

MÉTODO PARA PRODUCIR LINFOCITOS CITOLÍTICOS NATURALES A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 **[0001]** La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional estadounidense n.º 62/983 511, presentada el 28 de febrero de 2021, cuya descripción se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

- 10 **[0002]** Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son linfocitos citotóxicos del sistema inmunitario. Las células NK son citotóxicas contra células cancerosas, infectadas por patógenos y dañadas de otro modo. Las células NK son células linfoides innatas (ILC), específicamente linfocitos citotóxicos granulares grandes que unen los grupos innato y adaptativo de la respuesta inmunitaria. Estas constituyen el 10-15% de los linfocitos circulantes en la sangre periférica. Las células NK también exhiben el nivel más alto de actividad citotóxica dentro del sistema
- 15 inmunitario. Por lo tanto, la funcionalidad o los valores alterados de las células NK afectan el funcionamiento del sistema inmunitario contra las infecciones y el cáncer.

- [0003]** Las células NK carecen de receptores de antígenos de superficie celular específicos. Debido a esto, las células NK pueden destruir células cancerosas e infectadas por patógenos sin una sensibilización previa, lo que las convierte en parte de la respuesta
- 20 inmunitaria innata. También cumplen una función en la inmunovigilancia tumoral al influir directamente en la respuesta inmunitaria adaptativa. Estas características y otras hacen de las células NK un tipo celular particularmente atractivo para su uso en terapias celulares adoptivas.

- [0004]** Se han descrito varios protocolos para obtener células NK a partir de células progenitoras. Sin embargo, los protocolos descritos anteriormente son laboriosos y requieren
- 25 múltiples pasos que consumen mucho tiempo, incluidos los pasos de aislamiento celular, lo que a su vez aumenta el tiempo y el costo de producción de las células NK.

COMPENDIO

- [0005]** La presente solicitud proporciona, entre otras cosas, métodos mejorados para producir células inmunitarias CD56+/CD3- (es decir, células NK o similares a NK). Esta
- 30 aplicación se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de una producción robusta y eficiente de células inmunitarias CD56+/CD3- de una población celular de una masa

l derivada de células madre pluripotentes (p. ej., células madre pluripotentes inducidas (iPSC)) sin necesidad de un paso de aislamiento celular. Antes de la presente solicitud, los métodos para inducir células NK a menudo requerían el aislamiento de tipos de células particulares basados en linajes celulares conocidos para células NK. Como se describe en el presente documento, esta solicitud muestra inesperadamente que las células NK se pueden derivar con éxito de una población de células de una masa sin requerir el aislamiento de ningún tipo de célula en función de los linajes. Por lo tanto, este método tiene numerosos beneficios con respecto a los métodos existentes de producción de células NK, que incluyen, por ejemplo, la capacidad de aumentar a escala y producir grandes cantidades de células NK de manera eficiente en términos de costo y tiempo. Por lo tanto, la presente invención representa un avance significativo en el campo de la terapia celular.

[0006] Las células CD56+/CD3- derivadas de iPSC (a las que también se hace referencia en el presente documento como «células iNK») producidas por los métodos descritos en el presente documento son funcionales y pueden modificarse genéticamente más, como mediante la introducción de CAR para dirigirse a poblaciones de células específicas.

[0007] En algunos aspectos, se proporciona un método para producir células NK derivadas de células madre pluripotentes que comprende: (A) proporcionar una población de células de una masa que comprende células progenitoras hematopoyéticas (HPC) (masa de células HP) derivadas de células madre pluripotentes, (B) cultivar la masa de células HP en uno o más medios de cultivo para producir células CD56+/CD3-, en donde el método no incluye un paso de aislamiento celular.

[0008] En algunas modalidades, el método no incluye un paso de aislamiento celular en el paso (A) y (B).

[0009] En algunas modalidades, la masa de células HP en (A) comprende células CD34+.

[0010] En algunas modalidades, el 20 % o más de las células en la masa de células HP son células CD34+.

[0011] En algunas modalidades, entre el 20 % y el 90 % de la masa de células HP son células CD34+. Por ejemplo, en algunas modalidades, alrededor del 30 % de la masa de células HP son células CD34+. En algunas modalidades, alrededor del 40 % de la masa de células HP son células CD34+. En algunas modalidades, alrededor del 50% de la masa de células HP son células CD34+. En algunas modalidades, alrededor del 60% de la masa de células HP son

células CD34+. En algunas modalidades, alrededor del 70% de la masa de células HP son células CD34+. En algunas modalidades, alrededor del 80% de la masa de células HP son células CD34+. En algunas modalidades, alrededor del 90% de la masa de células HP son células CD34+. En algunas modalidades, más del 70% de la masa de células HP son células CD34+.

[0012] En algunas modalidades, el paso (B) comprende (i) cultivar la masa de células HP en medios de inducción de CD4/CD8 para generar una población celular heterogénea intermedia que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8- y CD4+/CD8+; y (ii) cultivar la población de células heterogéneas intermedias en medios de inducción de NK para producir las células CD56+/CD3-.

[0013] En algunas modalidades, el paso (A) comprende cultivar células madre pluripotentes en medios de inducción de HPC para producir una masa de células HP.

[0014] En algunas modalidades, las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

[0015] En algunas modalidades, los medios de inducción de HPC comprenden al menos un compuesto, o cualquier combinación de compuestos, seleccionado de proteína 4 morfogenética ósea (BMP4), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), ácido ascórbico, ligando Flt3 (Flt3L), trombopoyetina (TPO) e inhibidor de TGFβ.

[0016] En algunas modalidades, los medios de inducción de HPC comprenden BMP4 en una concentración de entre 5 ng/mL y 500 ng/ml.

[0017] En algunas modalidades, la BMP4 se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.

[0018] En algunas modalidades, el medio de inducción de HPC comprende VEGF en una concentración de entre 5 ng/ml y 500 ng/ml.

[0019] En algunas modalidades, el VEGF se encuentra presente en una concentración de alrededor de 50 ng/ml.

[0020] En algunas modalidades, el medio de inducción de HPC comprende bFGF en una concentración de entre 5 ng/ml y 500 ng/ml.

[0021] En algunas modalidades, la bFGF se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.

- [0022]** En algunas modalidades, los medios de inducción de HPC comprenden ácido ascórbico en una concentración de entre 5 µg/ml y 500 µg/ml.
- [0023]** En algunas modalidades, el ácido ascórbico se encuentra presente en una concentración de 50 µg/ml.
- 5 **[0024]** En algunas modalidades, el medio de inducción de HPC comprende Flt3L en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml.
- [0025]** En algunas modalidades, la Flt3L se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.
- [0026]** En algunas modalidades, el medio de inducción de HPC comprende TPO en una
10 concentración de entre 1 ng/ml y 200 ng/ml.
- [0027]** En algunas modalidades, la TPO se encuentra presente en una concentración de 100 ng/ml.
- [0028]** En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende al menos un compuesto, o cualquier combinación de compuestos, seleccionado del grupo que consiste
15 en ácido ascórbico, factor de células madre (SCF), IL-7, Flt3L, trombopoyetina (TPO), inhibidor de p38 y SDF-1. En consecuencia, en algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende ácido ascórbico. En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende SCF. En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende IL-7. En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende Flt3L. En algunas
20 modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende TPO. En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende inhibidor de p38. En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende SDF-1. En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende inhibidor de p38 y SDF-1.
- [0029]** En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende ácido
25 ascórbico en una concentración de entre 5 µg/ml y alrededor de 500 µg/ml.
- [0030]** En algunas modalidades, el ácido ascórbico se encuentra presente en una concentración de 50 µg/ml.
- [0031]** En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende SCF en una concentración de entre 5 ng/ml y 100 ng/ml.
- 30 **[0032]** En algunas modalidades, el SCF se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.

- [0033]** En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende IL-7 en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml.
- [0034]** En algunas modalidades, la IL-7 se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.
- 5 **[0035]** En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende Flt3L en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml.
- [0036]** En algunas modalidades, el Flt3L se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml de Flt3L.
- [0037]** En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende TPO en
10 una concentración de entre 1 ng/ml y 200 ng/ml.
- [0038]** En algunas modalidades, la TPO se encuentra presente en una concentración de 100 ng/ml.
- [0039]** En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende el inhibidor de p38 en una concentración de entre 0,5 μ M y 100 μ M.
- 15 **[0040]** En algunas modalidades, el inhibidor de p38 es SB203580. En algunas modalidades, el inhibidor de p38 es BIRB 796. En algunas modalidades, el inhibidor de p38 es VX-702. En algunas modalidades, el inhibidor de p38 es SB239063. En algunas modalidades, el inhibidor de p38 es SB202190. En algunas modalidades, el inhibidor de p38 es BMS 582949.
- [0041]** En algunas modalidades, el SB203580 se encuentra presente en una
20 concentración de 15 μ M.
- [0042]** En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende inhibidor de SDF-1 en una concentración de entre 10 ng/ml y alrededor de 100 ng/ml.
- [0043]** En algunas modalidades, el inhibidor de SDF-1 se encuentra presente en una concentración de 30 nM.
- 25 **[0044]** En algunas modalidades, el inhibidor de SDF-1 se encuentra presente en una concentración de 30 nM y el inhibidor de p38, por ejemplo, SB203580, se encuentra presente en una concentración de 15 μ M.
- [0045]** En algunas modalidades, el medio de inducción de NK comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un activador de CD3, IL-2 e IL7. Por
30 consiguiente, en algunas modalidades, el medio de inducción de NK comprende el activador de CD3. En algunas modalidades, el medio de inducción de NK comprende IL-2. En algunas

modalidades, el medio de inducción de NK comprende IL-7.

[0046] En algunas modalidades, el medio de inducción de NK comprende IL-2 en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml.

[0047] En algunas modalidades, la IL-2 se encuentra presente en una concentración de 10 ng/ml.

[0048] En algunas modalidades, el medio de inducción de NK comprende IL-7 en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml.

[0049] En algunas modalidades, la IL-7 se encuentra presente en una concentración de 10 ng/ml.

[0050] En algunas modalidades, cada uno de los pasos de cultivo se realiza en alrededor del 5% de oxígeno.

[0051] En algunas modalidades, cada uno de los pasos de cultivo se realiza en alrededor del 14% de oxígeno.

[0052] En algunas modalidades, cada uno de los pasos de cultivo se realiza en una atmósfera de oxígeno.

[0053] En algunas modalidades, cada uno de los pasos de cultivo se realiza en menos del 5% de oxígeno.

[0054] En algunas modalidades, el cultivo de células madre pluripotentes en el medio de células de una masa para obtener masas de células HP dura más de 10 días.

[0055] En algunas modalidades, el cultivo de células madre pluripotentes en el medio de células de una masa para obtener masas de células HP dura entre 11 y 15 días.

[0056] En algunas modalidades, el cultivo de células madre pluripotentes en el medio de células de una masa para obtener masas de células HP dura 14 días.

[0057] En algunas modalidades, las iPSC se obtienen a partir de células mononucleares de sangre periférica.

[0058] En algunas modalidades, al menos alrededor del 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o más de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento, por ejemplo, sin un paso adicional de clasificación, aislamiento o purificación de células CD56+/CD3-. En consecuencia, en algunas modalidades, al menos alrededor del 50 % o más de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento. En algunas modalidades, al menos alrededor del 55% o más de las células producidas son

células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento. En algunas modalidades, al menos alrededor del 60% o más de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento. En algunas modalidades, al menos alrededor del 65% o más de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento. En algunas modalidades, al menos alrededor del 70% o más de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento. En algunas modalidades, al menos alrededor del 75% o más de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento. En algunas modalidades, al menos alrededor del 80% o más de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento. En algunas modalidades, al menos alrededor del 85% o más de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento. En algunas modalidades, al menos alrededor del 90% o más de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento. En algunas modalidades, al menos alrededor del 95% o más de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento. En algunas modalidades, al menos alrededor del 97% o más de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento.

[0059] En algunas modalidades, menos de alrededor del 25%, 20%, 15%, 10% o 5% de las células producidas son células CD3+.

[0060] En algunas modalidades, el fenotipo de las células producidas se puede determinar por diversos medios en la técnica. Por ejemplo, el fenotipo de las células producidas se puede determinar mediante citometría de flujo o secuenciación de ARN de una sola célula (scRNAseq).

[0061] En algunas modalidades, el porcentaje de células producidas se determina mediante citometría de flujo. En algunas modalidades, el porcentaje de células producidas se determina mediante scRNAseq.

[0062] En algunas modalidades, el método comprende además un paso de aislar células CD56+/CD3-.

[0063] En algunas modalidades, las células CD56+/CD3- se aíslan mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o clasificación magnética. En consecuencia, en algunas modalidades, las células se aíslan mediante FACS. En algunas modalidades, las células se aíslan mediante clasificación magnética (MACS).

[0064] En algunas modalidades, las células inmunitarias CD56+/CD3- son células NK.

- [0065]** En algunas modalidades, las células CD56+/CD3- se modifican genéticamente para expresar uno o más regiones de antígenos quiméricos (CAR).
- [0066]** En algunas modalidades, las células CD56+/CD3- aisladas se modifican genéticamente para expresar uno o más regiones de antígenos quiméricos (CAR).
- 5 **[0067]** En algunas modalidades, el antígeno es CD19.
- [0068]** En algunas modalidades, las células se modifican genéticamente de forma adicional para expresar el complejo IL-15R α /IL-15.
- [0069]** En algunos aspectos, se proporciona un método para producir células CD56+/CD3- derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) que comprende los
- 10 siguientes pasos: (1) cultivar de iPSC en medios de inducción de HPC que comprenden al menos un compuesto seleccionado de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y ácido ascórbico para obtener una población heterogénea de células que comprende células progenitoras hematopoyéticas (HPC) (masa de células HP); (2) cultivar la masa de células HP obtenido en (1) en medios de inducción de
- 15 CD4/CD8 que comprenden uno o más de ácido ascórbico, inhibidor de p38 y SDF-1 para obtener una población de células heterogénea intermedia; y (3) cultivar la población de células heterogénea intermedia de (2) en medios de inducción de NK que comprenden al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un activador de CD3, IL-2 e IL-7.
- [0070]** En algunos aspectos, se proporciona una población de células NK, la población
- 20 producida usando un método descrito en este documento.
- [0071]** En algunos aspectos, se proporciona una población de células sin clasificar, la población comprende células CD56+/CD3- derivadas de células madre pluripotentes en una relación de no menos del 60% del total de células inmunitarias CD56+ derivadas de células madre pluripotentes.
- 25 **[0072]** En algunas modalidades, menos del 25 % de las células son células CD3+.
- [0073]** En algunas modalidades, menos del 5% de las células son monocitos.
- [0074]** En algunas modalidades, menos del 5% de la masa de células corresponde a linfocitos B.
- [0075]** En algunos aspectos, se proporciona un método para tratar a un sujeto que
- 30 necesita terapia celular, el método comprende administrar al sujeto las células NK descritas en el presente documento.

- [0076]** En algunas modalidades, el sujeto tiene un cáncer.
- [0077]** En algunas modalidades, el cáncer es leucemia o linfoma.
- [0078]** En algunos aspectos, se proporciona un método para producir células inmunitarias CD56+/CD3- derivadas de células madre pluripotentes, dicho método comprende el paso de (I) cultivar una célula madre pluripotente en uno o más medios de cultivo para producir células inmunitarias CD56+/CD3-.
- [0079]** En algunas modalidades, el paso (I) comprende: (A) cultivar una célula madre pluripotente en un medio de cultivo para producir células progenitoras hematopoyéticas (HPC) (masa de células HP) y (B) cultivar las células obtenidas en el paso (A) en un medio de cultivo para producir células inmunitarias CD56+/CD3-.
- [0080]** En algunas modalidades, el paso (B) comprende: (a) cultivar las células obtenidas en el paso (A) en un medio de cultivo para producir una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8 y (b) cultivar las células obtenidas en el paso (a) en un medio de cultivo para producir células inmunitarias CD56+/CD3-.
- [0081]** En algunas modalidades, ninguno de los pasos anteriores comprende realizar un paso de aislamiento de una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8.
- [0082]** En algunas modalidades, las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (iPSC).
- [0083]** En algunos aspectos, se proporciona un método para producir células inmunitarias CD56+/CD3-, dicho método comprende el paso de (II) cultivar células que comprenden células progenitoras hematopoyéticas (HPC) (masa de células HP) en un medio de cultivo para producir células inmunitarias CD56+/CD3-.
- [0084]** En algunas modalidades, el paso (II) comprende: (X) cultivar células que comprenden células progenitoras hematopoyéticas (HPC) en un medio de cultivo para producir células con doble positivo CD4/CD8; y (Y) cultivar las células obtenidas en el paso (X) en un medio de cultivo para producir células inmunitarias CD56+/CD3-.
- [0085]** En algunas modalidades, el paso (II) no comprende realizar un paso de aislamiento de células con doble positivo CD4/CD8.
- [0086]** En algunas modalidades, el paso (A) comprende un medio de cultivo con al menos un compuesto seleccionado de proteína 4 morfogenética ósea (BMP4), factor de crecimiento

endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), ácido ascórbico, ligando Flt3 (Flt3L), trombopoyetina (TPO) e inhibidor de TGFβ.

