. Un medio de inducción hematopoyética adecuado también puede inhibir la ruta de señalización mediada por AGTR1 (receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁)). Un medio de inducción hematopoyética adecuado también puede tener actividad de interleucina (IL) y actividad de FGF.

15 Por ejemplo, un medio de inducción hematopoyética puede comprender los factores de diferenciación: VEGF, SCF, Trombopoyetina (TPO), ligando de Flt3 (Flt3L), IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IGF-1, BMP, FGF, Sonic hedgehog (SHH), eritropoyetina (EPO), angiotensina II y un antagonista del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁). Un ejemplo de un medio de inducción hematopoyética adecuado es el medio de la Fase 3 que se muestra en la Tabla 1 a continuación.

20 Trombopoyetina (TPO) es una hormona de glicoproteína que regula la producción de plaquetas. TPO (también denominado THPO, ID de gen del NCBI: 7066) puede tener la secuencia de ácido nucleico de referencia NM_000460.4 y la secuencia de aminoácidos de referencia NP_000451.1. TPO se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE.UU.; Miltenyi Biotec GmbH, DE). De manera conveniente, la concentración de TPO en un medio de inducción hematopoyética descrito en el presente documento puede ser de 3 a 300 ng/ml, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 27, 30, 32, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275 o 300 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 30 ng/ml.

30 El ligando de Flt3 (ligando de tirosina quinasa 3 relacionado con Fms o FLT3L) es una citocina con actividad hematopoyética que se une al receptor de FLT3 y estimula la proliferación y diferenciación de células progenitoras. ligando de Flt3 (también denominado FLT3LG, ID de gen del NCBI: 2323) puede tener la secuencia de ácido nucleico de referencia NM_001204502.2 y la secuencia de aminoácidos de referencia NP_001191431.1. Flt3 se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE.UU.; Miltenyi Biotec GmbH, DE). De manera conveniente, la concentración de ligando de Flt3 en un medio de inducción hematopoyética descrito en el presente documento puede ser de 0,25 a 250 ng/ml, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230 o 240 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 25 ng/ml.

40 Las interleucinas (IL) son citocinas que desempeñan papeles importantes en el desarrollo y la función inmunitarios. Las IL en un medio de inducción hematopoyética pueden incluir IL-3, IL-6, IL-7 e IL-11.

45 IL-3 (también denominada IL3 o MCGF, ID de gen del NCBI: 3562) puede tener la secuencia de ácido nucleico de referencia NM_000588.4 y la secuencia de aminoácidos de referencia NP_000579.2. IL-3 se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE.UU.; Miltenyi Biotec GmbH, DE). De manera conveniente, la concentración de IL-3 en un medio de inducción hematopoyética descrito en el presente documento puede ser de 0,25 a 250 ng/ml, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230 o 240 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 25 ng/ml.

55 IL-6 (también denominada IL6 o HGF, ID de gen del NCBI: 3569) puede tener la secuencia de ácido nucleico de referencia NM_000600.5 y la secuencia de aminoácidos de referencia NP_000591.5. IL-6 se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE.UU.; Miltenyi Biotec GmbH, DE). De manera conveniente, la concentración de IL-6 en un medio de inducción hematopoyética descrito en el presente documento puede ser de 0,1 a 100 ng/ml, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 10 ng/ml.

60 IL-7 (también denominada IL7, ID de gen del NCBI: 3574) puede tener la secuencia de ácido nucleico de referencia NM_000880.4 y la secuencia de aminoácidos de referencia NP_000871.1. IL-7 se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE.UU.; Miltenyi Biotec GmbH, DE). De manera conveniente, la concentración de IL-7 en un medio de inducción hematopoyética descrito en el presente documento puede ser de 0,1 a 100 ng/ml, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 10 ng/ml.

65 IL-11 (también denominada AGIF, ID de gen del NCBI: 3589) puede tener la secuencia de ácido nucleico de referencia

NM_000641.4 y la secuencia de aminoácidos de referencia NP_000632.1. IL-11 se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE.UU.; Miltenyi Biotec GmbH, DE). De manera conveniente, la concentración de ligando de IL-11 en un medio de inducción hematopoyética descrito en el presente documento puede ser de 0,5 a 100 ng/ml, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 5 ng/ml.

El factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) es una hormona que se une al receptor de tirosina quinasas IGF-1 (IGF1R) y al receptor de insulina y activa las múltiples rutas de señalización. IGF-1 (también denominado IGF o MGF, ID de gen del NCBI: 3479) puede tener la secuencia de ácido nucleico de referencia NM_000618.5 y la secuencia de aminoácidos de referencia NP_000609.1. IGF-1 se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE. UU.). De manera conveniente, la concentración de IGF-1 en un medio de inducción hematopoyética descrito en el presente documento puede ser de 0,25 a 250 ng/ml, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230 o 240 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 25 ng/ml.

Sonic hedgehog (SHH) es un ligando de la ruta de señalización de hedgehog que regula la organogénesis de vertebrados. SHH (también denominado TPT o HHG1, ID de gen del NCBI: 6469) puede tener la secuencia de ácido nucleico de referencia NM_000193.4 y la secuencia de aminoácidos de referencia NP_000184.1. SHH se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE.UU.; Miltenyi Biotec GmbH, DE). De manera conveniente, la concentración de SHH en un medio de inducción hematopoyética descrito en el presente documento puede ser de 0,25 a 250 ng/ml, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230 o 240 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 25 ng/ml.

Eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína citocina que se une al receptor de eritropoyetina (EpoR) y estimula la eritropoyesis. EPO (también denominado DBAL, ID de gen del NCBI: 2056) puede tener la secuencia de ácido nucleico de referencia NM_000799.4 y la secuencia de aminoácidos de referencia NP_000790.2. EPO se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE.UU.; PreproTech, EE. UU.). De manera conveniente, la concentración de EPO en el medio de inducción hematopoyética descrito en el presente documento puede ser de 0,02 a 20 U/ml, por ejemplo cualquiera de aproximadamente 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 18 U/ml, preferiblemente aproximadamente 2 U/ml.

La angiotensina II es una hormona heptapeptídica que se forma por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) sobre la angiotensina I. La angiotensina II estimula la vasoconstricción. La angiotensina I y II se forman por la escisión del angiotensinógeno (también denominado AGT, ID de gen del NCBI: 183), que puede tener la secuencia de ácido nucleico de referencia NM_000029.4 y la secuencia de aminoácidos de referencia NP_000020.1. Angiotensina II se encuentra fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, R&D Systems, EE.UU.; Tocris, EE. UU.). De manera conveniente, la concentración de angiotensina II en un medio de inducción hematopoyética descrito en el presente documento puede ser de 0,05 a 50 ng/ml, por ejemplo cualquiera de aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 48 ng/ml, preferiblemente de aproximadamente 5 ng/ml.

Los antagonistas del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁) (ARB) son compuestos que bloquean selectivamente la activación del receptor de AT₁ (AGTR1; ID de gen 185). Los antagonistas de AT₁ adecuados incluyen losartán (2-butiril-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)-4-bifenilil]metil]-1H-imidazol-5-il)metanol), valsartán (ácido (2S)-3-metil-2-(pentanoil[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]amino)butanoico) y telmisartán (ácido 4'[(1,4'-dimetil-2'-propil[2,6'-bi-1H-bencimidazol]-1'-il)metil][1,1'-bifenil]-2-carboxílico. En algunas realizaciones preferidas, el antagonista de AT₁ es losartán. Los antagonistas de AT₁ adecuados pueden obtenerse de proveedores comerciales (por ejemplo, Tocris, EE. UU.; Cayman Chemical Co. MI EE. UU.). De manera conveniente, la concentración del antagonista del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁) en un medio de inducción hematopoyética descrito en el presente documento puede ser de 1 a 1000 µM, por ejemplo cualquiera de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 900 µM, preferiblemente aproximadamente 100 µM.