[0087] En algunas modalidades, el paso (a) o el paso (X) comprende un medio de cultivo que tiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, factor de células madre (SCF), IL-7, Flt3L, trombopoyetina (TPO), inhibidor de p38 y SDF-1.

[0088] En algunas modalidades, el paso (b) o el paso (Y) comprende un medio de cultivo que tiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un activador de CD3, IL-2 e IL7.

[0089] En algunas modalidades, el método comprende además cultivar células producidas después del paso (b) o el paso (Y) en un medio de cultivo que comprende IL-7 y/o IL-15.

[0090] En algunas modalidades, el cultivo se realiza en alrededor del 5% de oxígeno. En algunas modalidades, el paso (A) dura alrededor de 10 días. En otra modalidad, el paso (A) dura alrededor de 10-18 días.

[0091] En algunas modalidades, las iPSC se producen a partir de células mononucleares de sangre periférica.

[0092] En algunas modalidades, al menos alrededor del 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% de las células producidas son células CD56+/CD3-.

[0093] En algunas modalidades, menos del alrededor de 25 % de las células son células CD3+.

[0094] En algunas modalidades, el método comprende además un paso de aislamiento de células CD56+/CD3-.

[0095] En algunas modalidades, las células CD56+/CD3- se aíslan mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0096] En algunas modalidades, las células inmunitarias CD56+ son CD56+/CD3-.

[0097] En algunas modalidades, cualquier HPC pluripotente, multipotente o derivada del paciente puede usarse con los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, en algunas modalidades, la célula es una célula madre embrionaria. En algunas modalidades, la célula es una célula madre adulta. Se conocen en la técnica diversas células madre adultas e incluyen, por ejemplo, células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células derivadas del cordón umbilical, células madre de la médula ósea, células madre adiposas y similares. En

algunos casos, la célula es una célula madre pluripotente inducida (iPSC). Por lo tanto, las células NK producidas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento pueden obtenerse a partir de cualquier HPC pluripotente, multipotente o derivada del paciente, como una HPC primaria derivada directamente de un donante.

- 5 **[0098]** En algunas modalidades, las células que se usan para producir las células NK descritas en el presente documento se modifican genéticamente en cualquier etapa de la diferenciación celular. En algunas modalidades, las células utilizadas para producir las células NK descritas en el presente documento se modifican genéticamente en una etapa pluripotente, multipotente o unipotente. Por ejemplo, en algunas modalidades, las células que se usan para producir las células NK descritas en la presente se modifican genéticamente en una etapa pluripotente. Por ejemplo, la célula se puede modificar genéticamente en una etapa de células madre embrionarias o en una etapa de células madre iPSC. En algunas modalidades, las células que se usan para producir las células NK descritas en la presente se modifican genéticamente en una etapa multipotente. Por ejemplo, la célula puede modificarse genéticamente en la etapa HSC.

[0099] En algunas modalidades, en donde las células se modifican genéticamente para expresar uno o más regiones de antígenos quiméricos (CAR).

[0100] En algunas modalidades, las células CD56+/CD3- aisladas se modifican genéticamente para expresar uno o más regiones de antígenos quiméricos (CAR).

- 20 **[0101]** En algunas modalidades, el antígeno es CD19.

[0102] En algunas modalidades, las células se modifican genéticamente de forma adicional para expresar el complejo IL-15R α /IL-15.

- [0103]** En algunos aspectos, se proporciona una población de células sin clasificar, la población comprende células CD56+/CD3- derivadas de células madre pluripotentes en una relación de no menos del 60% del total de células inmunitarias CD56+ derivadas de células madre pluripotentes.

[0104] En algunas modalidades, menos del 25 % de las células son células CD3+.

[0105] En algunas modalidades, menos del 5% de las células son monocitos.

- [0106]** En algunas modalidades, menos del 5% de la masa de células corresponde a linfocitos B.

[0107] En algunos aspectos, se proporciona un método para tratar a un sujeto que

necesita terapia celular y el método comprende administrar al sujeto células inmunitarias CD56+/CD3- derivadas de células madre pluripotentes de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

[0108] En algunas modalidades, el sujeto tiene cáncer.

5 **[0109]** En algunas modalidades, el cáncer es leucemia o linfoma.

[0110] Se utilizan varios medios de cultivo en los métodos descritos en este documento, incluidos, por ejemplo, medios de inducción de HPC, medios de inducción de CD4/CD8 y medios de inducción de NK.

[0111] En algunos aspectos, las células pluripotentes inducidas (iPSC) se cultivan en
 10 medios de inducción de HPC durante un período de tiempo para generar una población de células que comprende células progenitoras hematopoyéticas, se hace referencia a esta población de células en este documento como «masa de células HP». En algunas modalidades, este período de tiempo es de alrededor de 10 a 14 días. En algunas modalidades, este período de tiempo es de alrededor de 13 días. En algunas modalidades, los medios de inducción de
 15 HPC comprenden uno o más de BMP4, VEGF, bFGF, ácido ascórbico, un inhibidor de TGFβ, factor de células madre (SCF), trombopoyetina TPO y Flt3L. En algunas modalidades, las iPSC se cultivan desde el día 1 hasta alrededor del día 10 en medios de inducción de HPC que comprenden VEGF, bFGF, ácido ascórbico. En algunas modalidades, el VEGF se encuentra presente en una concentración de alrededor de 50 ng/ml. En algunas modalidades, el bFGF se
 20 encuentra presente en una concentración de alrededor de 50 ng/ml. En algunas modalidades, el ácido ascórbico se encuentra presente en una concentración de alrededor de 50 µg/ml. En algunas modalidades, las iPSC se cultivan desde el día 1 hasta alrededor del día 3 en medios de inducción de HPC que comprenden BMP4. En algunas modalidades, la BMP4 se encuentra presente en una concentración de alrededor de 50 ng/ml. En algunas modalidades, las iPSC se
 25 cultivan desde alrededor del día 2 hasta alrededor del día 3 con un inhibidor de TGFβ, como SB431542 a una concentración de alrededor de 6 µM. En algunas modalidades, entre los días 7-13 del cultivo, se añaden al cultivo uno o más factores de células madre (SCF), trombopoyetina TPO y Flt3L. En algunas modalidades, se agrega SCF en una concentración de alrededor de 50 ng/ml. En algunas modalidades, se agrega TPO en una concentración de
 30 alrededor de 30 ng/ml. En algunas modalidades, se agrega Flt3L en una concentración de alrededor de 10 ng/ml.

[0112] En algunos aspectos, la población de la masa de células HP se cultiva en medio de inducción de CD4/CD8 durante un período de tiempo para generar una población de células que comprende una población de células heterogénea intermedia que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8- y CD4+/CD8+. En algunas modalidades, la población de la masa de células HP se cultiva en medios de inducción de CD4/CD8 entre 19 y 22 días. En algunas modalidades, la población de células HP a granel se cultiva en un medio de inducción de CD4/CD8 durante alrededor de 21 días. En algunas modalidades, los medios de inducción de CD4/CD8 comprenden uno o más de ácido ascórbico, SCF, TPO, Flt3L, IL7, un inhibidor de p38 MAPKi, tal como SB203580, SDF1a. En algunas modalidades, el ácido ascórbico se encuentra presente en una concentración de alrededor de 50 µg/ml. En algunas modalidades, el SCF se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml. En algunas modalidades, la TPO se encuentra presente en una concentración de alrededor de 100 ng/ml. En algunas modalidades, la Flt3L se encuentra presente en una concentración de alrededor de 50 ng/ml. En algunas modalidades, la IL7 se encuentra presente en una concentración de alrededor de 50 ng/ml. En algunas modalidades, SB203580 se encuentra presente en una concentración de alrededor de 15 µM. En algunas modalidades, el SDF1a se encuentra presente en una concentración de alrededor de 30 nM. En algunas modalidades, la masa de células HP se cultiva en una placa de cultivo cubierta con hDLL4/RetroNectin.

[0113] En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, factor de células madre (SCF), IL-7, Flt3L, trombopoyetina (TPO), inhibidor de p38 y SDF-1. En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende inhibidor de p38. En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende SDF-1. En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende inhibidor de p38 y SDF-1.

[0114] En algunos aspectos, la población de células heterogéneas que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8- y CD4+/CD8+ se cultiva en un medio de inducción de NK durante un período de tiempo para generar una población de células que comprende células NK CD56+/CD3-. En algunas modalidades, la población de células heterogéneas se cultiva durante un período de entre alrededor de 5 y 9 días en medios de inducción de NK. En algunas modalidades, la población celular se cultiva durante alrededor de 7 días. En algunas modalidades, los medios de inducción de células NK comprenden uno o más

de IL-7, IL-2 y anticuerpo anti-CD3. En algunas modalidades, la población de células heterogénea se cultiva durante alrededor de 7 días en medios de inducción de células NK que comprenden IL-7 e IL-2. En algunas modalidades, la IL-7 se encuentra presente en una concentración de alrededor de 10 ng/ml. En algunas modalidades, la IL-2 se encuentra presente en una concentración de alrededor de 10 ng/ml. En algunas modalidades, la población heterogénea se cultiva en medios de inducción de células NK que comprenden anti-CD3 durante un período de alrededor de 3 días. En algunas modalidades, este método genera más de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células CD56+/CD3-. En consecuencia, en algunas modalidades, este método genera más del 50% de las células CD56+/CD3-. En algunas modalidades, este método genera más del 60% de las células CD56+/CD3-. En algunas modalidades, este método genera más del 70% de las células CD56+/CD3-. En algunas modalidades, este método genera más del 80% de las células CD56+/CD3-. En algunas modalidades, este método genera más del 90% de las células CD56+/CD3-. En algunas modalidades, este método genera más del 95% de las células CD56+/CD3-.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0115] La **FIG. 1** es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran los resultados del análisis de citometría de flujo de una población total de células NK que se obtuvieron usando los métodos descritos en este documento. Brevemente, las células iPS se cultivaron como se describe en este documento, sin un paso de aislamiento intermedio. Los gráficos de citometría de flujo muestran la presencia de una población de células negativas para CD3 que tienen un alto contenido de CD56 (CD56^{high}) (alrededor del 63,5 % de la población total de células NK) y una población de células CD3 negativas que tienen un contenido leve de CD56 (CD56^{dim}) (alrededor del 26,7 % de la población total de células NK). Ambas poblaciones son células NK. Por lo tanto, la población total de células NK CD56 positivas, CD3 negativas obtenida es superior al 90% de la población celular total.

[0116] En la **FIG. 2** se muestran los resultados del análisis de scRNA de una población total de células NK que se obtuvieron usando los métodos descritos en este documento. Brevemente, las células iPS se cultivaron como se describe en este documento, sin un paso de aislamiento intermedio. Las células se clasificaron en cuatro poblaciones celulares: monocitos, linfocitos B, células NK y linfocitos T. Aproximadamente el 75 % de las células de la población

total de células NK se identificaron como células NK (células CD56+/CD3-), mientras que aproximadamente el 25% de las células en la población de células de la masa se identificaron como linfocitos T. Los linfocitos T descritos en este documento pueden incluir células NKT (células CD56+/CD3+).

- 5 **[0117]** En la **FIG. 3** se muestra una serie de fotografías que muestran los resultados de un ensayo de actividad antitumoral en ratones NSG (NOD/Shi-scid, IL-2R gamma nulo) a los que se les administró luciferasa que expresan células Nalm6, seguido de la administración de células iNK-CAR19. Los ratones NSG trasplantados con células Nalm6 se trataron con (a) amortiguador PBS, (b) células iNK-CAR y se observó la eficacia antitumoral de estos
- 10 tratamientos. Los datos muestran que las células iNK-CAR redujeron la proliferación de células Nalm6.

DEFINICIONES

- [0118]** *Administración:* Como se usan en este documento, «administrar», «que se administra», «administración», «introducir» o «introducción» se usan indistintamente en el
- 15 contexto de administrar células terapéuticas, por ejemplo, células inmunitarias CD56+/CD3- derivadas de iPSC o HPC, en un sujeto, por un método o ruta que da como resultado la administración de dichas células. Se conocen varios métodos en la técnica para administrar células, incluidos, por ejemplo, por vía intravenosa, tópica, oral, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, subcutánea o transdérmica. Es posible administrar células con un vehículo o sin este.
- 20 **[0119]** *Terapia celular adoptiva:* Tal como se usan aquí de manera intercambiable, «terapia celular adoptiva», «transferencia celular adoptiva», «terapia celular» o «ACT» se refieren a la transferencia de células, por ejemplo, una población de células CD56+/CD3- generadas usando métodos descritos en el presente documento y administradas a un sujeto o paciente que lo necesite. En algunas modalidades, la célula es una inmunitaria CD56+/CD3- producida usando
- 25 un método descrito en este documento y que adicionalmente expresa un CAR.

- [0120]** *Animal:* Como se usa en la presente, el término «animal» se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas modalidades, «animal» se refiere a humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas modalidades, «animal» hace referencia a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En determinadas modalidades, el animal no
- 30 humano es un mamífero (*por ejemplo*, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado, un primate y/o un cerdo). En algunas modalidades, los

animales incluyen, de modo no taxativo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En algunas modalidades, un animal puede ser un animal transgénico, un animal modificado genéticamente y/o un clon.

[0121] *Dominio de direccionamiento específico de antígeno:* El «dominio de direccionamiento específico de antígeno» proporciona al CAR la capacidad de unirse a un antígeno objetivo de interés. En algunas modalidades, el dominio de direccionamiento específico de antígeno se dirige a un antígeno de interés clínico contra el cual sería deseable desencadenar una respuesta inmunitaria efectora que dé como resultado la destrucción del tumor. El dominio de direccionamiento específico de antígeno puede ser cualquier proteína o péptido que posea la capacidad de reconocer y unirse específicamente a una molécula biológica (p. ej., un receptor de superficie celular o proteína tumoral, o un componente de este). El dominio de direccionamiento específico de antígeno incluye cualquier compañero de unión de origen natural, sintético, semisintético o producido de forma recombinante para una molécula biológica de interés.

[0122] Los dominios de direccionamiento específicos de antígeno ilustrativos incluyen, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos o derivados de anticuerpos, dominios extracelulares de receptores, ligandos para moléculas o receptores de la superficie celular, o dominios de unión a receptores de estos, y proteínas de unión a tumores.

[0123] En algunas modalidades, el dominio de direccionamiento específico de antígeno es, o se deriva de, un anticuerpo. Un dominio de direccionamiento derivado de un anticuerpo puede ser un fragmento de un anticuerpo o un producto modificado genéticamente de uno o más fragmentos del anticuerpo, cuyo fragmento está implicado en la unión con el antígeno. Los ejemplos incluyen una región variable (Fv), una región determinante de la complementariedad (CDR), un Fab, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), una región variable de cadena pesada (VH), una región variable de cadena ligera (VL) y un anticuerpo de camélido (VHH).

[0124] En algunas modalidades, el dominio de unión es un anticuerpo monocaténario (scFv). El scFv puede ser scFv murino, humano o humanizado.

[0125] *Alogénico:* «Alogénico», como se usa en este documento, se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se le presenta el material. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más locus no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos

de la misma especie puede ser lo suficientemente diferente genéticamente para interactuar antigénicamente.

[0126] *Aproximadamente o alrededor de:* Según se usan en este documento, «aproximadamente» o «alrededor de», aplicados a uno o más valores de interés, se refieren a un valor establecido, así como a un valor similar a un valor de referencia establecido. En ciertas modalidades, «aproximadamente» o «alrededor de» se refieren a un rango de valores que se encuentra dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (mayor o menor) que el valor de referencia establecido, a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100 % de un valor posible). Se entiende que cuando se usan «alrededor de» o «aproximadamente» para modificar un valor de referencia establecido, se abarca tanto el valor de referencia establecido en sí mismo como los valores que están cerca del valor de referencia establecido a ambos lados del valor de referencia establecido.

[0127] *Ácido ascórbico o vitamina C:* Como se usan en la presente, «ácido ascórbico» o «vitamina C» significan ácido L-ascórbico y sus derivados, y «derivado de ácido L-ascórbico» significan derivados que se convierten en vitamina C por reacción enzimática en el cuerpo vivo. Los ejemplos de los derivados del ácido L-ascórbico incluyen fosfato de vitamina C, glucósido de ácido ascórbico, etilascorbilo, éster de vitamina C, tetrahexildecanoato de ascorbilo, estearato de ascorbilo y 2-fosfato 6-palmitato de ascorbilo. Los ejemplos del fosfato de vitamina C incluyen sales de fosfato de ácido L-ascórbico tales como fosfato de ácido L-ascórbico Na y fosfato de ácido L-ascórbico Mg. En una modalidad, la vitamina C puede ser 2-fosfato de ácido ascórbico.

[0128] *Población de células en masa:* Las expresiones «población de células en masa», «célula en masa» y similares se refieren a una población heterogénea de células. En algunas modalidades, la población de células en una masa comprende células hematopoyéticas. En algunas modalidades, la población de células en una masa se puede obtener a partir de células pluripotentes, por ejemplo, células madre pluripotentes inducidas. En algunas modalidades, la población de células en una masa se obtiene a partir de tejido de donante, que incluye, por ejemplo, sangre.

[0129] *Medios de inducción de CD4/CD8:* La expresión «medios de inducción de

CD4/CD8» como se usa aquí se refiere a medios de cultivo celular que se usan para obtener una población de células que comprende células CD4-/CD8-, células CD4+/CD8+, células CD4+/CD8-, células CD4-/CD8+. En algunas modalidades, los medios de inducción de CD4/CD8 se utilizan para diferenciar la masa de células HP en una población de células que comprende células CD4-/CD8-, células CD4+/CD8+, células CD4+/CD8-, células CD4-/CD8+. En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 comprende uno o más de ácido ascórbico, SCF, TPO, Flt3L, IL7, un inhibidor de p38MAPKi, como SB203580, y SDF1a o todos ellos.

[0130] *Receptor de antígeno quimérico (CAR):* Tal como se usa en el presente documento, «receptor de antígeno quimérico» o «CAR» indica receptores modificados que pueden conferirles una especificidad de antígeno a las células (por ejemplo, células NK, linfocitos T tales como linfocitos T sin tratamiento, linfocitos T de memoria centrales, linfocitos T de memoria efectores o combinaciones de estos). Los CAR también se conocen como receptores de linfocitos T artificiales, receptores de linfocitos T quiméricos o inmunorreceptores quiméricos. En diversas modalidades, los CAR de la invención comprenden un dominio de direccionamiento específico del antígeno, un dominio extracelular, un dominio transmembrana, opcionalmente uno o más dominios de estimulación conjunta y un dominio de señalización intracelular. En algunas modalidades descritas en este documento, se introduce un CAR en células inmunitarias CD56+/CD3- (p. ej., células NK o similares a NK) producidas usando un método descrito en el presente documento, de modo que se redirija la especificidad para un antígeno de superficie celular deseado o un complejo MHC-péptido. Estos receptores sintéticos normalmente contienen un dominio de unión a la diana que está asociado con uno o más dominios de señalización a través de un enlazador flexible en una sola molécula de fusión. El dominio de unión a la diana se utiliza para dirigir la célula inmunitaria (p. ej., una célula inmunitaria CD56+/CD3+) a dianas específicas en la superficie de células patológicas (p. ej., una célula cancerosa) y los dominios de señalización contienen maquinaria molecular para la activación y proliferación de células inmunitarias (p. ej., células inmunitarias CD56+/CD3-). El enlazador flexible que generalmente pasa a través de la membrana (es decir, para formar un dominio transmembrana) de la célula inmunitaria (p. ej., célula CD56+/CD3-) permite la visualización en la membrana celular del dominio de unión a la diana del CAR. Los CAR han permitido con éxito que las células inmunitarias se redirijan contra los antígenos expresados en

la superficie de las células tumorales de diversas neoplasias malignas que incluyen linfomas y tumores sólidos (Gross et ál., (1989) *Transplant Proc.*, 21(1 Pt 1): 127-30; Jena et ál., (2010) *Blood*, 116(7):1035-44). El dominio de unión extracelular de un CAR puede estar compuesto por un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de la fusión de las regiones pesadas y ligeras variables de un anticuerpo monoclonal murino o humanizado. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular comprende un anticuerpo de dominio único. Alternativamente, se pueden usar scFv que se derivan de Fab (en lugar de un anticuerpo, por ejemplo, obtenido de bibliotecas de Fab). En diversas modalidades, este scFv se fusiona con un dominio transmembrana y luego con un dominio de señalización intracelular. Se han desarrollado al menos tres generaciones de CAR. Los CAR de la primera generación comprendían dominios de unión a la diana unidos a un dominio de señalización derivado de la región citoplásmica de las cadenas gamma del receptor Fc o CD3zeta. Se demostró que los CAR de primera generación redirigen con éxito las células inmunitarias a la diana seleccionada, pero no pudieron proporcionar una expansión y una actividad antitumoral *in vivo* prolongadas. Los CAR de segunda y tercera generación se han centrado en mejorar la supervivencia celular modificada y aumentar la proliferación al incluir moléculas coestimuladoras, como CD28, OX-40 (CD134) y 4-1BB (CD137).

[0131] *Cultivo*: Los términos «cultivo» o «cultivo celular» se refieren al mantenimiento, crecimiento y/o diferenciación de células en un entorno *in vitro*. En varios métodos descritos en este documento, las células se cultivan en un medio de cultivo celular particular (o «medios» en caso de plural) que facilita o promueve el crecimiento o la diferenciación de un tipo de célula en un tipo diferente de célula. Por ejemplo, en determinadas modalidades descritas en el presente documento, el cultivo de iPSC en un medio de cultivo celular da como resultado que al menos el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o el 80% de las células se convierten en células CD34+ (es decir, HPC) en la población celular total. En algunas modalidades descritas en el presente documento, el cultivo de una población celular que contiene al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% 30% de HPC da como resultado una población celular que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8- y CD4+/CD8+. En aun otras modalidades, el cultivo de una población celular de células que contienen células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8- y CD4+/CD8+ da como resultado una población de células CD56+/CD3- enriquecida (es decir, al menos el 50% de las células en la población celular total

son CD56+/CD3-). Un medio de cultivo celular actúa como fuente de nutrientes, hormonas y/u otros factores útiles para propagar y/o sostener las células.

[0132] Diferenciación: Los términos «diferenciar», «inducir», «convertir», «derivar» y similares se refieren al proceso en el que una célula de un fenotipo sufre un cambio a una célula de otro fenotipo.

[0133] Modificado: El término «modificado», como se usa en este documento, describe un polinucleótido, polipéptido o una célula que ha sido diseñada o modificada y/o cuya existencia y producción requieren intervención y/o actividad. Por ejemplo, una célula modificada intencionalmente para provocar un efecto particular y que difiere del efecto de células naturales del mismo tipo. En algunas modalidades, una célula modificada es una célula CD56+/CD3- derivada de iPSC o HPC utilizando un método descrito en el presente documento y que expresa además un receptor de antígeno quimérico.

[0134] Enriquecido: El término «enriquecido» como se usa aquí en referencia a un tipo de célula específico significa una población de células que tiene al menos el 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o el 90% del tipo de célula específico dentro de la población celular según lo determinado por citometría de flujo u otro método analítico.

[0135] Ex vivo: Como se usa aquí, el término «ex vivo» significa un proceso en el que se extraen células de un organismo vivo y se propagan fuera del organismo (p. ej., en un tubo de ensayo, en una bolsa de cultivo, en un biorreactor).

[0136] Derivado o equivalente funcional: Tal como se usan en este documento, «equivalente funcional» o «derivado funcional» denotan, en el contexto de un derivado funcional de una secuencia de aminoácidos, una molécula que retiene una actividad biológica (ya sea función o estructural) que es sustancialmente similar a la de la secuencia original. Un derivado o equivalente funcional puede ser un derivado natural o prepararse sintéticamente. Los ejemplos de derivados funcionales incluyen las secuencias de aminoácidos que presentan sustituciones, eliminaciones o adiciones de uno o más aminoácidos, con la condición de que se conserve la actividad biológica de la proteína. El aminoácido de sustitución tiene preferentemente propiedades químico-físicas similares a las del aminoácido sustituido. Las propiedades fisicoquímicas similares deseables incluyen similitudes en la carga, el volumen, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad y similares.

[0137] Célula progenitora hematopoyética: Las expresiones «célula progenitora

hematopoyética», «células progenitoras hematopoyéticas» o «HPC» se refieren a las células CD34+ que están comprometidas con un linaje hematopoyético, pero que son capaces de una mayor diferenciación hematopoyética e incluyen células madre hematopoyéticas, células madre hematopoyéticas multipotenciales, progenitores mieloides comunes, progenitores de megacariocitos, progenitores de eritrocitos y progenitores linfoides.

[0138] *Masa de HPC:* Las expresiones «masa de HPC», «masa de células progenitoras hematopoyéticas» o «masa de células HP» se refieren a una población heterogénea de células que comprende células progenitoras hematopoyéticas. En algunas modalidades, la masa de HPC se deriva de iPSC. En algunas modalidades, la masa de HPC se deriva de la sangre.

[0139] *Células NK derivadas de HPC* :La expresión «células NK derivadas de HPC» significa células inmunitarias CD56+/CD3- (p. ej., células NK o similares a NK) que se obtienen de una población de masa de HPC después del cultivo en un medio de cultivo celular.

[0140] *Medios de inducción de HPC:* La expresión «medio de inducción de HPC», como se usa en el presente documento, se refiere a un medio de cultivo que se usa para generar una población de células que comprende células hematopoyéticas a partir de una población de células de partida. En algunas modalidades, la población de células de partida son iPSC. En algunas modalidades, los medios de inducción de HPC comprenden uno o más de BMP4, VEGF, bFGF, ácido ascórbico, un inhibidor de TGF β , un factor de células madre (SCF), trombopoyetina TPO y Flt3L.

[0141] *Células inmunitarias* : Como se usa en el presente documento, «célula inmunitaria» o «células inmunitarias» se refieren a células del sistema inmunitario, incluidas, entre otras, linfocitos T, células NK, linfocitos T/NK, células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, neutrófilos, eritrocitos, monocitos, basófilos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y cualquier combinación de estos. En diversas modalidades, las células inmunitarias producidas utilizando los métodos descritos en el presente documento son células NK caracterizadas como células CD56+/CD3-.

[0142] *Célula madre pluripotente inducida (iPSC):* Como se usa en el presente documento, «célula madre pluripotente inducida» o «iPSC» se refiere a una célula madre pluripotente derivada artificialmente (p. ej., inducida) de una célula no pluripotente, normalmente una célula somática adulta, por ejemplo, al inducir la expresión de uno o más genes (lo que incluye POU4F1/OCT4 (identificación de gen: 5460) en combinación con, entre otros, SOX2

(identificación de gen: 6657), KLF4 (identificación de gen: 9314), cMYC (identificación de gen: 4609), NANOG (identificación de gen: 79923), LIN28/ LIN28A (identificación de gen: 79727)). Las células madre pueden modificarse genéticamente en cualquier etapa con marcadores o genes para que los marcadores o genes pasen a cualquier etapa de cultivo. Los marcadores pueden usarse para purificar o enriquecer las poblaciones de células madre diferenciadas o no diferenciadas en cualquier etapa del cultivo.

[0143] *Medio de inducción:* La expresión «medio de inducción» generalmente se refiere a un medio de cultivo celular que se usa para diferenciar una población de células de un primer fenotipo celular a un segundo fenotipo celular. En algunas modalidades, el primer fenotipo celular y el segundo fenotipo celular comprenden una población heterogénea de células. En algunas modalidades, el primer fenotipo celular comprende una población heterogénea de células. En algunas modalidades, el segundo fenotipo celular comprende una población heterogénea de células. En algunas modalidades, el medio de inducción se usa para diferenciar una población de células heterogéneas en una población de células que es sustancialmente homogénea.

[0144] *In vitro:* Tal como se usa en este documento, el término «*in vitro*» se refiere a eventos que ocurren en un ambiente artificial, *por ejemplo*, en un tubo de ensayo o recipiente para reacción, en cultivo celular, *etc.*, en lugar de producirse dentro de un organismo multicelular.

[0145] *In vivo:* Tal como se usa en este documento, el término «*in vivo*» se refiere a eventos que ocurren en un organismo multicelular, como un ser humano y un animal no humano. En el contexto de sistemas celulares, el término puede utilizarse para referirse a eventos que ocurren en una célula viva (por ejemplo, a diferencia de los sistemas *in vitro*).

[0146] *Paso de aislamiento:* La expresión «paso de aislamiento» o «paso de aislamiento celular», como se usa en el presente documento, significa un paso de separación de un tipo de célula particular de una mezcla de células. Se conocen en la técnica varios métodos para separar tipos de células particulares de una mezcla de células, e incluyen, por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y estrategias de clasificación basadas en esferas magnéticas tales como clasificación de células activadas magnéticamente (MACS).

[0147] *Linfocito citolítico natural (NK):* Tal como se usan en este documento, «linfocito

citolítico natural» o «célula NK» es una célula linfoide definida por su expresión de marcador y función o actividad. Por ejemplo, en humanos una célula NK expresa CD56. En una modalidad adicional, dichas células NK pueden expresar CD56 y CD16. En otro ejemplo, dichas células NK pueden ser células CD56+/CD3-. Las células NK pueden expresar niveles variables de CD56. Por ejemplo, las células NK pueden ser «CD56^{high}», lo que significa que las células NK expresan un alto nivel de CD56 según lo evaluado por métodos en la técnica, por ejemplo, según lo evaluado por citometría de flujo. En otro ejemplo, las células NK pueden ser «CD56^{dim}», lo cual significa que las células NK expresan un nivel bajo, pero detectable de CD56 según se determina mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

10 **[0148]** *Medios de inducción de NK:* En algunas modalidades, «medio de inducción de NK» se refiere a un medio de cultivo celular que se usa para generar una población de células que comprende células CD56+/CD3-. En algunas modalidades, los medios de inducción de células NK comprenden uno o más de IL-7, IL-2 y anticuerpo anti-CD3.

15 **[0149]** *Célula iPS NK:* Como se usa en el presente documento, «células iPS NK» son células NK derivadas de iPSC, por ejemplo, células NK que se derivan de iPSC como materiales de partida. Tal célula NK iPS expresa CD56. En una modalidad adicional, dichas células NK iPS pueden expresar CD56 y CD16. En otro ejemplo, dichas células NK iPS pueden expresar CD56 y ser CD3- (CD56+/CD3-). Las células NK iPS también se denominan en el presente documento «células iNK».

20 **[0150]** *Linfocito T:* Como se usa en este documento, «linfocito T» es una célula linfoide definida por la expresión de su marcador y su función o actividad. Por ejemplo, en humanos, un linfocito T expresa CD3. Las células CD56+/CD3+ se conocen como células NKT.

25 **[0151]** «Anticuerpo Fv de cadena sencilla» o «scFv» hace referencia a un anticuerpo diseñado que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada conectadas entre sí directamente o a través de una secuencia peptídica enlazadora.

30 **[0152]** *Sujeto:* Tal como se usa en este documento, el término «sujeto» se refiere a un ser humano o cualquier animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado, cerdo, oveja, caballo o primate). Un ser humano incluye las formas prenatal y posnatal. En muchas modalidades, un sujeto es un ser humano. Un sujeto puede ser un paciente, que se refiere a un ser humano que se presenta ante un proveedor médico para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. El término «sujeto» se usa aquí de manera intercambiable con

«individuo» o «paciente». Un sujeto puede padecer o ser susceptible a una enfermedad o un trastorno, pero puede presentar o no presentar síntomas de la enfermedad o el trastorno.

[0153] *Padecimiento:* Un individuo que «padece» una enfermedad, un trastorno y/o una afección cuenta con un diagnóstico o presenta uno o más síntomas de la enfermedad, el trastorno y/o la afección. La enfermedad puede incluir cáncer, por ejemplo, linfoma y leucemia.