En realizaciones preferidas, el medio de inducción hematopoyética es un medio químicamente definido. Por ejemplo, el medio de inducción hematopoyética puede consistir en un medio nutriente químicamente definido complementado con cantidades efectivas de VEGF, por ejemplo 15 ng/ml; SCF, por ejemplo 100 ng/ml; trombopoyetina (TPO), por ejemplo 30 ng/ml; ligando de Flt3 (Flt3L), por ejemplo, 25 ng/ml; IL-3, por ejemplo 25 ng/ml; IL-6, por ejemplo 10 ng/ml; IL-7, por ejemplo 10 ng/ml; IL-11, por ejemplo 5 ng/ml; IGF-1, por ejemplo 25 ng/ml; BMP, por ejemplo, BMP4 a 10 ng/ml; FGF, por ejemplo, bFGF a 5 ng/ml; Sonic hedgehog (SHH), por ejemplo 25 ng/ml; eritropoyetina (EPO), por ejemplo, 2 u/ml; angiotensina II, por ejemplo, 10 µg/ml, y un antagonista del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁), por ejemplo losartán, a 100 µM. Un medio de inducción hematopoyética adecuado puede estar desprovisto de otros factores de diferenciación. Por ejemplo, un medio de inducción hematopoyética puede consistir en un medio nutriente químicamente definido complementado con uno o más factores de diferenciación, en donde el uno o más factores de diferenciación consisten en VEGF, SCF, Trombopoyetina (TPO), ligando de Flt3 (Flt3L), IL-3, IL-6, IL-7, IL-

11, IGF-1, BMP, FGF, Sonic hedgehog (SHH), eritropoyetina (EPO), angiotensina II y un antagonista del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁) (es decir, el medio no contiene ningún factor de diferenciación distinto de VEGF, SCF, Trombopoyetina (TPO), ligando de Flt3 (Flt3L), IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IGF-1, BMP, FGF, Sonic hedgehog (SHH), eritropoyetina (EPO), angiotensina II y un antagonista del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁)).

5 Los medios nutrientes químicamente definidos adecuados se describen anteriormente e incluyen StemPro™-34 PLUS (ThermoFisher Scientific) o un medio basal tal como IMDM complementado con albúmina, insulina, selenio-transferrina y lípidos como se describe a continuación.

10 Las células HE pueden cultivarse en el medio de inducción hematopoyética durante 8-21 días, preferiblemente aproximadamente 16 días, para producir la población de HPC.

15 Las HPC (también denominadas células madre hematopoyéticas) son células madre multipotentes que están comprometidas con un linaje hematopoyético y son capaces de una mayor diferenciación hematopoyética en todos los tipos de células sanguíneas, incluidos los linajes mieloides y linfoides, incluyendo monocitos, células B y células T. Las HPC pueden expresar CD34. Las HPC pueden coexpresar CD133, CD45 y FLK1 (también conocido como KDR o VEGFR2) y pueden ser negativas para la expresión de CD38 y otros marcadores específicos de linaje. Por ejemplo, las HPC pueden presentar el fenotipo CD34+ CD133+ CD45+ FLK1+ CD38-.

20 Tras la generación de HPC a partir de células HE, una población de HPC que expresan uno o más marcadores de superficie celular, tal como CD34, puede purificarse, por ejemplo mediante clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), antes de someterse a diferenciación adicional. Por ejemplo, se puede purificar una población de HPC CD34+. Las HPC CD34+ pueden purificarse después de 8 días, por ejemplo, 8-10 días, de cultivo en el medio de inducción HE. Las HPC CD34+ pueden purificarse después de 16 días de diferenciación, por ejemplo, del día 16 al día 18 del método de diferenciación.

25 En una cuarta fase, las células progenitoras hematopoyéticas (HPC) pueden diferenciarse en células T progenitoras cultivando la población de HPC en condiciones adecuadas para promover la diferenciación linfoide. Por ejemplo, las células progenitoras hematopoyéticas pueden cultivarse en un medio de expansión linfoide.

30 Un medio de expansión linfoide es un medio de cultivo celular que promueve la diferenciación linfoide de las HPC en células T progenitoras.

35 Un medio de expansión linfoide adecuado puede (i) estimular rutas de señalización mediadas por el receptor cKIT (CD117; receptor tirosina quinasa KIT), (ii) estimular las rutas de señalización mediadas por MPL (CD110), (iii) las rutas de señalización mediadas por FLT3 y (iv) tener actividad de interleucina (IL). Por ejemplo, un medio de expansión linfoide puede comprender los factores de diferenciación SCF, FLT3L, TPO e IL7.

40 En realizaciones preferidas, el medio de expansión linfoide es un medio químicamente definido. Por ejemplo, el medio de expansión linfoide puede consistir en un medio nutriente químicamente definido complementado con cantidades efectivas de los factores de diferenciación anteriores. Los medios de expansión linfoide adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen Stemspan™ SFEM II (n.º de cat. 9605; StemCell Technologies Inc, CA). Con suplemento de expansión linfoide Stemspan™ (n.º de cat. 9915; StemCell Technologies Inc, CA).

45 Las HPC pueden cultivarse sobre una superficie durante la diferenciación en células T progenitoras. Por ejemplo, las HPC pueden cultivarse en una superficie de un recipiente de cultivo, perla u otro biomaterial o polímero.

50 Preferiblemente, la superficie puede recubrirse con un factor que estimula la señalización de Notch, por ejemplo, un ligando de Notch, tal como tipo Delta 1 (DLL1) o tipo Delta 4 (DLL4). Los ligandos de Notch adecuados son bien conocidos en la técnica y se encuentran disponibles de proveedores comerciales.

55 La superficie también puede estar recubierta con una proteína de la matriz extracelular, tal como fibronectina, vitronectina, laminina o colágeno y/o una o más proteínas de adhesión a la superficie celular, tal como VCAM1. En algunas realizaciones, la superficie para el cultivo de HPC puede tener un recubrimiento que comprende un factor que estimula la señalización de Notch, por ejemplo, un ligando de Notch, tal como DLL4, sin la proteína de la matriz extracelular o la proteína de adhesión a la superficie celular.

60 En algunas realizaciones, la superficie para el cultivo de HPC puede tener un recubrimiento que comprende un factor que estimula la señalización de Notch, por ejemplo, un ligando de Notch, tal como DLL4, una proteína de la matriz extracelular, tal como vitronectina, y una proteína de adhesión a la superficie celular, tal como VCAM1. La superficie puede estar recubierta con una proteína de la matriz extracelular, factor que estimula la señalización de Notch y la proteína de adhesión a la superficie celular poniendo en contacto la superficie con una solución de recubrimiento. Por ejemplo, la solución de recubrimiento puede incubarse sobre la superficie en condiciones adecuadas para recubrir la superficie. Las condiciones pueden, por ejemplo, incluir aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. Las soluciones de recubrimiento que comprenden una proteína de la matriz extracelular y un factor que estimula la señalización de Notch se encuentran disponibles de proveedores comerciales (material de recubrimiento de

diferenciación linfoide StemSpan™; n.º de cat. 9925; Stem Cell Technologies Inc, CA).

Las HPC pueden cultivarse en el medio de expansión linfoide sobre el sustrato durante un tiempo suficiente para que las HPC se diferencien en células T progenitoras. Por ejemplo, las HPC pueden cultivarse durante 2-6 semanas o 2-4 semanas, preferiblemente 3 semanas.