[0154] *Cantidad terapéuticamente eficaz:* Tal como se usa en el presente documento, «cantidad terapéuticamente eficaz» de un agente terapéutico (por ejemplo, una terapia celular) significa una cantidad (por ejemplo, una determinada cantidad de células o una población celular enriquecida con un porcentaje determinado de un tipo o tipos particulares de células) que es suficiente, al administrarse a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad, un trastorno y/o una afección, para tratar, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, el trastorno y/o la afección. Los expertos en la técnica observarán que una cantidad terapéuticamente eficaz se administra típicamente mediante un régimen de dosificación que comprende al menos una dosis unitaria. En algunas modalidades, las células CD56+/CD3- descritas en el presente documento se modifican para expresar uno o más transgenes. En algunas modalidades, las células CD56+/CD3- descritas en el presente documento se modifican para expresar un receptor de antígeno quimérico, como por ejemplo CD19. En algunas modalidades, entre aproximadamente 100 millones y 900 millones de células CD56+/CD3- descritas en el presente documento se administran a un sujeto que las necesita. En algunas modalidades, se administran entre alrededor de 100 millones y 700 millones de células CD56+/CD3- descritas en la presente a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, se administran entre alrededor de 100 millones y 500 millones de células CD56+/CD3- descritas en la presente a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, se administran entre alrededor de 200 millones y 900 millones de células CD56+/CD3- descritas en la presente a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, se administran entre alrededor de 200 millones y 700 millones de células CD56+/CD3- descritas en la presente a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, se administran entre alrededor de 200 millones y 500 millones de células CD56+/CD3- descritas en la presente a un sujeto que lo necesita.

[0155] *Tratamiento:* Tal como se utiliza en el presente documento, «tratar» o «tratamiento» se refieren a cualquier método utilizado para aliviar, mejorar, aliviar, inhibir, prevenir, retrasar la aparición, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más

síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección de forma parcial o total. El tratamiento se le puede administrar a un sujeto que no presente signos de una enfermedad y/o que solo presente signos tempranos de la enfermedad, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad.

5 **[0156]** La mención de rangos numéricos a través de valores extremos en este documento incluye todos los números y las fracciones incluidos dentro de ese rango (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,9, 4 y 5). También debe entenderse que se presume que todos los números y las fracciones de estos se encuentran modificados por la expresión «alrededor de»

10 **[0157]** Varios aspectos de la invención se describen en más detalle en las subsecciones que siguen a continuación. El uso de secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En la presente solicitud, el uso de «o» significa «y/o», a menos que se establezca de otro modo. Tal como se usan en la presente, las formas «un», «una», «el» y «la» incluyen referencias en singular, así como en plural, a menos que el contexto claramente indique lo contrario.

15 **[0158]** Varios aspectos de la invención se describen en más detalle en las subsecciones que siguen a continuación. El uso de secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En la presente solicitud, el uso de «o» significa «y/o», a menos que se establezca de otro modo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 **[0159]** La presente descripción proporciona métodos para producir células NK a partir de una célula pluripotente, como una célula iPS o una célula progenitora hematopoyética (HPC). Se hace referencia a las células NK producidas a partir de iPSC en el presente documento como «células NK derivadas de iPS», «células NK iPS» o «células iNK». La descripción proporciona métodos de cultivo de células en los que las células progenitoras como iPSC o HPC pueden
25 diferenciarse con alta eficacia en células NK o NK iPS sin necesidad de un paso de aislamiento. La descripción también muestra que las células NK iPS obtenidas son funcionales y pueden modificarse genéticamente adicionalmente, por ejemplo, mediante la introducción de un receptor de antígeno quimérico (CAR), útil para el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos, como el cáncer.

30 **[0160]** Diversos métodos de producción de células CD56+/CD3- (células NK) se describen a continuación con más detalle.

Método para producir células NK o células NK derivadas de iPS a partir de células pluripotentes sin un paso de aislamiento

[0161] En algunas modalidades, se proporciona un método para producir células NK o células NK derivadas de iPS, cuyo método no requiere un paso de aislamiento.

5 ***Descripción general del método de cultivo***

[0162] Los métodos proporcionados aquí permiten la producción de células CD56+/CD3- sin ningún paso intermedio de aislamiento. En algunas modalidades, los métodos comprenden cultivar una célula madre pluripotente, como una iPSC, en medios de inducción de HPC para obtener una población de células que comprende células hematopoyéticas (HPC) (masa de células HP). La población de una masa de células HP se cultiva posteriormente sin realizar un paso de aislamiento en medios de inducción de CD4/CD8 para obtener una población celular que comprenda células con doble positivo CD4/CD8. En algunas modalidades, la población celular que comprende las células con doble positivo CD4/CD8 también comprenden células CD4+/CD8-, células CD4-/CD8- y células CD4-/CD8+. A esto le sigue un posterior periodo de cultivo sin realizar un paso de aislamiento en el que las células se cultivan en medios de inducción de NK para obtener una población enriquecida en células inmunitarias CD56+/CD3-. En consecuencia, en algunas modalidades, el método para producir células CD56+/CD3- comprende: 1) cultivar una célula pluripotente en medio de inducción de HPC para obtener una población que comprenda células hematopoyéticas (masa de células HP); 2) cultivar la masa de células HP en medios de inducción de CD4/CD8 para obtener una población de células que comprende células CD4+/CD8-, células CD4-/CD8- y células CD4-/CD8+; y 3) cultivar la población de células que comprenden células CD4+/CD8-, células CD4-/CD8- y células CD4-/CD8+ en la inducción de NK durante un período de tiempo para obtener células CD56+/CD3-.

[0163] En algunas modalidades, un método para producir células NK o células NK iPS comprende cultivar células que comprenden células progenitoras hematopoyéticas (p. ej., masa de células HP) para producir una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8, seguido de un posterior período de cultivo sin realizar un paso de aislamiento en el que la población celular se cultiva en un medio para obtener una población enriquecida en células inmunitarias CD56+/CD3-. En algunas modalidades, un método para producir células inmunitarias CD56+/CD3- derivadas de células madre pluripotentes comprende cultivar las células madre pluripotentes en uno o más medios. En algunas modalidades, un método para

producir células inmunitarias CD56+/CD3- comprende cultivar células progenitoras hematopoyéticas en uno o más medios de cultivo. En algunas modalidades, un método para producir células inmunitarias CD56+/CD3- comprende cultivar una mezcla o población de células que comprende células con doble positivo CD4/CD8 en uno o más medios de cultivo.

- 5 En algunas modalidades, la población enriquecida en células inmunitarias CD56+/CD3- pueden separarse posteriormente mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, mediante clasificación FACS o técnicas de aislamiento basadas en esferas magnéticas. En una modalidad, las células iPS se pueden diferenciar a células NK iPS en alrededor de 4-8 semanas, 5-7 semanas o alrededor de 6 semanas. Por consiguiente, en
- 10 algunas modalidades, las células iPS pueden diferenciarse en células NK en alrededor de 4-8 semanas. En algunas modalidades, las células iPS se pueden diferenciar en células NK en alrededor de 5 a 7 semanas. En algunas modalidades, las células iPS se pueden diferenciar en células NK en alrededor de 6 semanas.

- [0164]** El proceso de diferenciación celular se puede evaluar por diversos medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades, la diferenciación celular de las
- 15 células cultivadas se puede evaluar al obtener una muestra de las células cultivadas y someter esa muestra de células cultivadas a uno o más métodos analíticos para determinar el fenotipo celular de la célula. Los métodos conocidos para determinar el fenotipo celular incluyen, por ejemplo, citometría de flujo e imágenes de inmunofluorescencia. Puede utilizarse cualquier
- 20 ensayo de muestreo y fenotipado adecuado con los métodos de cultivo celular descritos en el presente documento para determinar el progreso del proceso de diferenciación celular. En algunas modalidades, los métodos descritos en este documento incluyen uno o más pasos de muestreo para determinar el fenotipo celular en un momento dado.

Descripción general de iPSC a masa de células HP

- 25 **[0165]** En algunas modalidades, una célula pluripotente, como iPSC, se cultiva en medios de inducción de HPC para producir una población que comprende la masa de células HP. En algunas modalidades, el cultivo de iPSC en medios de inducción de HPC para obtener una masa de células HPC comprende cultivar iPSC en medios de inducción de HPC. Los medios de inducción de HPC pueden comprender varios componentes que permiten la producción de
- 30 una masa de células HP. En algunas modalidades, los medios de inducción de HPC comprenden al menos uno o más compuestos seleccionados de proteína 4 morfogenética ósea

(BMP4), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), ácido ascórbico, inhibidor de ROCK, inhibidor de GSK3, factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), Flt3L e inhibidor de TGF β . Por consiguiente, en algunas modalidades, el medio de inducción de HPC para inducir HPC de iPSC comprende BMP4. En algunas modalidades, el medio de cultivo para inducir HPC de iPSC comprende VEGF. En algunas modalidades, el medio de cultivo para inducir HPC a partir de iPSC comprende bFGF. En algunas modalidades, el medio de cultivo para inducir HPC a partir de iPSC comprende TGF β .

[0166] Las iPSC se cultivan en el medio de inducción de HPC durante un período de tiempo suficiente para producir una masa de células HP. En algunas modalidades, las iPSC se cultivan en medios de inducción de HPC durante un período de entre alrededor de 7 y 21 días, o entre 10 y 18 días, o alrededor de 14 días. En algunas modalidades, las iPSC se cultivan en medios de inducción de HPC durante un período de alrededor de 13 días.

[0167] En algunas modalidades, las células se cultivan en condiciones de bajo oxígeno como, por ejemplo, alrededor del 3%, 4%, 5% o 6% de O₂. En consecuencia, en algunas modalidades, las células se cultivan en alrededor de 3% de O₂. En algunas modalidades, las células se cultivan en alrededor del 4% de O₂. En algunas modalidades, las células se cultivan en alrededor del 5% de O₂. En algunas modalidades, las células se cultivan en alrededor del 6% de O₂.

Descripción general de masa de células HP a CD4/CD8

[0168] En algunas modalidades, la masa de células HPC, o las HPC obtenidas de otro modo, por ejemplo, una HPC primaria aislada de un donante humano o HPC diferenciada de otras fuentes o tipos de células madre como las derivadas de células madre embrionarias, se cultivan adicionalmente sin ningún paso intermedio de aislamiento en un medio para obtener una población de células que comprende células con doble positivo (DP) CD4/CD8. En algunas modalidades, la masa de células HPC o las HPC obtenidas de otra forma, por ejemplo, una HPC primaria aislada de un donante humano o HPC diferenciadas de otras células madre u otros tipos tales como derivadas de células madre embrionarias, se cultivan adicionalmente sin paso de aislamiento interviniente alguno en un medio para obtener una población de células que comprende células CD4⁺/CD8. En algunas modalidades, la masa de células HPC o las HPC obtenidas de otra forma, por ejemplo, una HPC primaria aislada de un donante humano o

HPC diferenciadas de otras células madre u otros tipos tales como derivadas de células madre embrionarias, se cultivan adicionalmente sin paso de aislamiento interviniente alguno en un medio para obtener una población de células que comprende células CD4-/CD8-. En algunas modalidades, la masa de células HPC o las HPC obtenidas de otra forma, por ejemplo, una

5 HPC primaria aislada de un donante humano o HPC diferenciadas de otras células madre u otros tipos tales como derivadas de células madre embrionarias, se cultivan adicionalmente sin paso de aislamiento interviniente alguno en un medio para obtener una población de células que comprende células CD4-/CD8+. Debe entenderse que la población celular obtenida por este método incluye células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células

10 CD4+/CD8-. La población celular incluye, por ejemplo, linfocitos. En algunas modalidades, la masa de células HPC se cultiva en medios de inducción de CD4/CD8 que tienen al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, factor de células madre (SCF), IL-7, Flt3L, TPO, fibronectina o una variante de esta, ligando Notch (p. ej., Jag-1, Jag-2, DLL-1, DLL-3, DLL-4), inhibidor de p38 y SDF-1 para obtener una población que comprende

15 células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8-. En consecuencia, en algunas modalidades, la masa de células HPC se cultiva en medios de inducción de CD4/CD8 que comprenden ácido ascórbico para obtener una población que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8-. En algunas modalidades, la masa de células HPC se cultiva en un medio de inducción de

20 CD4/CD8 que comprende SCF para obtener una población que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8-. En algunas modalidades, la masa de células HPC se cultiva en un medio de inducción de CD4/CD8 que comprende IL-7 para obtener una población que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8-. En algunas modalidades, la masa de células HPC se cultiva

25 en un medio de inducción de CD4/CD8 que comprende Flt3L para obtener una población que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8-. En algunas modalidades, la masa de células HPC se cultiva en un medio de inducción de CD4/CD8 que comprende un inhibidor de p38 para obtener una población que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8-. En algunas

30 modalidades, la masa de células HPC se cultiva en un medio de inducción de CD4/CD8 que comprende SDF-1 para obtener una población que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-

/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8-.

[0169] El período de cultivo durante un tiempo adecuado para obtener una población de células que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8-. En algunas modalidades, el cultivo de una masa de células HP para obtener una población de células que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8- es de alrededor de 2-6 semanas, 3-5 semanas o alrededor de 3 semanas. En consecuencia, en algunas modalidades, el período de cultivo celular es de alrededor de 2 a 6 semanas. En algunas modalidades, el período de cultivo celular es de alrededor de 3 a 5 semanas. En algunas modalidades, el período de cultivo celular es alrededor de 3 semanas.

[0170] En algunas modalidades, las células se cultivan en condiciones de bajo oxígeno como, por ejemplo, alrededor del 3%, 4%, 5% o 6% de O₂. Por consiguiente, en algunas modalidades, las células se cultivan en condiciones de oxígeno bajo, tal como, por ejemplo, alrededor del 3% de O₂. En algunas modalidades, las células se cultivan en condiciones de oxígeno bajo, tal como, por ejemplo, alrededor del 4% de O₂. En algunas modalidades, las células se cultivan en condiciones de oxígeno bajo, tal como, por ejemplo, alrededor del 5% de O₂. En algunas modalidades, las células se cultivan en condiciones de oxígeno bajo, tal como, por ejemplo, alrededor del 6% de O₂.

Visión general de células CD4/CD8 a células CD56+/CD3-

[0171] La población de células que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y CD4+/CD8-, como se describió anteriormente, se puede cultivar más en un medio de cultivo celular para obtener una población de células CD56+/CD3-. En algunas modalidades, el medio de cultivo es medio de inducción de NK. En algunas modalidades, el medio de inducción de NK comprende uno o más de IL-7, IL-2 y anticuerpo anti-CD3.

[0172] En algunas modalidades, la población de células que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y CD4+/CD8- se cultiva adicionalmente, sin un paso intermedio de aislamiento, en un medio de cultivo para obtener una población de células enriquecidas en células CD56+/CD3-. Tales células CD56+ incluyen, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK). En algunas modalidades, la población que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8- se cultivan en un medio que incluye un activador de CD3, IL-2 y/o IL-7. Por consiguiente, en algunas modalidades, la

población que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8- se cultiva en un medio que incluye un activador de CD3. Los activadores de CD3 son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, complejos de anticuerpos que se unen a ligandos de superficie CD28 y/o CD3. Los activadores de CD3 incluyen, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 o se puede usar un fragmento unido a este. En algunas modalidades, cuando se usa un anticuerpo anti-CD3, el anticuerpo anti-CD3 puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo policlonal. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoclonal completamente humano. El anticuerpo puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD, IgE o IgG. Pueden usarse varios tipos de anticuerpos anti-CD3, incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo producido a partir del clon OKT3 o el clon UCHT1. La concentración de anticuerpo anti-CD3 en el medio es, por ejemplo, entre 10 ng/ml y 1000 ng/ml.

[0173] En algunas modalidades, la población que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8- se cultiva en un medio que incluye IL-2. En algunas modalidades, la población que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8- se cultiva en un medio que incluye IL-7. En algunas modalidades, las células se cultivan en condiciones de bajo oxígeno como, por ejemplo, alrededor del 3%, 4%, 5% o 6% de O₂. En consecuencia, en algunas modalidades, las células se cultivan en alrededor del 3% de O₂. En algunas modalidades, las células se cultivan en alrededor del 4% de O₂. En algunas modalidades, las células se cultivan en alrededor del 5% de O₂. En algunas modalidades, las células se cultivan en alrededor del 6% de O₂.

[0174] La población celular que comprende células CD56+ se puede cultivar adicionalmente en medios de inducción de NK para enriquecer la población de células CD56+/CD3-. En algunas modalidades, la población celular que comprende células CD56+ se cultiva en medios de inducción de NK que comprenden IL-7 y/o IL-15 para enriquecer aun más las células CD56+. Por tanto, en algunas modalidades, la población celular que comprende células CD56+ se cultiva en medios de inducción de NK que comprenden IL-7. En algunas modalidades, la población celular que comprende células CD56+ se cultiva en medio de inducción de NK que comprende IL-15. En algunas modalidades, las células se cultivan en condiciones de bajo oxígeno como, por ejemplo, alrededor del 3%, 4%, 5% o 6% de O₂. En

algunas modalidades, las células CD56+/CD3- producidas son células NK. El porcentaje de células NK CD56+/CD3- producidas son al menos alrededor del 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más del 95%%. En consecuencia, en algunas modalidades, el método da como resultado al menos alrededor del 50% de células NK CD56+/CD3-. En algunas modalidades, el método genera al menos alrededor del 55% de células NK CD56+/CD3-. En algunas modalidades, el método genera al menos alrededor del 60% de células NK CD56+/CD3-. En algunas modalidades, el método genera al menos alrededor del 65% de células NK CD56+/CD3-. En algunas modalidades, el método genera al menos alrededor del 70% de células NK CD56+/CD3-. En algunas modalidades, el método genera al menos alrededor del 75% de células NK CD56+/CD3-. En algunas modalidades, el método genera al menos alrededor del 80% de células NK CD56+/CD3-. En algunas modalidades, el método genera al menos alrededor del 85% de células NK CD56+/CD3-. En algunas modalidades, el método genera al menos alrededor del 90% de células NK CD56+/CD3-. En algunas modalidades, el método genera al menos alrededor del 95% de células NK CD56+/CD3-. En algunas modalidades, el método da como resultado más del 95% de células NK CD56+/CD3-.