Las células T progenitoras son células progenitoras linfopoyéticas multipotentes que son capaces de dar lugar a células T $\alpha\beta$, células T $\gamma\delta$, células T residentes en los tejidos y células T NK. Las células T progenitoras pueden comprometerse con el linaje de células T $\alpha\beta$ después de la selección pre-TCR en el timo. Las células T progenitoras pueden ser capaces de colonizar el timo *in vivo* y pueden ser capaces de comprometerse con el linaje de células T después de la selección pre-TCR en el timo. Las células T progenitoras también pueden ser capaces de madurar en células T CD3⁺ productoras de citocinas.

Las células T progenitoras pueden expresar CD5 y CD7, es decir, las células T progenitoras pueden tener un fenotipo CD5+CD7+. Las células T progenitoras también pueden coexpresar CD44, CD25 y CD2. Por ejemplo, las células T progenitoras pueden tener un fenotipo CD5+, CD7+ CD44+, CD25+ CD2+. En algunas realizaciones, las células T progenitoras también pueden coexpresar CD45. Las células T progenitoras pueden carecer de expresión de CD3, CD4 y CD8, por ejemplo sobre la superficie celular.

En una quinta fase, las células T progenitoras pueden madurarse en células T cultivando la población de células T progenitoras en condiciones adecuadas para promover la maduración de células T. Por ejemplo, las células T progenitoras pueden cultivarse en un medio de maduración de células T.

Un medio de maduración de células T es un medio de cultivo celular que promueve la maduración de células T progenitoras en células T maduras. Un medio de maduración de células T adecuado puede (i) estimular las rutas de señalización mediadas por el receptor cKIT (CD117; receptor tirosina quinasa KIT) (ii) las rutas de señalización mediadas por FLT3 y (iii) tener actividad de interleucina (IL). Por ejemplo, un medio de maduración de células T puede comprender los factores de diferenciación SCF, FLT3L e IL7.

En realizaciones preferidas, el medio de maduración de células T es un medio químicamente definido. Por ejemplo, el medio de maduración de células T puede consistir en un medio nutriente químicamente definido complementado con cantidades efectivas de los factores de diferenciación anteriores. Los medios de maduración de células T adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen Stemspan™ SFEM II (n.º de cat. 9605; StemCell Technologies Inc, CA) con suplemento de maduración de células T Stemspan™ (n.º de cat. 9930; StemCell Technologies Inc, CA) y otros medios adecuados para la expansión de PBMC y células CD3+, tal como el medio de expansión de células T humanas ExCellerate (R&D Systems, EE. UU.). Otros medios de maduración de células T adecuados pueden incluir un medio basal tal como IMDM, complementado con ITS, albúmina y lípidos, como se describe en otra parte del presente documento y complementado adicionalmente con cantidades efectivas de los factores de diferenciación anteriores.

Las células T progenitoras pueden cultivarse sobre una superficie. Por ejemplo, las células T progenitoras pueden cultivarse sobre una superficie de un recipiente de cultivo, perla u otro biomaterial o polímero.

Preferiblemente, la superficie puede recubrirse con un factor que estimula la señalización de Notch, por ejemplo, un ligando de Notch, tal como tipo Delta 1 (DLL1) o tipo Delta 4 (DLL4). Los ligandos de Notch adecuados son bien conocidos en la técnica y se encuentran disponibles de proveedores comerciales. La superficie también puede estar recubierta con una proteína de la matriz extracelular, tal como fibronectina, vitronectina, laminina o colágeno y/o una o más proteínas de adhesión a la superficie celular, tal como VCAM1. Los recubrimientos adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en otra parte del presente documento.

Las células T progenitoras pueden cultivarse en el medio de maduración de células T sobre el sustrato durante un tiempo suficiente para que las células T progenitoras maduren en células T. Por ejemplo, las células T progenitoras pueden cultivarse durante 1-4 semanas, preferiblemente 2 o 3 semanas.

En algunas realizaciones, las células T producidas por maduración de células T progenitoras pueden ser células T CD4+CD8+ doblemente positivas.

Las células T progenitoras pueden madurar en células T mediante los métodos descritos anteriormente.

Después de la maduración de células T progenitoras (fase 5), la población de células T puede ser predominantemente células T CD4+CD8+ doblemente positivas.

En una sexta fase, la población de células T doblemente positivas puede activarse y/o expandirse para producir o aumentar la proporción de células T CD4+ positivas individuales, o más preferiblemente células T CD8+ positivas individuales. Los métodos adecuados para activar y expandir células T son bien conocidos en la técnica y se describen anteriormente. En algunas realizaciones, las células T CD4+CD8+ doblemente positivas pueden cultivarse en un medio de maduración de células T como se describe en el presente documento complementado con IL-15. El medio

puede complementarse adicionalmente con un agonista de receptor de células T (TCR), por ejemplo uno o más anticuerpos anti-TCR, tal como anticuerpos anti- α CD3 y anticuerpos anti- α CD28, como se ha descrito anteriormente para activar y expandir la población y producir células T positivas individuales.

5 Después de la transducción, las células T producidas como se describe en el presente documento pueden expresar un receptor de antígeno heterólogo, tal como un receptor de células T (TCR), un receptor de células NK o un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a un antígeno diana. Por ejemplo, el receptor de antígeno heterólogo puede unirse específicamente a células cancerosas que expresan un antígeno tumoral. Las células T pueden ser útiles, por ejemplo, en inmunoterapia, tal como se describe a continuación,

10 Después de la producción, la población de células T, por ejemplo células DP CD4+CD8+, células SP CD4+ o células SP CD8+, puede aislarse y/o purificarse. Puede usarse cualquier técnica conveniente, incluyendo clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o la clasificación de células activadas magnéticamente usando partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos (MACS).

15 La población de células T, por ejemplo células DP CD4+CD8+, células SP CD4+ o células SP CD8+, puede expandirse y/o concentrarse. Opcionalmente, la población de células T producidas como se describe en el presente documento puede almacenarse, por ejemplo por crioconservación, antes de su uso.

20 Una población de células T transducidas como se describe en el presente documento puede mezclarse con otros reactivos, tal como tampones, vehículos, diluyentes, conservantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los reactivos adecuados se describen con más detalle a continuación. Un método descrito en el presente documento puede comprender mezclar la población de células T modificadas con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 Composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración (por ejemplo, por infusión), incluyen soluciones para inyección estériles, apirógenas, isotónicas acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos y solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para su uso en tales formulaciones incluyen inyección de cloruro de sodio, solución de Ringer o solución de Ringer lactato. Los vehículos adecuados pueden encontrarse en textos farmacéuticos convencionales, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990.

35 En algunas realizaciones preferidas, la población de células T transducidas como se describe en el presente documento puede formularse en una composición farmacéutica adecuada para la infusión intravenosa en un individuo.

40 La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, ser humano) sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

45 Una población de células T transducidas como se describe en el presente documento puede usarse como un medicamento. Por ejemplo, una población de células T puede usarse en la terapia de inmunoterapia contra el cáncer, por ejemplo terapia adoptiva de células T.

50 Terapia celular adoptiva o inmunoterapia adoptiva se refiere a la transferencia adoptiva de linfocitos T humanos que expresan receptores de antígeno que son específicos para células diana. Por ejemplo, los linfocitos T humanos pueden expresar TCR que son específicos para complejos peptídicos de MHC expresados en células diana o receptores de antígenos quiméricos (CAR) que son específicos para antígenos expresados en células diana.

55 Esto se puede usar para tratar una variedad de enfermedades dependiendo de la diana elegida, por ejemplo, antígenos específicos de tumor para tratar el cáncer. La terapia celular adoptiva implica extraer una porción de las células de un donante o del paciente, por ejemplo, glóbulos blancos. Las células se usan después para generar iPSC *in vitro* y estas iPSC se usan para generar eficientemente células T específicas para complejos de péptido-MHC en células diana como se describe en el presente documento. Las células T pueden expandirse, lavarse, concentrarse y/o después congelarse para dar tiempo a las pruebas, envío y almacenamiento hasta que un paciente esté listo para recibir la infusión de células.

60 Otros aspectos de la invención proporcionan el uso de una población de células T como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, una población de células T como se describe en el presente documento para el tratamiento del cáncer, y un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar una población de células T como se describe en el presente documento a un individuo que lo necesita.

65

La población de células T puede ser autóloga, es decir, las células T se producen a partir de iPSC derivadas de células obtenidas originalmente del mismo individuo al que se administran posteriormente las células T (es decir, el individuo donante y receptor son el mismo).

5 La población de células T puede ser alogénica, es decir, las células T pueden producirse a partir de iPSC derivadas de células obtenidas originalmente de un individuo diferente al individuo al que se administran posteriormente las células T (es decir, el individuo donante y receptor son diferentes). Alogénico se refiere a un injerto derivado de un animal diferente de la misma especie.

10 Los individuos donante y receptor pueden ser compatibles en cuanto a HLA para evitar la EICH y otros efectos inmunitarios indeseables, tal como rechazo. Como alternativa, los individuos donante y receptor pueden no ser compatibles en cuanto a HLA, o los genes HLA en las células del individuo donante pueden modificarse, por ejemplo mediante edición génica, para eliminar cualquier incompatibilidad en cuanto a HLA con el receptor.

15 Una población adecuada de células T para su administración a un individuo receptor puede producirse mediante un método que comprende proporcionar una población inicial de células obtenidas de un individuo donante, reprogramar las células en iPSC, inactivar RAG en las iPSC y diferenciar las iPSC inactivadas para RAG en células T que expresan un receptor de antígeno, tal como un TCR $\alpha\beta$ que se une específicamente a células cancerosas en el individuo receptor, como se describe en el presente documento.

20 Después de la administración de las células T, el individuo receptor puede exhibir una respuesta inmunitaria mediada por células T contra células cancerosas en el individuo receptor. Esto puede tener un efecto beneficioso sobre la afección cancerosa en el individuo.

25 Como se usa en el presente documento, los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor" se usan de manera intercambiable y, en forma singular o plural, se refieren a células que han experimentado una transformación maligna que las convierte en patológicas para el organismo hospedador.

30 Las células cancerosas primarias se pueden distinguir fácilmente de las células no cancerosas mediante técnicas bien establecidas, particularmente examen histológico. La definición de una célula cancerosa, como se usa en el presente documento, incluye no solo una célula cancerosa primaria, sino cualquier célula derivada de un ancestro de células cancerosas. Esto incluye células cancerosas metastásicas y cultivos *in vitro* y líneas celulares derivadas de células cancerosas. Cuando se refiere a un tipo de cáncer que normalmente se manifiesta como un tumor sólido, un tumor "clínicamente detectable" es aquel que es detectable basándose en la masa tumoral; por ejemplo, mediante procedimientos como la tomografía computarizada (TC), la formación de imágenes mediante resonancia magnética (RM), rayos X, ecografía o palpación en la exploración física, y/o que es detectable debido a la expresión de uno o más antígenos específicos de cáncer en una muestra obtenible de un paciente.

40 Las afecciones cancerosas pueden caracterizarse por la proliferación anómala de células cancerosas malignas y pueden incluir las leucemias, tal como AML, LMC, LLA y LLC, linfomas, tales como linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin y mieloma múltiple, y cánceres sólidos tal como sarcomas, cáncer de piel, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer suprarrenal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de la vesícula biliar y de las vías biliares, cáncer de tiroides, cáncer de timo, cáncer de huesos y cáncer cerebral, así como cáncer de origen primario desconocido (CUP).

50 Las células cancerosas de un individuo pueden ser inmunológicamente distintas de las células somáticas normales del individuo (es decir, el tumor canceroso puede ser inmunogénico). Por ejemplo, las células cancerosas pueden ser capaces de provocar una respuesta inmunitaria sistémica en el individuo contra uno o más antígenos expresados por las células cancerosas. Los antígenos tumorales que provocan la respuesta inmunitaria pueden ser específicos de células cancerosas o pueden ser compartidos por una o más células normales del individuo.

55 Las células cancerosas de un individuo adecuado para el tratamiento como se describe en el presente documento pueden expresar el antígeno y pueden ser del tipo de HLA correcto para unirse al TCR heterólogo expresado por las células T.

60 Un individuo adecuado para el tratamiento como se describe anteriormente puede ser un mamífero. En realizaciones preferidas, el individuo es un ser humano. En otras realizaciones preferidas, pueden emplearse mamíferos no humanos, especialmente mamíferos que se usan convencionalmente como modelos para demostrar la eficacia terapéutica en seres humanos (por ejemplo, animales murinos, primates, porcinos, caninos o conejos).

65 En algunas realizaciones, el individuo puede tener enfermedad mínima residual (EMR) después de un tratamiento contra el cáncer inicial.

Un individuo con cáncer puede presentar al menos un signo identificable, síntoma o hallazgo de laboratorio

identificable que sea suficiente para hacer un diagnóstico de cáncer de acuerdo con los estándares clínicos conocidos en la técnica. Pueden encontrarse ejemplos de tales estándares clínicos en libros de texto de medicina tal como Harrison's Principles of Internal Medicine, 15ª Ed., Fauci AS et al., eds., McGraw-Hill, Nueva York, 2001. En algunos casos, el diagnóstico de un cáncer en un individuo puede incluir la identificación de un tipo de célula particular (por ejemplo, una célula cancerosa) en una muestra de un fluido o tejido corporal obtenido del individuo.

Un efecto antitumoral es un efecto biológico que puede manifestarse por una reducción en la tasa de crecimiento tumoral, disminución del volumen tumoral, una disminución del número de células tumorales, una disminución del número de metástasis, un aumento de la esperanza de vida o una mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto anti-tumoral" también puede manifestarse por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos descritos en el presente documento en prevenir en primer lugar la aparición de tumores

El tratamiento puede ser cualquier tratamiento y terapia, ya sea de un ser humano o un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en el que se consigue algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición o el retraso del progreso de la afección, e incluye una reducción de la velocidad de progreso, una detención en la velocidad de progreso, mejora de la afección, la cura o la remisión (ya sea parcial o total) de la afección, prevenir, retrasar, mitigar o detener uno o más síntomas y/o signos de la afección o la prolongación de la supervivencia de un individuo o paciente más allá de lo esperado en ausencia de tratamiento.

El tratamiento también puede ser profiláctico (es decir, profilaxis). Por ejemplo, un individuo susceptible o en riesgo de aparición o reaparición de cáncer puede ser tratado como se describe en el presente documento. Dicho tratamiento puede prevenir o retrasar la aparición o reaparición de cáncer en el individuo.

En particular, el tratamiento puede incluir la inhibición del crecimiento del cáncer, incluyendo la remisión completa del cáncer y/o la inhibición de la metástasis del cáncer. El crecimiento del cáncer generalmente se refiere a uno cualquiera de una serie de índices que indican un cambio dentro del cáncer a una forma más desarrollada. Por lo tanto, los índices para medir una inhibición del crecimiento del cáncer incluyen una disminución de la supervivencia de las células cancerosas, una disminución del volumen o la morfología del tumor (por ejemplo, determinada usando tomografía computarizada (TC), sonografía u otro método de formación de imágenes), un retraso en el crecimiento tumoral, una destrucción de la vasculatura tumoral, una mejora del rendimiento en el ensayo de hipersensibilidad cutánea retardada, un aumento de la actividad de las células T y una disminución de los niveles de antígenos tumorales específicos. La administración de células T modificadas como se describe en el presente documento puede mejorar la capacidad del individuo para resistir el crecimiento del cáncer, en particular el crecimiento de un cáncer ya presente en el sujeto y/o para disminuir la propensión al crecimiento del cáncer en el individuo.