[0175] En algunas modalidades, alrededor del 5%, 10, 15%, 20%, 25% o alrededor del 30% de las células producidas por este método de cultivo son linfocitos T CD3+. En algunas modalidades, menos del 5% de las células producidas corresponde a linfocitos T CD3+. En algunas modalidades, alrededor del 5% de las células producidas corresponde a linfocitos T CD3+. En algunas modalidades, alrededor del 10% de las células producidas corresponde a linfocitos T CD3+. En algunas modalidades, alrededor del 15% de las células producidas corresponde a linfocitos T CD3+. En algunas modalidades, alrededor del 20% de las células producidas corresponde a linfocitos T CD3+. En algunas modalidades, alrededor del 25% de las células producidas corresponde a linfocitos T CD3+. En algunas modalidades, alrededor del 30% de las células producidas corresponde a linfocitos T CD3+.

[0176] En algunas modalidades, la población enriquecida en células CD56+/CD3- se aísla mediante métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, métodos de clasificación basados en citometría de flujo (FACS) y métodos de clasificación magnéticos (MACS).

[0177] En algunas modalidades, el período de cultivo para obtener células NK CD56+/CD3- de una población que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células

CD4+/CD8+ y células CD4+/CD8 es de alrededor de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 días. En algunas modalidades, el período de cultivo es de alrededor de 7 días.

[0178] En algunas modalidades, la población de células CD56+ enriquecidas comprende células NK. En algunas modalidades, las células CD56+ enriquecidas comprenden células CD3-.

Células pluripotentes adecuadas para diferenciación a células CD56 +/CD3-

[0179] En algunas modalidades, cualquier HPC pluripotente, multipotente o derivada del paciente puede usarse con los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, en algunas modalidades, la célula es una célula madre embrionaria. En algunas modalidades, la célula es una célula madre adulta. Se conocen en la técnica diversas células madre adultas e incluyen, por ejemplo, células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células derivadas del cordón umbilical, células madre de la médula ósea, células madre adiposas y similares. En algunos casos, la célula es una célula madre pluripotente inducida (iPSC). Por lo tanto, las células NK producidas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento pueden obtenerse a partir de cualquier HPC pluripotente, multipotente o derivada del paciente, como una HPC primaria derivada directamente de un donante.

[0180] En algunas modalidades, la célula pluripotente incluye, por ejemplo, células madre embrionarias (ES), células madre embrionarias derivadas de un embrión clonado obtenido por transferencia nuclear (células ntES), células madre de línea germinal (células GS), células germinales embrionarias (células EG), células iPS y células pluripotentes derivadas de fibroblastos cultivados o células madre de médula ósea (células Muse). En algunas modalidades, las células iPS se pueden derivar de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos. Los métodos para producir células iPS son conocidos en la técnica. Estas células se pueden producir introduciendo factores de reprogramación en células somáticas arbitrarias. Los ejemplos de los factores de reprogramación en este documento incluyen genes tales como Oct3/4, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Klf4, Klf2, c-Myc, N-Myc, L-Myc, Nanog, Lin28, Fbx15, ERas, ECAT15-2, Tel1, beta-catenina, Lin28b, Sall1, Sall4, Esrrb, Nr5a2, Tbx3 y Glis1, y productos génicos de estos. Estos factores de reprogramación pueden usarse individualmente, o dos o más de estos pueden usarse en combinación. Los ejemplos de la combinación de los factores de reprogramación incluyen los descritos en WO2007/069666, WO2008/118820, WO2009/007852, WO2009/032194, WO2009/058413, WO2009/057831,

WO2009/075119, WO2009/079007, WO2009/091659, WO2009/101084, WO2009/101407, WO2009/102983, WO2009/114949, WO2009/117439, WO2009/126250, WO2009/126251, WO2009/126655, WO2009/157593, WO2010/009015, WO2010/033906, WO2010/033920, WO2010/042800, WO2010/050626, WO2010/056831, WO2010/068955, WO2010/098419, 5 WO2010/102267, WO2010/111409, WO2010/111422, WO2010/115050, WO2010/124290, WO2010/147395, WO2010/147612, Huangfu D, et ál. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26: 795-797, Shi Y, et ál. (2008), *Cell Stem Cell*, 2: 525-528, Eminli S, et ál. (2008), *Stem Cells*. 26: 2467-2474, Eluangfu D, et ál. (2008), *Nat. Biotechnol.* 26: 1269-1275, Shi Y, et ál. (2008), *Cell Stem Cell*, 3, 568-574, Zhao Y, et ál. (2008), *Cell Stem Cell*, 3: 475-479, Marson A, (2008), *Cell Stem Cell*, 3, 10 132-135, Feng B, et ál. (2009), *Nat. Cell Biol.* 11: 197-203, R. L. Judson et ál., (2009), *Nat. Biotechnol.*, 27: 459-461, Lyssiotis CA, et ál. (2009), *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 8912-8917, Kim J, et ál. (2009), *Nature*. 461: 649-643, Ichida J K, et ál. (2009), *Cell Stem Cell*. 5: 491-503, Heng JC, et ál. (2010), *Cell Stem Cell*. 6: 167-74, Han J, et ál. (2010), *Nature*. 463: 1096-100, Mali P, et ál. (2010), *Stem Cells*. 28: 713-720, y Maekawa M, et ál. (2011), *Nature*. 474: 225-9.

15 **[0181]** El iPSC se puede obtener de cualquier tejido adecuado. En algunas modalidades, las iPSC se obtienen a partir de células mononucleares de sangre periférica.

[0182] Las células progenitoras hematopoyéticas (HPC) son células que son capaces de diferenciarse en células sanguíneas como linfocitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, eritrocitos y megacariocitos. Las células progenitoras hematopoyéticas o las células madre 20 hematopoyéticas se pueden identificar en función, por ejemplo, de la presencia de antígenos de superficie CD34 y/o CD43.

[0183] En algunas modalidades, las células que se usan para producir las células NK CD56+/CD3- descritas en la presente se modifican genéticamente en cualquier etapa de la diferenciación celular. En algunas modalidades, las células NK CD56+/CD3- se modifican 25 genéticamente para incluir un receptor de antígeno quimérico deseado (CAR), un receptor de linfocitos T (TCR) u otra proteína modificada.

[0184] En algunas modalidades, las células que se usan para producir las células NK CD56+/CD3- descritas en la presente se modifican genéticamente en una etapa pluripotente, multipotente o unipotente. Por ejemplo, en algunas modalidades, las células que se usan para 30 producir las células NK CD56+/CD3- descritas en la presente se modifican genéticamente en una etapa pluripotente. Por ejemplo, la célula se puede modificar genéticamente en una etapa

de células madre embrionarias o en una etapa de células madre iPSC. En algunas modalidades, las células que se usan para producir las células NK CD56+/CD3- descritas en la presente se modifican genéticamente en una etapa multipotente. Por ejemplo, la célula puede modificarse genéticamente en la etapa de células madre hematopoyéticas (HSC).

5 Condiciones de cultivo: iPSC a masa de células HPC

[0185] En algunas modalidades, el medio para la producción de células progenitoras hematopoyéticas (es decir, medios de inducción de HPC) a partir de iPSC se puede preparar añadiendo vitamina C a un medio basal que se usa para el cultivo de células animales. Los ejemplos del medio basal incluyen el medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), el medio 199, el medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), el medio α MEM, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el medio F12 de Ham, el medio RPMI 1640, el medio de Fischer y el medio Neurobasal. (Life Technologies), y mezclas de dos o más de estos medios. En algunas modalidades, el medio contiene suero. En algunas modalidades, el medio no contiene suero.

[0186] En algunas modalidades, los medios de inducción de HPC pueden incluir StemPro™ -34. StemPro™ -34 es un medio sin suero formulado para apoyar el desarrollo de células hematopoyéticas humanas en cultivo.

[0187] Si es necesario, en algunas modalidades, los medios de inducción de HPC también pueden contener una o más sustancias tales como albúmina, insulina humana, transferrina humana, selenio o selenito de sodio, ácidos grasos, oligoelementos, 2-mercaptoetanol, tiol glicerol, α -monotioglicerol, lípidos, aminoácidos, L-glutamina, aminoácidos no esenciales, vitaminas, factores de crecimiento, compuestos de bajo peso molecular, antibióticos, antioxidantes, ácido pirúvico, amortiguadores, sales inorgánicas y citocinas.

[0188] En algunas modalidades, los medios de inducción de HPC incluyen medio IMDM que contiene suero, insulina, transferrina, selenio, tiol glicerol o α -monotioglicerol, L-glutamina y ácido ascórbico.

[0189] En algunas modalidades, el medio de inducción de HPC contiene una o más sustancias que provocan la transducción de señales de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4). Dichas sustancias incluyen, pero no se limitan a, BMP4.

[0190] En algunas modalidades, los medios de inducción de HPC contienen una o más sustancias que provocan la transducción de señales de la vía de señalización del factor de

crecimiento epitelial vascular (VEGF). Dichas sustancias incluyen, de modo no taxativo, VEGF.

[0191] En algunas modalidades, el medio de inducción de HPC contiene una o más sustancias que provocan la transducción de señales de la vía del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Dichas sustancias incluyen, pero no se limitan a, bFGF y FGF2.

5 **[0192]** En algunas modalidades, los medios de inducción de HPC contienen una o más sustancias que provocan la transducción de señales de la vía de señalización del kit o factor de células madre. Dichas sustancias incluyen, de modo no taxativo, SCF.

[0193] En algunas modalidades, el medio de inducción de HPC contiene una o más sustancias que provocan la transducción de señales de la vía de señalización del ligando Flt3.

10 Dichas sustancias incluyen, pero no se limitan a, el ligando de Flt3 (Flt3L).

[0194] En algunas modalidades, el medio de inducción de HPC contiene una o más sustancias que provocan la transducción de señales de la vía de señalización de la trombopoyetina. Dichas sustancias incluyen, de modo no taxativo, TPO.

[0195] El inhibidor de TGF β es un inhibidor de molécula pequeña que interfiere con la transducción de señales de la familia TGF β e incluye, por ejemplo, SB431542, SB202190 (ambos R.K. Lindemann et ál., *Mol. Cancer* 2:20 (2003)), SB505124 (GlaxoSmithKline), NPC30345, SD093, SD908, SD208 (Scios), LY2109761, LY364947, LY580276 (Lilly Research Laboratories) y similares.

[0196] SB431542 es un inhibidor potente y específico de los receptores ALK4, ALK5 y ALK7 de la cinasa tipo receptor de activina tipo I de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β).

[0197] Por ejemplo, cuando el inhibidor de TGF β es SB431542, su concentración en el medio es preferentemente de 0,5 μ M a 100 μ M

[0198] Los medios de inducción de HPC para la producción de la población de una masa de células HP pueden complementarse con una(s) citoquina(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en BMP4 (proteína morfogenética ósea 4), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos), SCF (factor de células madre), TPO (trombopoyetina) y Flt3L (ligando de Flt3).

[0199] En una modalidad, los medios de inducción de HPC pueden incluir StemPro34 complementado con insulina humana (alrededor de 10 μ g/ml), transferrina humana (alrededor de 5,5 μ g/ml), selenito de sodio (alrededor de 6,7 ng/ml), L-glutamina (alrededor de 2 mM), α -

monotioglicerol (alrededor de 0,4 mM) y SB431542 (alrededor de 6 μ M).

[0200] En algunas modalidades, la vitamina C se puede agregar cada cuatro días, cada tres días, cada dos días o todos los días durante el período de cultivo. La adición de la vitamina C al medio se puede realizar en una cantidad correspondiente a alrededor de 5 μ g/ml a
 5 alrededor de 500 μ g/ml. En algunas modalidades, la vitamina C está presente en el medio en alrededor de 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 300 μ g/ml, 400 μ g/ml o 500 μ g/ml.

[0201] En la memoria descriptiva, «vitamina C» significa ácido L-ascórbico y derivados de este, y «derivado de ácido L-ascórbico» significa derivados que se convierten en vitamina C
 10 por reacción enzimática en el organismo vivo. Los ejemplos de derivados del ácido L-ascórbico incluyen el fosfato de vitamina C (por ejemplo, 2-fosfato de ácido ascórbico), glucósido de ácido ascórbico, etilascorbilo, éster de vitamina C, tetrahexildecanoato de ascorbilo, estearato de ascorbilo y 6-palmitato 2-fosfato de ascorbilo. Se prefiere el fosfato de vitamina C. Los ejemplos del fosfato de vitamina C (por ejemplo, 2-fosfato ácido ascórbico) incluyen sales de fosfato de
 15 ácido L-ascórbico, tales como fosfato Na de ácido L-ascórbico y fosfato Mg de ácido L-ascórbico.

[0202] En algunas modalidades, cuando la sustancia que provoca la transducción de señales de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) es BMP4, la concentración de BMP4 en el medio de inducción de HPC para la producción de células
 20 progenitoras hematopoyéticas es de alrededor de 5 ng/ml a 500 ng/ml, por ejemplo, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, 200 ng/ml, 250 ng/ml, 300 ng/ml, 350 ng/ml, 400 ng/ml, 450 ng/ml o 500 ng/ml.

[0203] En algunas modalidades, cuando la sustancia que provoca la transducción de señales de la vía de señalización del factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF) es VEGF,
 25 la concentración del VEGF en el medio de inducción de HPC para la producción de células progenitoras hematopoyéticas es de alrededor de 5 ng/ml a 500 ng/ml, por ejemplo, alrededor de 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, 200 ng/ml, 250 ng/ml, 300 ng/ml, 350 ng/ml, 400 ng/ml, 450 ng/ml o 500 ng/ml.

[0204] En algunas modalidades, cuando la sustancia que provoca la transducción de señales de la vía del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es bFGF, la concentración de
 30

bFGF en el medio de inducción de HPC para la producción de células progenitoras hematopoyéticas es de alrededor de 5 ng/ml a 500 ng/ml, por ejemplo, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, 200 ng/ml, 250 ng/ml, 300 ng/ml, 350 ng/ml, 400 ng/ml, 450 ng/ml o 500 ng/ml.

- 5 **[0205]** En algunas modalidades, cuando la sustancia que provoca la transducción de señales de la vía de señalización de un kit o factor de células madre es SCR, la concentración de SCF en el medio de inducción de HPC para la producción de células progenitoras hematopoyéticas es de alrededor de 5 ng/ml a 100 ng/ml, por ejemplo, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml o 100 ng/ml.
- 10 **[0206]** En algunas modalidades, cuando la sustancia que provoca la transducción de señales de la vía de señalización del ligando de Flt3 es Flt3L, la concentración de Flt3L en el medio de inducción de HPC para la producción de células progenitoras hematopoyéticas es de alrededor de 1 ng/ml a 100 ng/ml, por ejemplo, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml, 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml, 9 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml o 100 ng/ml.
- 15 **[0207]** En algunas modalidades, cuando la sustancia que provoca la transducción de señales de la vía de señalización de la trombopoyetina es TPO, la concentración de TPO en el medio de inducción de HPC para la producción de células progenitoras hematopoyéticas es de alrededor de 1 ng/ml a 200 ng/ml, por ejemplo, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml, 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml, 9 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100, 125 ng/ml, 150 ng/ml, 175 ng/ml o 200 ng/ml.
- 20 **[0208]** En algunas modalidades, las células madre pluripotentes pueden cultivarse mediante cultivo adherente o cultivo en suspensión. En los casos de cultivo adherente, el cultivo puede llevarse a cabo en un recipiente de cultivo recubierto con un agente de recubrimiento y/o se puede cultivar en conjunto con otras células. Los ejemplos de otras células para el cultivo conjunto incluyen C3H10T1/2 (Takayama N., et ál. *J Exp Med.* 2817-2830, 2010) y células estromales derivadas de una especie diferente (Niwa A et ál. *J Cell Physiol.*, noviembre de 2009; 221(2): 367-77). Los ejemplos del agente de recubrimiento incluyen Matrigel (Nivea A, et ál. *PLoS One.* 6(7): e22261, 2011), iMatrix 511 (Miyazaki T, et ál. *Nature Communication* 2012 ;3 :1236), gelatina, colágeno, elastina y similares, glucosaminoglucano y proteoglucano como ácido hialurónico, sulfato de condroitina y similares, proteínas de adhesión celular como fibronectina o una variante de esta, vitronectina, laminina y similares, y similares. Los ejemplos
- 25
- 30

del método del cultivo en suspensión incluyen los métodos descritos en Chadwick et ál. *Blood* 2003, 102: 906-15, Vijayaragavan et ál. *Cell Stem Cell* 2009, 4: 248-62, y Saeki et ál. *Stem Cells* 2009, 27: 59-67.

[0209] En algunas modalidades, la masa de células HP también se puede preparar a partir de una estructura similar a una red (que también se denomina ES-sac o iPS-sac) obtenida mediante cultivo de células madre pluripotentes. La «estructura similar a una red» aquí es una estructura tridimensional en forma de saco (que tiene un espacio en el interior) derivada de células madre pluripotentes. La estructura se forma con una población de células endoteliales o similar, y contiene células progenitoras hematopoyéticas en su interior.

[0210] En algunas modalidades, las condiciones de temperatura para el cultivo para la producción de la masa de células HP es de alrededor de 37 °C a alrededor de 42 °C. En algunas modalidades, la temperatura es, por ejemplo, de alrededor de 37 °C a alrededor de 42 °C, preferiblemente de alrededor de 37 a alrededor de 39 °C. Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente el período de cultivo al monitorear el número de células progenitoras hematopoyéticas y/o similares mediante la obtención de una muestra del cultivo celular para el análisis fenotípico. Se conocen varios tipos de métodos en la técnica relacionados con el análisis fenotípico de muestras de células e incluyen, por ejemplo, métodos de citometría de flujo e inmunofluorescencia.

[0211] El período de cultivo para obtener la masa de células HP puede variar e incluir, por ejemplo, entre 6 y 14 días. Los ejemplos del período de cultivo incluyen al menos 6 días, no menos de 7 días, no menos de 8 días, no menos de 9 días, no menos de 10 días, no menos de 11 días, no menos de 12 días, no menos de 13 días y no menos de 14 días. En algunas modalidades, el período de cultivo es de seis días. En algunas modalidades, el período de cultivo es de 7 días. En algunas modalidades, el período de cultivo es de 8 días. En algunas modalidades, el período de cultivo es de 9 días. En algunas modalidades, el período de cultivo es de 10 días. En algunas modalidades, el período de cultivo es de 10 días. En algunas modalidades, el período de cultivo es de 11 días. En algunas modalidades, el período de cultivo es de 12 días. En algunas modalidades, el período de cultivo es de 13 días. En algunas modalidades, el período de cultivo es de 14 días. En algunas modalidades, el período de cultivo es superior a 14 días. El cultivo se puede llevar a cabo en condiciones de bajo oxígeno. Los ejemplos de las condiciones de bajo oxígeno incluyen 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%,

3% o menos. La frecuencia del cambio de medio puede ser decidida por un experto en la materia. En algunas modalidades, el medio se puede cambiar cada 2 días. En algunas otras modalidades, el medio se puede cambiar cada 3 días. En algunas modalidades, el medio se cambia todos los días.

- 5 **[0212]** En algunas modalidades, el cultivo para la producción de la masa de células HP se lleva a cabo combinando una o más de las condiciones anteriores. Por ejemplo, en algunas modalidades, el método para obtener masa de células HP de iPSC comprende: (i) cultivar células madre pluripotentes en C3H10T1/2 en un medio basal suplementado con vitamina C en condiciones de bajo oxígeno; y (ii) añadir además VEGF, SCF y Flt3L al líquido de cultivo de (1)
- 10 y cultivar las células en condiciones normales de oxígeno. El período durante el cual se lleva a cabo el paso (i) es al menos no menos de seis días, preferiblemente no menos de siete días, más preferiblemente siete días. El período durante el cual se lleva a cabo el paso (ii) es de al menos 6 días, de al menos 7 días y de 7 días.

- [0213]** En algunas modalidades, las células progenitoras hematopoyéticas obtenidas en
- 15 la masa de células HP pueden aislarse antes de su uso posterior. En algunas otras modalidades, las células progenitoras hematopoyéticas obtenidas pueden usarse como una población celular que también contiene otras especies de células (masa de células HP). La población de una masa de células HP es una preparación de células no separadas. En algunas modalidades, el método no comprende un paso de aislamiento.

20 ***Condiciones de cultivo: masa de células HP a células CD4/CD8***

- [0214]** En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 da como resultado una población celular que comprende células CD4+/CD8+, CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+ y células CD4+/CD8-. «Células con doble positivo CD4/CD8» (células DP) significa células que expresan tanto CD4 como CD8. Las células con doble positivo CD4/CD8 se pueden identificar
- 25 como células que son positivas para CD4, CD8, CD3 y CD45. «Células con doble negativo CD4/CD8» (células DN) significa células que no expresan ni CD4- ni CD8-. «Células CD4-/CD8+» significa células que no expresan CD4-, pero sí expresan CD8+. Las «células CD4+/CD8-» significan células que expresan CD4, pero no expresan CD8.

- [0215]** En algunas modalidades, la población celular que comprende células
- 30 CD4+/CD8+, CD4-/CD8-, CD4-/CD8+ y CD4+/CD8- puede ser inducida a diferenciarse en células CD56+/CD3-.

[0216] En algunas modalidades, una población celular que comprende las células con doble positivo CD4/CD8, entre otras células, se puede producir mediante un método que incluye un paso de cultivo de células progenitoras hematopoyéticas o células HP a granel en un medio complementado con vitamina C. La vitamina C que se agrega al medio basal es la misma que en la inducción antes descrita de la masa de células HP.

[0217] En algunas modalidades, el medio utilizado para producir una población celular que comprende células CD4+/CD8+, CD4-/CD8-, CD4-/CD8+ y CD4+/CD8- de la masa de células HP es el medio de inducción de CD4/CD8. En algunas modalidades, el medio de inducción de CD4/CD8 puede prepararse añadiendo vitamina C a un medio basal que se utiliza para el cultivo de células animales. Los ejemplos del medio basal incluyen medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), Medium 199, medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), medio α MEM (Thermo Fisher Scientific (Gibco)), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio F12 de Ham, medio RPMI 1640, medio de Fischer y medio neurobasal (Life Technologies), y mezclas de dos o más de estos medios. El medio puede contener suero o puede estar libre de suero.

[0218] Si fuera necesario, el medio basal también puede contener una o más sustancias, como albúmina, insulina humana, transferrina humana, selenio, selenita de sodio, ácido graso, oligoelementos, 2-mercaptoetanol, tiol glicerol, lípidos, aminoácidos, L-glutamina, aminoácidos no esenciales, vitaminas, factores de crecimiento, compuestos de bajo peso molecular, antibióticos, antioxidantes, ácido pirúvico, amortiguadores, sales inorgánicas y citocinas.

[0219] El medio de inducción de CD4/CD8 para la producción de una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8, entre otras células, pueden complementarse adicionalmente con una(s) citocina(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en ácido ascórbico, SCF, IL-7, Flt3L, TPO, fibronectina o una variante de esta, ligando de Notch, inhibidor de p38 y SDF-1.

[0220] En algunas modalidades, la vitamina C se puede agregar cada cuatro días, cada tres días, cada dos días o todos los días durante el período de cultivo. La adición de la vitamina C al medio se puede realizar en una cantidad correspondiente a alrededor de 5 μ g/ml a alrededor de 500 μ g/ml. En algunas modalidades, la vitamina C está presente en el medio en alrededor de 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 300 μ g/ml, 400 μ g/ml o 500 μ g/ml.

[0221] En algunas modalidades, el medio basal contiene una o más sustancias que provocan la transducción de señales de la vía de señalización del kit o factor de células madre. Dichas sustancias incluyen, de modo no taxativo, SCF.

[0222] En algunas modalidades, el medio basal contiene una o más sustancias que provocan la transducción de señales de la vía de señalización del ligando Flt3. Dichas sustancias incluyen, pero no se limitan a, el ligando de Flt3 (Flt3L).

[0223] En algunas modalidades, el medio basal contiene una o más sustancias que provocan la transducción de señales de la vía de señalización de la trombopoyetina. Dichas sustancias incluyen, de modo no taxativo, TPO.

[0224] En algunas modalidades, el medio basal contiene uno o más inhibidores de p38, que es un inhibidor de p38 α y p38 β que, a su vez, suprime la activación aguas abajo de MAPKAP cinasa-2 y la proteína de choque térmico 27. Los ejemplos del inhibidor químico de p38 que se utilizará en la presente invención incluyen, entre otros, SB203580 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol), y un derivado de este, SB202190 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol) y un derivado de este, SB239063 (trans-4-[4-(4-fluorofenil)-5-(2-metoxi-4-pirimidinil)-1H-imidazol-1-il]ciclohexanol) y un derivado de este, SB220025 y un derivado de este, PD169316, RPR200765A, AMG-548, BIRB-796, SCIO-469, SCIO-323, VX-702 y FR167653. Estos compuestos están disponibles comercialmente y, por ejemplo, SB203580, SB202190, SC239063, SB220025 y PD169316 están disponibles en Calbiochem, y SCIO-469 y SCIO-323 están disponibles en Scios y similares. Otros ejemplos de inhibidores de p38 comprenden el mutante negativo dominante de p38 que incluye p38T180A obtenido por mutación puntual de la treonina en la posición 180 ubicada en la región de unión del ADN de p38 a alanina, p38Y182F obtenido por mutación puntual de la tirosina en la posición 182 de p38 en humanos y ratones en fenilalanina y similares. El inhibidor de p38 está contenido en un medio, por ejemplo, a alrededor de 0,5 μ M a alrededor de 50 μ M.

[0225] En algunas modalidades, el medio basal contiene SDF-1.

[0226] En algunas modalidades, SDF-1 puede ser no solo SDF-1 α o una forma madura de este, sino también una isoforma como SDF-1 β , SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ , SDF-1 ϕ y similares o una forma madura de estos, o una mezcla de estos en cualquier proporción o similar. Preferiblemente, se utiliza SDF-1 α . A menudo, se hace referencia a SDF-1 como CXCL-12 o PBSF.

[0227] En algunas modalidades, uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SDF-1 pueden sustituirse, eliminarse y/o agregarse siempre que tenga la actividad de la quimiocina y, de manera similar, la cadena de azúcar puede sustituirse, eliminarse y/o agregarse. Una mutación de aminoácido es aceptable siempre que se mantengan al menos 4 residuos de cisteína (Cys30, Cys32, Cys55 y Cys71 en SDF-1 humano α) y se exhiba no menos del 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una sustancia natural. El SDF-1 se puede obtener de un mamífero, por ejemplo, un mamífero humano o no humano, como un mono, una oveja, un bovino, un caballo, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, una rata, un ratón y similares. Por ejemplo, la proteína registrada como número de acceso GenBank: NP_954637 puede usarse como SDF-1 humano α y la proteína registrada como número de acceso GenBank: NP_000600 se puede utilizar como SDF-1 β . En algunas modalidades, cuando la sustancia que provoca la transducción de señales de la vía de señalización del ligando de Flt3 es Flt3L, la concentración de Flt3L en el medio para la producción de una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8 es de alrededor de 1 ng/ml a 100 ng/ml, por ejemplo, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml, 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml, 9 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml o 100 ng/ml.

[0228] En algunas modalidades, cuando las sustancias que provocan la transducción de señales de la vía de señalización del kit o factor de células madre es SCF, el SCF se utiliza para la producción de la población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8 en las mismas condiciones descritas anteriormente.

[0229] En algunas modalidades, cuando la sustancia que provoca la transducción de señales de la vía de señalización de la trombopoyetina es TPO, se usa TPO para la producción de la población de células que comprende células con CD4 y CD8 en las mismas condiciones que se describieron anteriormente.

[0230] La fibronectina o una variante de esta para usar en la invención no está particularmente limitada siempre que sea una molécula capaz de unirse a células CD3 positivas. La variante de fibronectina no está particularmente limitada siempre que sea una molécula capaz de unirse a VLA-5 y VLA-4 en la superficie de células positivas para CD3, y los ejemplos de esta incluyen RetroNectin. La fibronectina y una variante de esta pueden estar presentes en cualquier forma en el medio. Por ejemplo, pueden estar contenidos en el medio durante el cultivo

o pueden estar inmovilizados en un contenedor de cultivo, y preferiblemente están inmovilizados en un contenedor de cultivo.

[0231] Cuando la fibronectina o una variante de esta esté contenida en un medio, el límite inferior de la concentración de fibronectina o una variante de esta no podrá ser inferior a 10 ng/ml, preferiblemente no menos de 100 ng/ml, y el límite superior no puede ser más de 10 000 µg/ml, preferiblemente no más de 1000 µg/ml.

[0232] En algunas modalidades, la concentración de IL-7 en el medio para usar en la producción de una población de células que comprende células con CD4 y CD8 es de alrededor de 1 ng/ml a 100 ng/ml, por ejemplo, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml, 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml, 9 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml o 100 ng/ml.

[0233] SDF-1 puede estar disponible comercialmente, purificado de la naturaleza o producido mediante síntesis de péptidos o técnicas de modificación genética. SDF-1 está contenido en un medio dentro del rango de, por ejemplo, alrededor de 10 ng/ml a alrededor de 100 ng/ml. Además, la alternativa de SDF-1 que tiene una actividad similar a SDF-1 también se puede usar en lugar de SDF-1. Los ejemplos de dicha alternativa de SDF-1 incluyen el agonista de CXCR4, y se puede añadir al medio un compuesto de bajo peso molecular que tiene una actividad de agonista de CXCR4 y similares en lugar de SDF-1.

[0234] En algunas modalidades, cuando el SDF-1 es SDF1 α , la concentración del SDF-1 α en el medio para la producción de población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8 es de alrededor de 1 nM a 100 nM, por ejemplo, 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 6 nM, 7 nM, 8 nM, 9 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM o 100 nM.

[0235] En algunas modalidades, cuando el inhibidor de p38 es SB203580, la concentración de SB203580 en el medio para la producción de la población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8 es de alrededor de 0,5 µM a 100 µM, por ejemplo, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 3 µM, 4 µM, 5 µM, 6 µM, 7 µM, 8 µM, 9 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM o 50 µM, 60 µM, 70 µM, 80 µM, 90 µM o 100 µM.

[0236] En algunas modalidades, el medio basal para la producción de una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8 incluyen medio α MEM suplementado con alrededor del 15 % de FBS, L-glutamina alrededor de 4 mM, alrededor de

100 U/ml de penicilina, alrededor de 100 µg/ml de estreptomicina, 2-mercaptoetanol alrededor de 55 µM, alrededor de 50 µg/ml de ácido ascórbico 2-fosfato, alrededor de 10 µg/ml de insulina humana, alrededor de 5,5 µg/ml de transferrina humana, alrededor de 6,7 ng/ml de selenito de sodio, alrededor de 50 ng/ml de SCF, alrededor de 50 ng/ml de IL-7, alrededor de 50 ng/ml de Flt3L, alrededor de 100 ng/ml de TPO, SB203580 alrededor de 15 µM, SDF-1 α alrededor de 30 nM.

[0237] En la producción de una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8, las células progenitoras hematopoyéticas pueden cultivarse mediante cultivo adherente o cultivo en suspensión. En algunas modalidades, el recipiente o placa de cultivo está recubierto con DLL1 o DLL4, o una proteína de fusión de DLL4 o DLL1 y Fc o similar. DLL1 o DLL4 pueden ser (rh)-DLL1 o rh-DLL4 humanos recombinantes. En algunas modalidades, el recipiente o placa de cultivo está recubierto con quimera rh-DLL4/Fc (Sino Biological) y RetroNectin (Takara Bio Inc). En casos de cultivo adherente, se puede utilizar un recipiente de cultivo recubierto y/o las células progenitoras hematopoyéticas pueden cultivarse en conjunto con células alimentadoras y/o similares. Ejemplos de células alimentadoras para el cultivo conjunto incluyen una línea de células estromales de médula ósea, células OP9 (disponibles en Riken BioResource Center). Las células OP9 pueden ser preferiblemente células OP-DLI, que expresan constantemente DIII (Holmes R I y Zuniga-Pflucker JC. Cold Spring Harb Protoc. 2009(2)). En algunas modalidades, cuando se utilizan células OP9 como células alimentadoras, se puede añadir al medio DIII o una proteína de fusión de DIII y Fc o similar, preparada por separado, para realizar el cultivo conjunto. En algunas modalidades, DIII puede incluir proteínas codificadas por un gen que tiene la secuencia de nucleótidos del número de acceso NCBI NM#005618 en el caso de humanos, o número de acceso NCBI NM#007865 en el caso de ratones; y mutantes naturales que tienen una identidad de secuencia alta (por ejemplo, que tienen una identidad de secuencia de no menos de 90%) con estas proteínas y una función equivalente. En los casos en que se utilizan células alimentadoras para la producción, una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8, las células alimentadoras pueden reemplazarse adecuadamente durante el cultivo. La sustitución de las células alimentadoras puede llevarse a cabo transfiriendo las células diana que se están cultivando a células alimentadoras que se sembraron previamente en placas. La sustitución podrá realizarse cada cinco días, cada cuatro días, cada tres días o cada dos días.