Las células T o la composición farmacéutica que comprende las células T pueden administrarse a un sujeto por cualquier vía de administración conveniente, ya sea sistémicamente/periféricamente o en el sitio de la acción deseada, incluyendo, pero sin limitación, parenteral, por ejemplo, mediante infusión. La infusión implica la administración de las células T en una composición adecuada a través de una aguja o catéter. Normalmente, Las células T se infunden por vía intravenosa o subcutánea, aunque las células T pueden infundirse a través de otras vías no orales, tal como inyecciones intramusculares y vías epidurales. Las técnicas de infusión adecuadas se conocen en la técnica y se usan comúnmente en terapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med., 319:1676, 1988).

Normalmente, el número de células administradas es de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{10} por kg de peso corporal, normalmente 2×10^8 a 2×10^{10} células por individuo, normalmente durante el transcurso de 30 minutos, repitiendo el tratamiento según sea necesario, por ejemplo, a intervalos de días a semanas. Se apreciará que las dosificaciones apropiadas de las células TCR $\alpha\beta^+$, y las composiciones que comprenden las células TCR $\alpha\beta^+$, pueden variar entre pacientes. La determinación de la dosificación óptima generalmente implicará el equilibrio del nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales de los tratamientos de la presente invención. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores que incluyen, pero sin limitación, la actividad de las células particulares, síndrome de liberación de citocinas (SLC), la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de pérdida o inactivación de las células, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación, y la edad, el sexo, el peso, la condición, salud general y los antecedentes médicos previos del paciente. La cantidad de células y la vía de administración quedarán en última instancia a discreción del médico, aunque será generalmente la dosificación para conseguir concentraciones locales en el sitio de acción que consiguen el efecto deseado sin causar efectos secundarios dañinos o perjudiciales considerables.

Mientras que las células T pueden administrarse solas, en algunas circunstancias, las células T pueden administrarse en combinación con el antígeno diana, APC que presentan el antígeno diana, perlas de CD3/CD28, IL-2, IL-7 y/o IL15 para promover la expansión *in vivo* de la población de células T.

La población de células T puede administrarse en combinación con una o más terapias distintas, tal como citocinas, por ejemplo, IL-2, quimioterapia con CD4+ CD8+, radiación y agentes inmunooncológicos, incluyendo inhibidores del punto de control, tal como anticuerpos anti-B7-H3, anti-B7-H4, anti-TIM3, anti-KIR, anti-LAG3, anti-PD-1, anti-PD-L1 y

anti-CTLA4.

La otra o más terapias distintas pueden administrarse por cualquier medio conveniente, preferiblemente en un sitio que está separado del sitio de administración de las células T.

5 La administración de células T pueden efectuarse en una dosis, de forma continua o intermitente (por ejemplo, en dosis divididas a intervalos adecuados) durante el transcurso del tratamiento. Los métodos para determinar los medios y dosificaciones de administración más eficaces son bien conocidos para los expertos en la materia y variarán con la formulación utilizada para la terapia, la finalidad de la terapia, la célula diana a tratar y el sujeto que se va a tratar. Las administraciones únicas o múltiples pueden llevarse a cabo con el nivel de dosis y el patrón a seleccionar por el médico encargado. Preferiblemente, las células T se administran en una única transfusión de al menos 1×10^9 células T.

15 Otros aspectos y realizaciones de la invención proporcionan los aspectos y realizaciones descritos anteriormente con la expresión "que comprende" reemplazada por la expresión "que consiste en" y los aspectos y realizaciones descritos anteriormente con la expresión "que comprende" reemplazada por la expresión "que consiste esencialmente en". Cuando se utiliza en el presente documento, "y/o" debe interpretarse como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados, con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" ha de interpretarse como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno de ellos se estableciera individualmente en el presente documento.

20 **Parte experimental**

Las células T se expusieron a 0,25 mg/ml, 1 mg/ml o 4 mg/ml de poloxámero en el día 0 o el día 1 y después se transduce con un vector lentiviral que codifica un MAGE-A10, NY-ESO-1 o MAGE-A4 TCR. La eficiencia de transducción se determinó usando análisis de flujo para identificar la proporción de células CD3+ en la población. Para todos los TCR, se demostró que la presencia de poloxámero aumenta la eficiencia de transducción (Figura 1). Además, se encontró que la exposición con poloxámero en el día 0 mejoraba la eficiencia de transducción en relación con la exposición a poloxámero en el día 1 (Figura 1). También se encontró que la eficiencia de transducción aumenta con el aumento de la concentración de poloxámero (Figura 1).

30 El número de células T transducidas se determinó en el día 7 después de la transducción en el día 1 por lentivirus en presencia o ausencia de 1 mg/ml de poloxámero F108 con o sin lavado celular en el día 4. Se descubrió que el lavado celular en el día 4 era necesario para una expansión celular óptima (Figura 2).

35 Se determinó el efecto sobre la eficiencia de la transducción lentiviral de exponer células T al poloxámero F108. Se encontró que la eficiencia de transducción aumentó en el día 1 - 6 horas (día 0 + 18 horas) de exposición y aumentó adicionalmente en el día 0 de exposición en relación con la exposición del día 1 (Figura 3).

40 Se investigó la eficiencia de la transducción lentiviral de exponer células precursoras hemogénicas CD34+ diferenciadas a partir de hiPSC. Se encontró que los TCR específicos de un péptido restringido por HLA-A2 de MAGE-A4 se expresaban de manera eficiente en células T diferenciadas a partir de las células precursoras hemogénicas CD34+ (Figura 5). También se descubrió que los TCR activos se expresaban de manera eficiente en células T reguladoras preparadas de acuerdo con los métodos expuestos en el documento WO/2018/185166.

45 Se descubrió que el poloxámero F108 provoca un aumento en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) de la superficie celular (Figura 6A y 6B). Cuando se combinó con la activación de CD3/CD28, el poloxámero F108 no afectó al número de células que expresan LDL-R. Sin embargo, se observó que el poloxámero F108 aumenta la cantidad de LDL-R por célula, medida por la intensidad de fluorescencia media (MFI).

50 Aunque sin el deseo de limitarse a teoría alguna, LDL-R es el sitio de unión principal para virus pseudotipificados con VSV-G (Amirache et al. Blood 2014:123 1422-1424) y el tiempo de preincubación permite una expresión mejorada en la superficie celular de este receptor dando como resultado el aumento en la transducción. Este fenómeno de aumento de LDL-R en superficie es sorprendente ya que se ha notificado que el poloxámero regula por disminución LDL-R in vivo (Leon et al., Pharm Res 2006 23(7), 1597-1607).

55

REIVINDICACIONES

1. Un método de transducción de células de mamífero que comprende:
 - 5 (i) exponer una población de células de mamífero a un poloxámero en ausencia de un vector lentiviral durante 6 horas o más para producir una población de células de mamífero cebadas por transducción y
 - (ii) exponer la población de células de mamífero cebadas por transducción a un vector lentiviral, de modo que las células de mamífero se transducen con el vector lentiviral; y
 - 10 (iii) separar del poloxámero las células de mamífero transducidas,

en donde el vector lentiviral es un vector lentiviral pseudotipificado con VSV-G.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la población de células de mamífero se expone al poloxámero en ausencia del vector lentiviral durante 12 horas o más para producir la población de células de mamífero cebadas por transducción.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la población de células de mamífero se expone al poloxámero en ausencia de un vector lentiviral durante aproximadamente 24 horas para producir la población de células de mamífero cebadas por transducción.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células de mamífero transducidas se separan del poloxámero después de 48 a 96 horas de exposición al vector lentiviral.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las células de mamífero transducidas se separan del poloxámero después de aproximadamente 72 horas de exposición al vector lentiviral.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el poloxámero tiene un peso molecular promedio de 10,0 kDa a 15 kDa.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el poloxámero es el poloxámero 407 o el poloxámero 338.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la población de células de mamífero se expone al poloxámero cultivando las células de mamífero en un medio de cebado que comprende el poloxámero.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el medio de cebado comprende de 10 µg/ml a 100 mg/ml de poloxámero.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el vector lentiviral comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno heterólogo.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde las células de mamífero transducidas expresan el receptor de antígeno heterólogo.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde el receptor de antígeno heterólogo es un receptor de antígeno quimérico (CAR).
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde el receptor de antígeno heterólogo es un receptor de células T (TCR).
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el TCR heterólogo está restringido por HLA-A*02 y/o un TCR de afinidad mejorada.
15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde el receptor de antígeno heterólogo se une a un antígeno tumoral o antígeno asociado a tumor.
16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el receptor de antígeno heterólogo se une a alfa-fetoproteína (AFP), NY-ESO1, MAGE-A10 o MAGE-A4.
17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde
 - (i) la población de células de mamífero se expone al vector lentiviral cultivando las células de mamífero en un medio de transducción que comprende el vector lentiviral,
 - (ii) el medio de transducción comprende además el poloxámero, y/o
 - 65 (iii) las células de mamífero se cultivan en el medio de transducción durante 1 a 4 días.

ES 2 994 576 T3

18. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende aislar o purificar la población de células de mamífero transducidas.
- 5 19. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la población de células de mamífero transducidas se aísla de la población mediante clasificación de células activadas por fluorescencia.
20. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende expandir la población de células de mamífero transducidas y/o concentrar la población de células de mamífero transducidas.
- 10 21. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende almacenar la población de células de mamífero transducidas y/o formular la población de células de mamífero transducidas con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 22. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células de mamífero son células T.
23. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde las células de mamífero son células progenitoras capaces de diferenciación en células T.
- 20 24. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde las células progenitoras son iPSC, células mesodérmicas, células endoteliales hemogénicas, células progenitoras hematopoyéticas o células T progenitoras.