[0238] En algunas modalidades, las condiciones de temperatura de cultivo para el cultivo de la masa celular HP para la producción de una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8 es de alrededor de 37 °C a alrededor de 42 °C y de alrededor de 37 a alrededor de 39 °C. En algunas modalidades, el cultivo se puede llevar a cabo en condiciones de bajo oxígeno. Los ejemplos de las condiciones de bajo oxígeno incluyen 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, y concentraciones de oxígeno más bajas que estas. Los expertos en la materia pueden determinar adecuadamente el período de cultivo mediante el control del número de diferentes tipos de células, incluidas células con doble positivo CD4/CD8 y/o similares. Los ejemplos del período de cultivo incluyen no menos de 10 días, no menos de 12 días, no menos de 14 días, no menos de 16 días, no menos de 18 días, no menos de 20 días, no menos de 21 días, no menos de 23 días, no menos de 25 días, no menos de 28 días, no menos de 30 días, no menos de 35 días, o no menos de 42 días. En algunas otras modalidades, las células con doble positivo CD4/CD8 obtenidas del cultivo son una población celular que también contiene otras especies de células (masa de células DP).

[0239] En los casos en que se aísla una población de un tipo celular particular (p. ej., células CD4-/CD8+) de una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8, el aislamiento se puede llevar a cabo usando cualquier índice que incluya, entre otros, CD4, CD8, CD3 y CD45, dependiendo del tipo de célula que se esté aislando. El método de aislamiento puede ser un método conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, un método en el que las células se marcan con un anticuerpo particular (p. ej., anticuerpo CD4, CD8, CD3 o CD45) y luego se aíslan usando un citómetro de flujo, o un método en el que las células se purifican utilizando una columna de afinidad o similar en la que se inmoviliza un antígeno deseado.

Paso de inducción de células CD56+/CD3- de una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8

[0240] En algunas modalidades, las células NK son células inmunitarias CD56+/CD3-.

[0241] En algunas modalidades, las células NK se producen mediante un método que comprende el paso de cultivar una población celular que comprende células con doble positivo CD4/CD8 o una masa de células DP } en un medio complementado con vitamina C. En algunas modalidades, el medio de inducción de NK se usa para producir células CD56+/CD3-.

[0242] En algunas modalidades, el medio se prepara mediante la adición de vitamina C

a un medio basal que se usa para el cultivo de células animales. Los ejemplos del medio basal incluyen el medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), el medio 199, el medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), el medio α MEM, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el medio F12 de Ham, el medio RPMI 1640, el medio de Fischer y el medio Neurobasal. (Life Technologies), y mezclas de dos o más de estos medios. En algunas modalidades, el medio contiene suero. En algunas modalidades, el medio no contiene suero. Si fuera necesario, el medio basal también puede contener una o más sustancias tales como alúmina, insulina humana, transferrina humana, selenio o selenita de sodio, ácido graso, oligoelementos, 2-mercaptoetanol, tiol glicerol, lípidos, aminoácidos, glutamina, aminoácidos no esenciales, vitaminas, factores de crecimiento, compuestos de bajo peso molecular, antibióticos, antioxidantes, ácido pirúvico, amortiguadores, sales inorgánicas y citocinas.

[0243] En algunas modalidades, el medio utilizado para la producción de células NK positivas para CD56 contiene además un anticuerpo anti-CD3 (UCHT1) y citocinas. Los ejemplos de citocinas adecuadas incluyen IL-2 e IL-7.

[0244] El anticuerpo CD3 no está limitado siempre que reconozca específicamente CD3. En algunas modalidades, la concentración del anticuerpo CD3 en el medio de inducción de NK es de alrededor de 10 ng/ml a 1000 ng/ml, por ejemplo, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 300 ng/ml, 400 ng/ml, 500 ng/ml, 600 ng/ml, 700 ng/ml, 800 ng/ml, 900 ng/ml, o 1000 ng/ml.

[0245] En algunas modalidades, la vitamina C se usa para la producción de células K positivas para CD56 en las mismas condiciones descritas anteriormente.

[0246] En algunas modalidades, la concentración de IL-2 en el medio de inducción de NK para la producción de células NK positivas para CD56 es de alrededor de 1 U/ml a 1000 U/ml, por ejemplo, alrededor de 1 U/ml, 5 U/ml, 10 U/ml, 20 U/ml, 30 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml, 100 U/ml, 500 U/ml o 1000 U/ml. En algunas modalidades, la concentración de IL-2 en el medio de inducción de NK para la producción de células NK positivas para CD56 es de alrededor de 1 ng/ml a 100 ng/ml, por ejemplo, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml o 100 ng/ml.

[0247] En algunas modalidades, la concentración de IL-7 en el medio de inducción de NK para la producción de células NK con CD56 es de alrededor de 1 ng/ml a 100 ng/ml, por ejemplo,

1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml o 100 ng/ml.

[0248] En algunas modalidades, las condiciones de temperatura de cultivo para el cultivo de una población que comprende células con doble positivo CD4/CD8 para la producción de células NK positivas para CD56 es de alrededor de 37 °C a alrededor de 42 °C, o de alrededor de 37 a alrededor de 39 °C. Los expertos en la técnica determinarán de forma adecuada el período de cultivo mediante el monitoreo de la cantidad de células NK CD56 positivas y/o similares. El número de días del cultivo no está limitado siempre que se puedan obtener células NK positivas para CD56. Los ejemplos del período de cultivo incluyen al menos no menos de 1 día, no menos de 2 días, no menos de 3 días, no menos de 4 días, no menos de 5 días, no menos de 6 días o no menos de 7 días .

[0249] En algunas modalidades, las células NK CD56+ obtenidas pueden aislarse antes de su uso posterior. En algunas otras modalidades, las células NK positivas para CD56 obtenidas pueden usarse como una población celular que también contiene otras especies de células, incluidos los linfocitos T (masa de células NK).

[0250] En algunas modalidades, la masa de células NK puede incluir 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, o más del 90% de células NK. En algunas modalidades, la masa de células NK incluye alrededor del 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% de linfocitos T. En algunas modalidades, la masa de células NK incluye alrededor del 75 % de células NK CD56+/CD3- y alrededor del 25% de linfocitos T CD56+/CD3+. En algunas modalidades, la masa de células NK también puede incluir linfocitos B y monocitos.

[0251] En los casos en los que se aíslan las células NK CD56+, el método de aislamiento puede ser un método conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, un método en el que las células se marcan con un anticuerpo anti-CD56 y un anticuerpo anti-CD3, y luego se aíslan usando un citómetro de flujo (clasificación de células activadas por fluorescencia) o un método en el que las células se purifican usando una columna de afinidad o similar en la que se inmoviliza un antígeno deseado.

[0252] En algunas modalidades, las células NK positivas para CD56 son CD56+/CD3+. En algunas modalidades, las células NK con CD56 son CD56+/CD3-.

Preparación de células CAR-NK

[0253] En algunas modalidades, las células NK se modifican para comprender uno o más

transgenes. Por ejemplo, las células NK pueden manipularse genéticamente para expresar receptores de antígenos quiméricos dirigidos a tumores (CAR), produciendo así células efectoras antitumorales. En un ejemplo, la célula NK o la célula iPS NK pueden diseñarse para expresar CAR. En algunas modalidades, se modifica por ingeniería genética un precursor

5 celular de la célula NK para expresar un CAR. Por ejemplo, en algunas modalidades, la célula iPS está diseñada para expresar un CAR. En algunas modalidades, las células en la masa de células HP están diseñadas para expresar un CAR. En algunas modalidades, la célula NK está diseñada para expresar un CAR. Además, en algunas modalidades, estos receptores transgénicos pueden dirigirse a antígenos asociados a tumores que no se derivan de proteínas.

10 En ciertas modalidades, las células NK o las células NK iPS se modifican para comprender al menos un CAR. En algunas modalidades, un solo CAR se dirige a dos o más antígenos.

[0254] En algunas modalidades, las células iNK incluyen un receptor que es quimérico, no natural y diseñado. En algunas modalidades, el receptor de antígeno quimérico (CAR) diseñado tiene uno, dos, tres, cuatro o más componentes y, en algunas modalidades, uno o

15 más componentes facilitan el direccionamiento o la unión del linfocito a uno o más antígenos tumorales que comprenden células cancerosas.

[0255] En algunas modalidades, CAR generalmente comprende al menos un polipéptido transmembrana que comprende al menos un dominio de unión a ligando extracelular y un polipéptido transmembrana que comprende al menos un dominio de señalización intracelular,

20 de manera que los polipéptidos se ensamblan para formar un receptor de antígeno quimérico.

[0256] La expresión «dominio de unión a ligando extracelular», como se usa en el presente documento, se define como un oligopéptido o polipéptido que es capaz de unirse a un ligando. Preferiblemente, el dominio será capaz de interactuar con una molécula de superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando extracelular puede elegirse para reconocer

25 un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana asociadas con un estado de enfermedad particular.

[0257] En particular, el dominio de unión a ligando extracelular puede comprender un dominio de unión a antígeno derivado de un anticuerpo contra un antígeno de la diana.

[0258] En algunas modalidades, las células NK o las células NK iPS pueden modificarse genéticamente para expresar uno o más receptores de antígenos quiméricos (CAR). En algunas

30 implementaciones, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio de unión a ligando

extracelular que se dirige a un antígeno tumoral seleccionado de uno o más de los siguientes: CD44, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD89, CD123, CS-1, ROR1, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2, CEA, MAGE A3 TCR, EGFR, HER2/ERBB2/neu, EPCAM, EphA2, CEA, BCMA. En algunas modalidades, el antígeno tumoral es CD19.

5 **[0259]** En algunas modalidades, el dominio de unión a ligando extracelular es un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) que comprende el fragmento variable ligero (VL) y pesado (VH) de un anticuerpo monoclonal específico de antígeno diana unido por un enlazador flexible.

[0260] En algunas modalidades, CAR incluye un dominio transmembrana. En algunas
10 modalidades, el dominio transmembrana comprende además una región de tallo entre el dominio de unión al ligando extracelular y el dominio transmembrana. La expresión «región de tallo» utilizado en este documento generalmente significa cualquier oligopéptido o polipéptido cuya función es enlazar el dominio transmembrana al dominio de unión a ligando extracelular. En particular, la región de tallo se usa para proporcionar más flexibilidad y accesibilidad para el
15 dominio de unión al ligando extracelular. Una región de tallo puede comprender hasta 300 aminoácidos, 10 a 100 aminoácidos y/o 25 a 50 aminoácidos. Una región de tallo puede derivar de la totalidad o parte de las moléculas naturales, como de la totalidad o parte de la región extracelular de CD8, CD4 o CD28, o de la totalidad o parte de la región constante de un anticuerpo. Alternativamente, la región de tallo puede ser una secuencia sintética que
20 corresponde a una secuencia de tallo natural o puede ser una secuencia de tallo completamente sintética. En una modalidad preferida, dicha región de tallo es una parte de la cadena alfa del CD8 humano.

[0261] En algunas modalidades, CAR contiene un dominio de transducción de señales o un dominio de señalización intracelular que contribuye a la señalización intracelular después de
25 la unión del dominio de unión al ligando extracelular a la diana, lo que da como resultado la activación de la célula NK iPS y la respuesta inmunitaria. La expresión «dominio de transducción de señales» se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal de función efectora y dirige a la célula para que realice una función especializada. En algunas modalidades, las células NK iPS tienen un CAR que incluye un dominio de transducción de señales.

30 **[0262]** En algunas modalidades, las células NK iPS se modifican genéticamente para expresar el complejo IL-15R α /IL-15.

[0263] En algunas modalidades, los polipéptidos transmembrana comprenden la capacidad de expresarse en la superficie de una célula inmunitaria, por ejemplo, en células NK iPS, y de interactuar entre sí para dirigir la respuesta celular de la célula inmunitaria contra una célula diana predefinida. Los diferentes polipéptidos transmembrana del CAR que comprenden un dominio de unión a ligando extracelular y/o un dominio de transducción de señales interactúan juntos para participar en la transducción de señales después de la unión con un ligando diana e inducen una respuesta inmunitaria. El dominio transmembrana puede provenir de una fuente natural o sintética. El dominio transmembrana puede derivar de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana.

[0264] En algunas modalidades, la modificación genética de las células NK para expresar CAR puede incluir pasos de: (1) sintetizar un gen correspondiente a un CAR específico; (2) preparar un vector que contenga el gen correspondiente al CAR y (3) transducir las células NK CD56+ con el vector que contiene el gen del CAR.

[0265] Los vectores de expresión que codifican los CAR pueden introducirse como una o más moléculas o construcciones de ADN, donde puede haber al menos un marcador que permita la selección de células hospedadoras que contienen la construcción o construcciones.

[0266] Las construcciones se pueden preparar de formas convencionales, donde los genes y las regiones reguladoras se pueden aislar, según corresponda, ligarse, clonarse en un hospedador de clonación apropiado, analizarse por restricción o secuenciación, u otros medios convenientes. Particularmente, usando PCR, pueden aislarse fragmentos individuales que incluyen la totalidad o partes de una unidad funcional, donde una o más mutaciones pueden introducirse usando «reparación de cebadores», ligación, mutagénesis in vitro, etc., según corresponda. La construcción o construcciones, una vez completadas y que se demostró que tienen las secuencias apropiadas, pueden introducirse en el CTL por cualquier medio conveniente. Las construcciones pueden integrarse y empaquetarse en genomas virales defectuosos no replicantes como adenovirus, virus adenoasociados (AAV) o virus del herpes simple (HSV) u otros, incluidos vectores retrovirales o vectores lentivirales, para infección o transducción en células. Las construcciones pueden incluir secuencias virales para transfección, si se desea. Alternativamente, la construcción se puede introducir por fusión, electroporación, biolística, transfección, lipofección o similares. Las células hospedadoras pueden crecer y expandirse en cultivo antes de la introducción de la construcción o

construcciones, seguido del tratamiento apropiado para la introducción de la(s) construcción(es) y la integración de la(s) construcción(es). A continuación, las células se expanden y se examinan en virtud de un marcador presente en la construcción. Varios marcadores que pueden usarse con éxito incluyen hprt, resistencia a neomicina, timidina cinasa, resistencia a higromicina, etc.

[0267] En algunos casos, uno puede tener un sitio diana para la recombinación homóloga, donde se desea que una construcción se integre en un locus particular. Por ejemplo, puede anular un gen endógeno y reemplazarlo (en el mismo locus o en otro lugar) con el gen codificado por la construcción utilizando materiales y métodos conocidos en la técnica para la recombinación homóloga. Para la recombinación homóloga, se puede usar .OMEGA. o vectores O.

[0268] Las construcciones pueden introducirse como una sola molécula de ADN que codifica al menos CAR y, opcionalmente, otro gen, o diferentes moléculas de ADN que tienen uno o más genes. Otros genes incluyen genes que codifican moléculas terapéuticas o genes suicidas, por ejemplo. Las construcciones pueden introducirse simultánea o consecutivamente, cada uno con los mismos o diferentes marcadores.

[0269] Vectores que contienen elementos útiles, como orígenes de replicación bacterianos o de levaduras, marcadores seleccionables y/o amplificables, elementos promotores o potenciadores para la expresión en procariotas o eucariotas, etc. que pueden usarse para preparar reservas de ADN de la construcción y para llevar a cabo transfecciones son conocidos en la técnica, y muchos están disponibles comercialmente.

Métodos de uso

[0270] Las células según la invención pueden usarse para tratar cáncer, infecciones virales o trastornos autoinmunitarios en un paciente que lo necesite. En otra modalidad, dicha célula aislada según la invención se puede utilizar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer, infecciones virales o trastornos autoinmunitarios en un paciente que lo necesite.

[0271] La presente invención se basa en métodos para tratar a pacientes que lo necesitan, dicho método comprende al menos uno de los siguientes pasos: (a) proporcionar células receptoras de antígenos quiméricos según la invención y (b) administrar las células a dicho paciente.