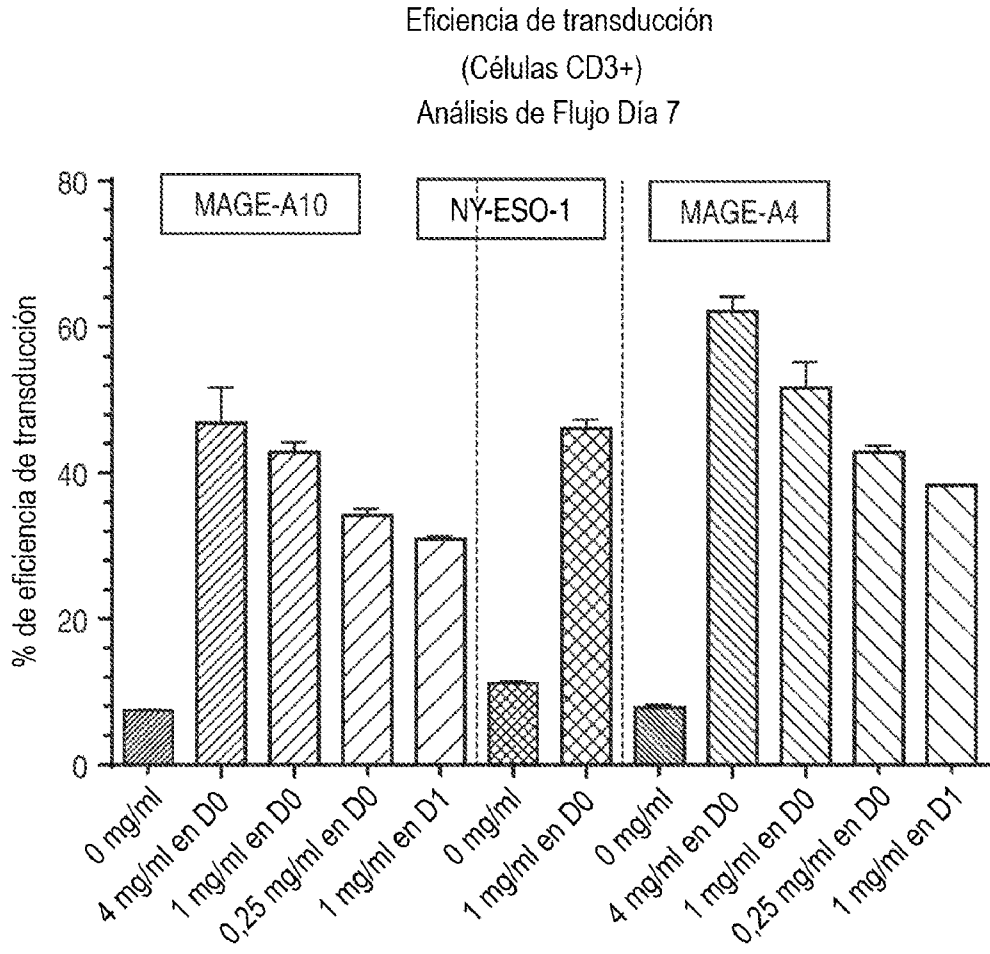


FIG. 1

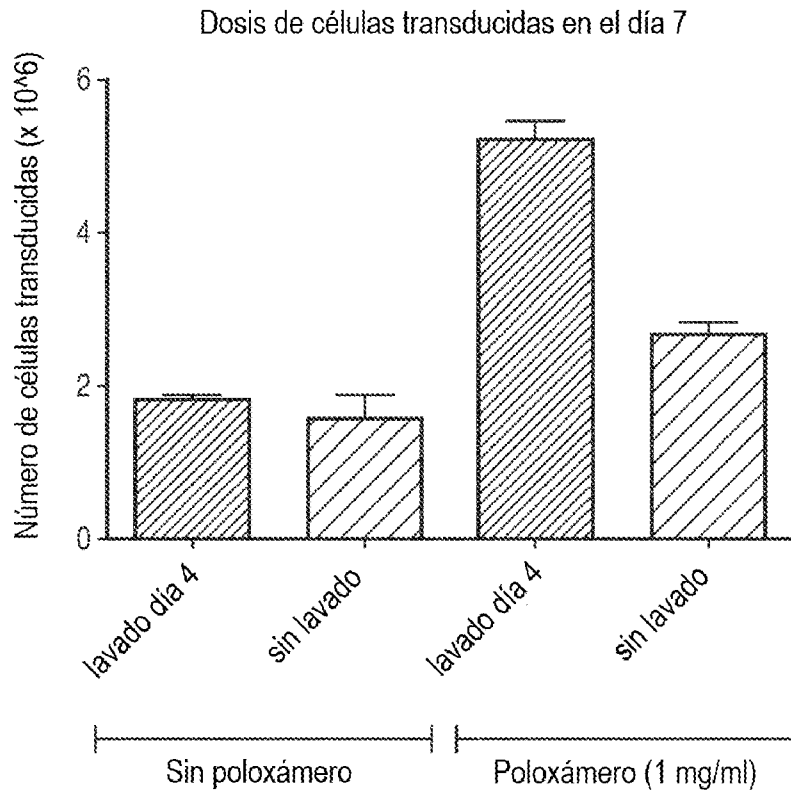


FIG. 2

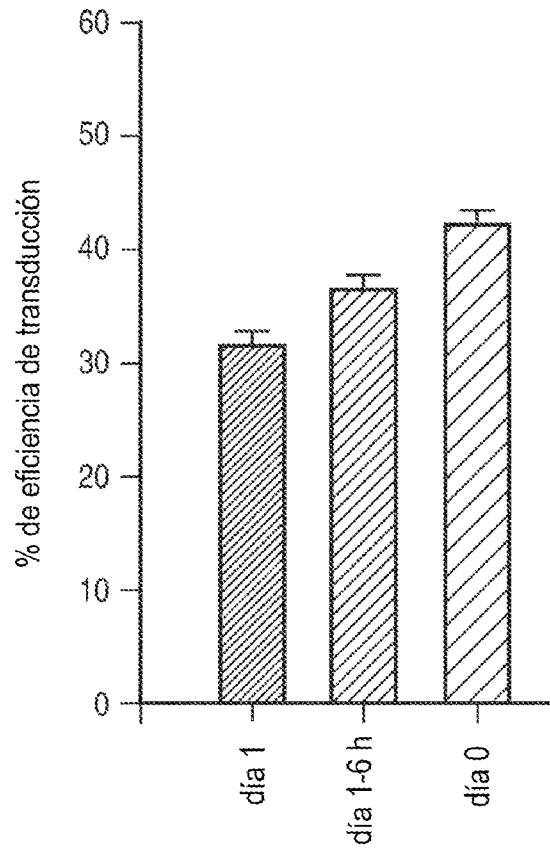


FIG. 3

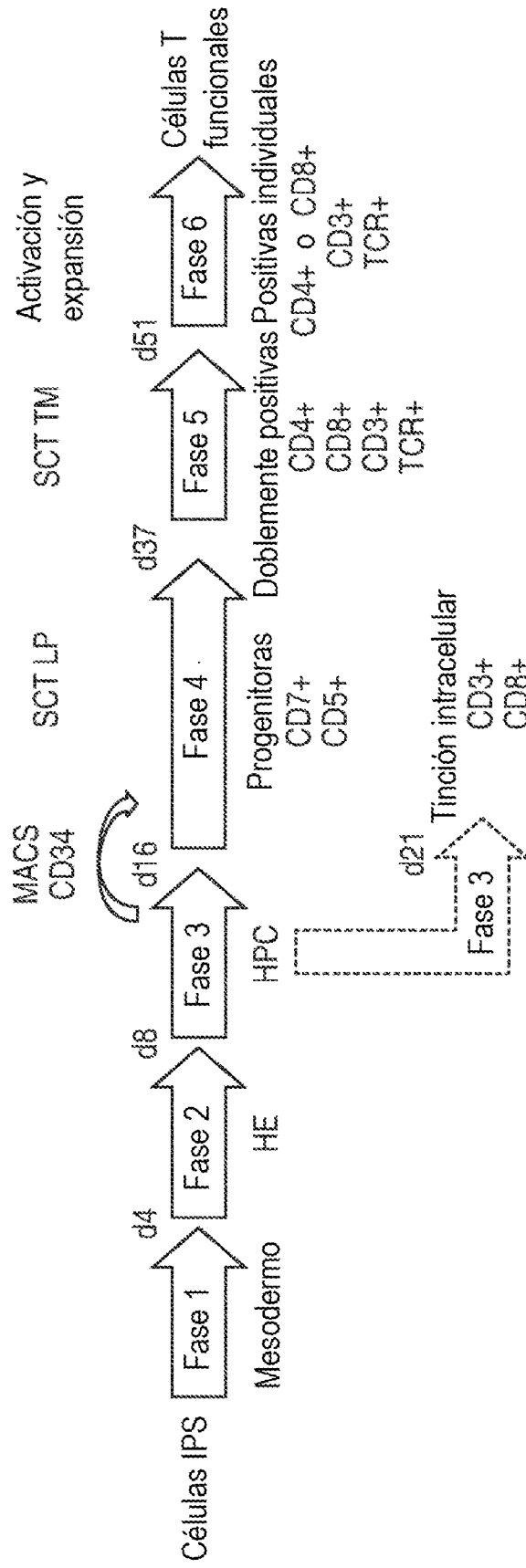


FIG. 4

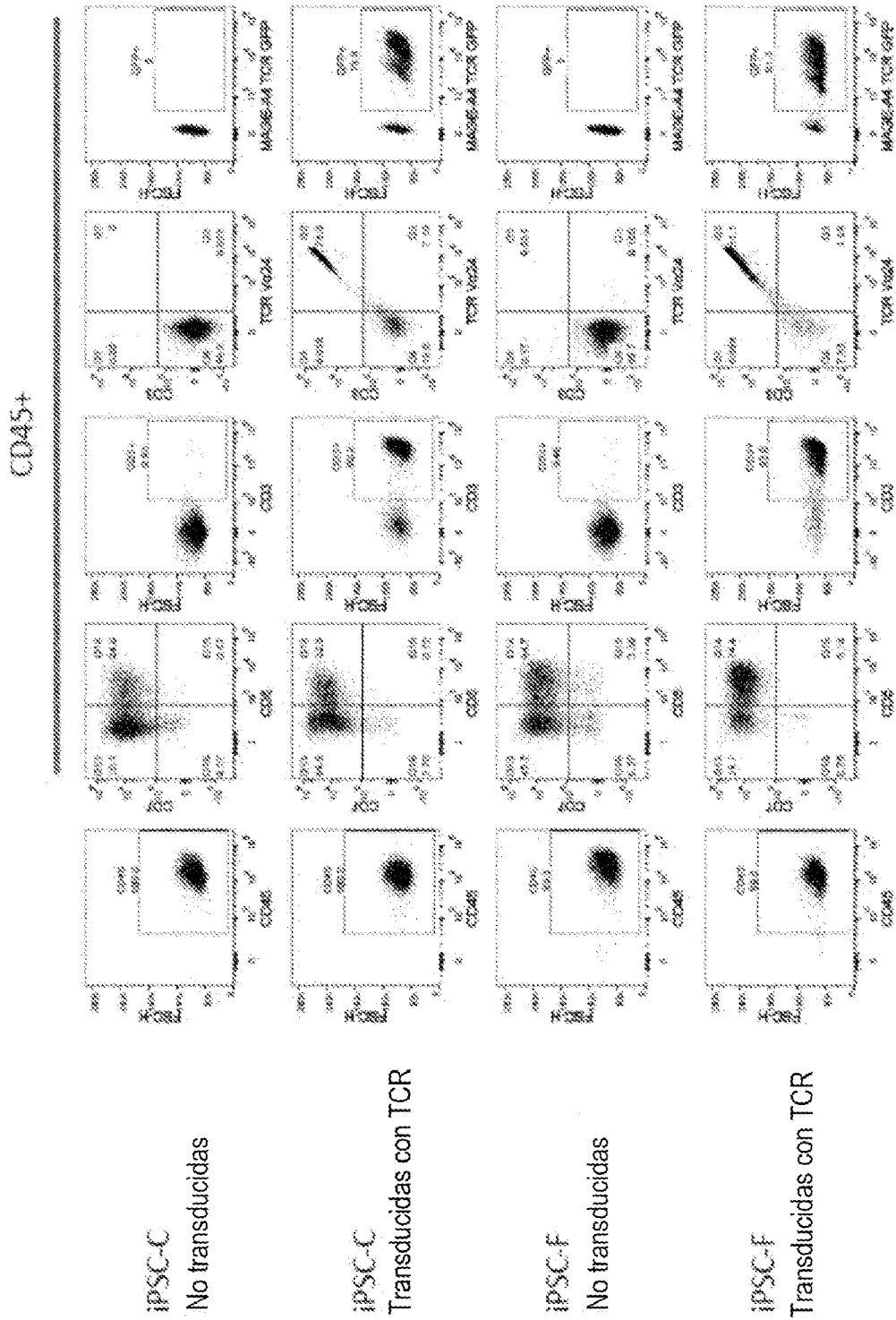


FIG. 5

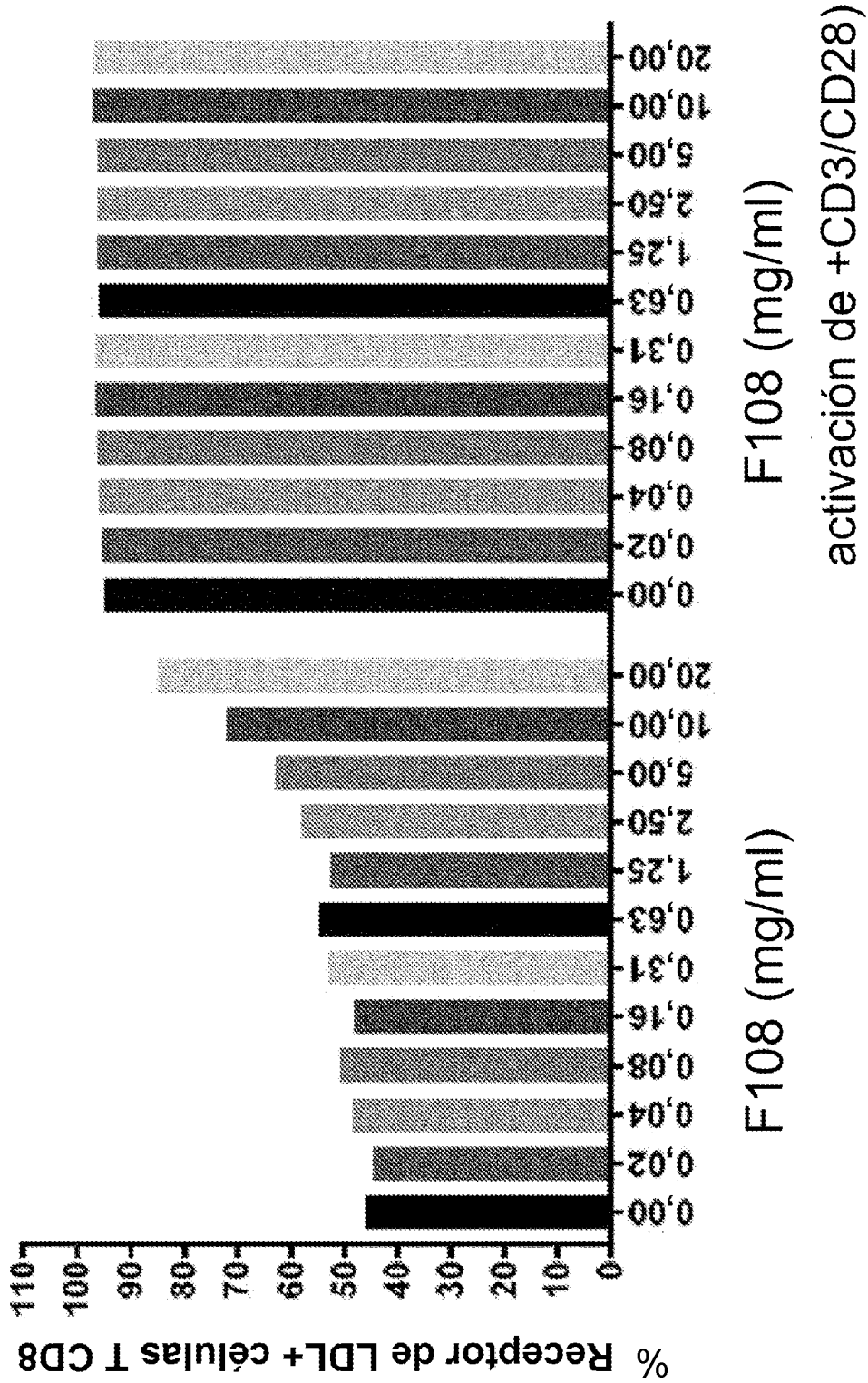


FIG. 6A

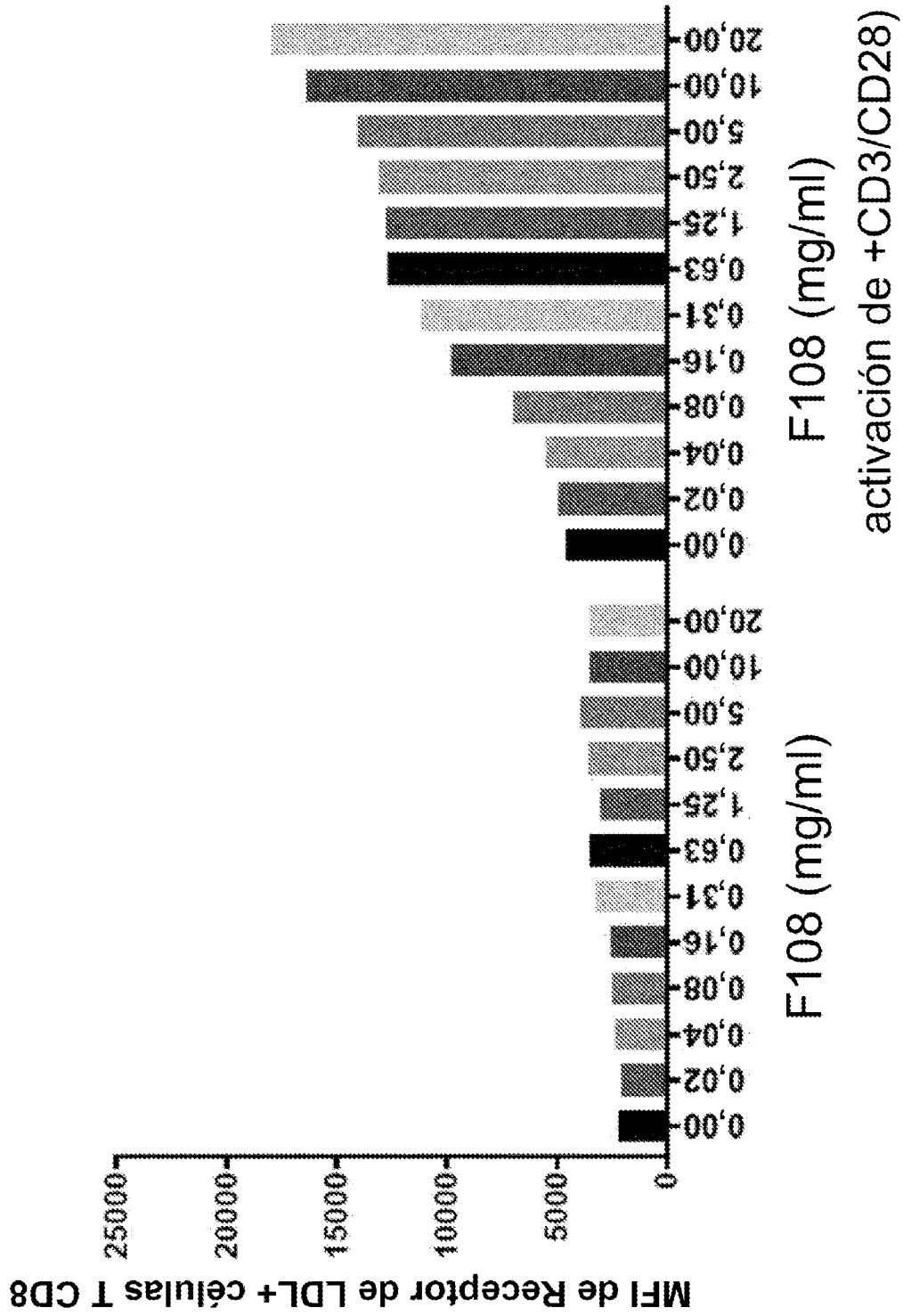


FIG. 6B