[0272] Dicho tratamiento puede ser mejorador, curativo o profiláctico. Puede ser parte de una inmunoterapia autóloga o parte de un tratamiento de inmunoterapia alogénica. Por autólogo, se entiende que las células, la línea celular o la población de células utilizadas para el tratamiento de pacientes proceden de dicho paciente o de un donante compatible con el antígeno leucocitario humano (HLA). Por alogénico se entiende que las células o población de células utilizadas para tratar pacientes no proceden de dicho paciente sino de un donante.

[0273] En algunas modalidades, las células descritas son alogénicas. En algunas modalidades, las células descritas son autólogas.

[0274] El tratamiento se puede usar para tratar pacientes diagnosticados con cáncer, infección viral, trastornos autoinmunitarios o enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD). Los cánceres que pueden tratarse incluyen tumores que no están vascularizados, o que aún no están sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores no sólidos (tales como tumores hematológicos, por ejemplo, leucemias y linfomas) o pueden comprender tumores sólidos. Los tipos de cánceres a tratar con los CAR de la invención incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas leucemias o neoplasias linfoides, tumores benignos y malignos y neoplasias, p. ej., sarcomas, carcinomas y melanomas. También están incluidos tumores y cánceres pediátricos y tumores y cánceres en adultos.

[0275] En algunas modalidades, el tratamiento se combina con una o más terapias contra el cáncer seleccionadas del grupo de terapia con anticuerpos, quimioterapia, terapia con citocinas, terapia con células dendríticas, terapia génica, terapia hormonal, terapia con luz láser y radioterapia.

[0276] En algunas modalidades, dicho tratamiento se puede administrar a pacientes que se someten a un tratamiento inmunosupresor.

[0277] En una modalidad adicional, las composiciones celulares se administran a un paciente en combinación con una o más terapias adicionales. Por ejemplo, en algunas modalidades, las composiciones celulares se administran a un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después) de un trasplante de médula ósea, terapia de ablación de linfocitos T usando agentes de quimioterapia tales como fludarabina, radiación de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos como OKT3 o CAM PATH. En otra modalidad, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de una terapia de eliminación de

linfocitos B, como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una modalidad, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta, seguido de un trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertas modalidades, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En una modalidad adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía. Dichas células modificadas obtenidas por cualquiera de los métodos descritos aquí pueden usarse en un aspecto particular de la invención para tratar a pacientes que lo necesitan contra el rechazo del hospedador contra el injerto (HvG) y la enfermedad del injerto contra el hospedador (GvHD); por lo tanto, en el alcance de la presente invención hay un método para tratar a pacientes que lo necesitan contra el rechazo del hospedador contra el injerto (HvG) y la enfermedad del injerto contra el hospedador (GvHD) que comprende tratar a dicho paciente administrándole una cantidad eficaz de células modificadas que comprenden genes TCR alfa y/o TCR beta inactivados.

Administración de células

[0278] En algunas modalidades, las células se pueden introducir en un organismo hospedador, por ejemplo, un mamífero, en una amplia variedad de formas. Las células pueden introducirse en el sitio del tumor, en modalidades específicas, aunque en modalidades alternativas las células se adaptan al cáncer o se modifican para adaptarse al cáncer. La cantidad de células que se emplean dependerá de una serie de circunstancias, el propósito de la introducción, la vida útil de las células, el protocolo que se utilizará, por ejemplo, el número de administraciones, la capacidad de multiplicación de las células, la estabilidad de la construcción recombinante y similares. Las células pueden aplicarse como una dispersión, generalmente inyectándose en o cerca del sitio de interés. Las células pueden encontrarse en un medio fisiológicamente aceptable. En un ejemplo, las células NK o las células NK iPS de la presente invención pueden expresar uno o más CAR, TCR o cualquier otro dominio proteico o polipeptídico diseñado, como CD16 de alta afinidad. En algunas modalidades, las células se encapsulan para inhibir el reconocimiento inmunitario. y colocado en el sitio del tumor.

[0279] Las células pueden administrarse como se desee. Dependiendo de la respuesta deseada, la forma de administración, la vida de las células, el número de células presentes, se pueden emplear varios protocolos. El número de administraciones dependerá de los factores descritos anteriormente al menos en parte.

[0280] La administración de las células o población de células según la presente invención se puede realizar de cualquier manera conveniente, incluso mediante inhalación, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante de aerosol. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intraganglionar, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa o intralinfática, o intraperitoneal. En una modalidad, las composiciones celulares de la presente invención se administran preferentemente mediante inyección intravenosa.

Sistemas de expresión basados en ácidos nucleicos

[0281] En algunas modalidades, las células NK o las células NK iPS de la invención se modifican para expresar uno o más CAR, TCR o cualquier otro dominio proteico o polipeptídico modificado, como CD16 o CD19 de alta afinidad. Las técnicas recombinantes para generar vectores de expresión que comprenden estos polipéptidos son bien conocidas en la técnica y se describen en general a continuación.

Vectores

[0282] El término «vector» se usa para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico para introducirla en una célula donde se puede replicar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser «exógena», lo que significa que es extraña a la célula en la que se introduce el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en la que la secuencia normalmente no se encuentra. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus de plantas) y cromosomas artificiales (p. ej., YAC). Un experto en la técnica estaría bien equipado para construir un vector a través de técnicas recombinantes estándares (ver, por ejemplo, Maniatis et ál., 1988 y Ausubel et ál., 1994, ambos incorporados aquí mediante esta referencia).

[0283] La expresión «vector de expresión» hace referencia a cualquier tipo de construcción genética que comprenda un ácido nucleico que codifique un ARN capaz de ser transcrito. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen luego en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de «secuencias de control», que hacen referencia a secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la transcripción y posible traducción de una secuencia codificante

enlazada de manera operativa en una célula hospedadora particular. Además de las secuencias de control que rigen la transcripción y traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener asimismo secuencias de ácido nucleico que cumplan otras funciones y se describirán más adelante.

5 Promotores y potenciadores

[0284] Un «promotor» es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controlan la iniciación y la tasa de transcripción. Puede contener elementos genéticos a los que se pueden unir proteínas y moléculas reguladoras, como la ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácido nucleico. Las frases «posicionado operativamente», «enlazado operativamente», «bajo control» y «bajo control transcripcional» significan que un promotor está en una ubicación funcional y/u orientación correcta en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar la iniciación transcripcional y/o la expresión de esa secuencia.

[0285] Un promotor generalmente comprende una secuencia que funciona para posicionar el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El ejemplo más conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, como, por ejemplo, el promotor del gen de la desoxinucleotidiltransferasa terminal de mamíferos y el promotor de los genes tardíos SV40, un elemento discreto que recubre el sitio de inicio mismo ayuda a fijar el lugar de iniciación. Los elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Por lo general, estos están ubicados en la región 30 110 pb antes del sitio de inicio, aunque se ha demostrado que varios promotores contienen elementos funcionales después del sitio de inicio también. Para poner una secuencia codificante «bajo el control de» un promotor, se coloca el extremo 5' del sitio de iniciación de la transcripción del marco de lectura transcripcional «corriente abajo» (es decir, en dirección 3') del promotor elegido. El promotor «corriente arriba» estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

[0286] El espacio entre los elementos promotores suele ser flexible, de modo que la función promotora se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven unos con respecto a otros. En el promotor tk, la separación entre los elementos del promotor se puede aumentar a 50 pb antes de que la actividad comience a disminuir. Según el promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independiente para

activar la transcripción. Un promotor puede usarse o no junto con un «potenciador», que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en *cis* implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

[0287] Un promotor puede estar asociado naturalmente con una secuencia de ácido nucleico, como puede obtenerse aislando las 5 secuencias no codificantes ubicadas corriente arriba del segmento codificante y/o exón. Tal promotor puede denominarse «endógeno». De manera similar, un potenciador puede estar asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, ubicado corriente abajo o corriente arriba de esa secuencia. Alternativamente, se obtendrán ciertas ventajas colocando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor heterólogo o recombinante, que se refiere a un promotor que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores o potenciadores que no se produzcan «naturalmente», es decir, que contengan diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que se usan más comúnmente en la construcción de ADN recombinante incluyen los sistemas promotores de lactamasa (penicilinas), lactosa y triptófano (trp). Además de producir secuencias de ácidos nucleicos de promotores y potenciadores de forma sintética, las secuencias se pueden producir mediante clonación recombinante y/o tecnología de amplificación de ácidos nucleicos, incluida la PCR™, en relación con las composiciones descritas en el presente documento (véanse las patentes de EE.UU. N.º 4 683 202 y 5 928 906, cada una de las cuales se incorpora aquí mediante esta referencia). Además, se contempla que también se pueden emplear las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias dentro de orgánulos no nucleares, tales como mitocondrias, cloroplastos y similares.

[0288] Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el orgánulo, tipo de célula, tejido, órgano u organismo elegido para la expresión. Los expertos en la técnica de la biología molecular generalmente conocen el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos de

células para la expresión de proteínas (véase, por ejemplo, Sambrook et ál. 1989, incorporado aquí mediante esta referencia). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles y/o útiles en las condiciones apropiadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de péptidos y/o proteínas recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

[0289] Además, cualquier combinación de promotor y potenciador también podría usarse para impulsar la expresión. El uso de un sistema de expresión citoplasmático T3, T7 o SP6 es otra modalidad posible. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplasmática de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana adecuada, ya sea como parte del complejo de entrega o como una construcción de expresión genética adicional.

[0290] La identidad de los elementos o promotores específicos de tejido, así como los ensayos para caracterizar su actividad, es conocida por los expertos en la técnica.

[0291] También se puede requerir una señal de iniciación específica para la traducción eficiente de las secuencias de codificación. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Es posible que sea necesario proporcionar señales de control de traducción exógenas, incluido el codón de iniciación ATG. Un experto en la materia sería fácilmente capaz de determinar esto y proporcionar las señales necesarias.

[0292] En ciertas modalidades de la invención, el uso de elementos de sitios internos de entrada de ribosomas (IRES) se usa para crear mensajes multigénicos o policistrónicos, y estos pueden usarse en la invención.

[0293] Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de los cuales puede usarse junto con tecnología recombinante estándar para digerir el vector. «Digestión con enzimas de restricción» se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solo en ubicaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles comercialmente. Los expertos en la técnica entienden ampliamente el uso de dichas enzimas. Con frecuencia, un vector se linealiza o se fragmenta usando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para permitir que las secuencias exógenas se unan al vector. «Ligadura» se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden o no ser contiguos entre sí. Las técnicas que implican enzimas de restricción y

reacciones de ligamiento son bien conocidas por los expertos en la técnica de la tecnología recombinante.

[0294] También pueden emplearse sitios de empalme, señales de terminación, orígenes de replicación y marcadores seleccionables.

5 Vectores de plásmidos

[0295] En determinadas modalidades, se contempla un vector de plásmido para su uso para transformar una célula hospedadora. En general, los vectores plásmidos que contienen un replicón y secuencias de control que se derivan de una especie compatible con la célula hospedadora se utilizan en conexión con estos hospedadores. El vector usualmente contiene un sitio de replicación, así como también secuencias que codifican proteínas que son capaces de proveer selección fenotípica en células transformadas. En un ejemplo no limitante, *E. coli* a menudo se transforma usando derivados de pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. El pBR322 contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina y, por lo tanto, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. El plásmido pBR u otro plásmido o fago microbiano también debe contener, o modificarse para contener, por ejemplo, promotores que pueden ser utilizados por el organismo microbiano para la expresión de sus propias proteínas.

[0296] Además, los vectores de fagos que contienen un replicón y secuencias de control compatibles con el microorganismo hospedador pueden usarse como vectores de transformación en conexión con estos hospedadores. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago como lambda GEM.TM.11 en la producción de un vector de fago recombinante que se puede utilizar para transformar células hospedadoras susceptibles, tal como *E. coli* LE392.

[0297] Otros vectores de plásmidos útiles incluyen vectores pIN (Inouye et ál., 1985) y vectores pGEX, para su uso en la generación de proteínas de fusión solubles de glutatión S transferasa (GST) para su posterior purificación y separación o escisión. Otras proteínas de fusión adecuadas son aquellas con galactosidasa, ubiquitina y similares.

[0298] Las células hospedadoras bacterianas, por ejemplo, *E. coli*, que comprenden el vector de expresión, se cultivan en cualquiera de varios medios adecuados, por ejemplo, LB. La expresión de la proteína recombinante en ciertos vectores se puede inducir, como entenderán los expertos en la técnica, poniendo en contacto una célula hospedadora con un

agente específico para ciertos promotores, por ejemplo, agregando IPTG al medio o cambiando la incubación a una temperatura más alta. Después de cultivar las bacterias durante un período adicional, generalmente de entre 2 y 24 h, las células se recogen por centrifugación y se lavan para eliminar los medios residuales.

5 Vectores virales

[0299] La capacidad de ciertos virus para infectar células o ingresar a las células a través de endocitosis mediada por receptores, y para integrarse en el genoma de la célula hospedadora y expresar genes virales de manera estable y eficiente, los ha convertido en candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos extraños a las células (p. ej., células de mamíferos). Los componentes de la presente invención pueden ser un vector viral que codifique uno o más CAR, TCR o cualquier otra proteína o dominio polipeptídico modificado, como el CD16 de alta afinidad de la invención. A continuación, se describen ejemplos no limitantes de vectores de virus que pueden usarse para administrar un ácido nucleico de la presente invención.

15 Vectores adenovirales

[0300] Un método particular para la administración del ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Aunque se sabe que los vectores de adenovirus tienen una baja capacidad de integración en el ADN genómico, esta característica se ve contrarrestada por la alta eficiencia de transferencia de genes que ofrecen estos vectores. «Vector de expresión de adenovirus» pretende incluir aquellas construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetamiento de la construcción y (b) expresar finalmente una construcción específica de tejido o célula que se ha clonado en ella. El conocimiento de la organización genética o adenovirus, un virus de ADN de doble cadena lineal de 36 kb, permite la sustitución de grandes fragmentos de ADN adenoviral con secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992).

25 Vectores AAV

[0301] El ácido nucleico puede introducirse en la célula usando transfección asistida por adenovirus. Se han informado eficiencias de transfección aumentadas en sistemas celulares que utilizan sistemas acoplados de adenovirus (Kelleher y Vos, 1994; Cotten et ál., 1992; Curiel, 1994). El virus adenoasociado (AAV) es un sistema de vector atractivo para usar en las células de la presente invención, ya que tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar células

que no se dividen, lo que lo hace útil para la administración de genes en células de mamíferos, por ejemplo, en cultivo de tejidos (Muzyczka, 1992) o in vivo. El AAV tiene una amplia gama de hospedadores para la infectividad (Tratschin et ál., 1984; Laughlin et ál., 1986; Lebkowski et ál., 1988; McLaughlin et ál., 1988). Los detalles relacionados con la generación y el uso de vectores rAAV se describen en las patentes de EE.UU. N.º 5 139 941 y 4 797 368, cada una incorporada aquí mediante esta referencia.

Vectores retrovirales

[0302] Los retrovirus son útiles como vectores de distribución debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma hospedador, transfiriendo una gran cantidad de material genético extraño, infectando un amplio espectro de especies y tipos de células y empaquetándose en líneas celulares especiales (Miller, 1992).

[0303] Para construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico (p. ej., uno que codifica la secuencia deseada) en el genoma viral en lugar de ciertas secuencias virales para producir un virus que es defectuoso en la replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes *gag*, *pol* y *env*, pero sin los componentes LTR y de empaquetamiento (Mann et ál., 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con la LTR retroviral y las secuencias de empaquetamiento se introduce en una línea celular especial (p. ej., por precipitación con fosfato de calcio), la secuencia de empaquetamiento permite que la transcripción de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas virales, que luego se secretan en los medios de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et ál., 1983). A continuación, se recogen los medios que contienen los retrovirus recombinantes, se concentran opcionalmente y se utilizan para la transferencia de genes. Los vectores retrovirales pueden infectar una amplia variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de las células hospedadoras (Paskind et ál., 1975).

[0304] Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovirales comunes *gag*, *pol* y *env*, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivirales son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Naldini et ál., 1996; Zufferey et ál., 1997; Blomer et ál., 1997; patentes de EE.UU. N.º 6 013 516 y 5 994 136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de inmunodeficiencia humana: VIH-1, VIH-2 y el virus de inmunodeficiencia de los simios: SIV. Los vectores lentivirales se han generado

mediante la atenuación múltiple de los genes de virulencia del VIH, por ejemplo, los genes *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* se eliminan haciendo que el vector sea biológicamente seguro.

[0305] Los vectores lentivirales recombinantes son capaces de infectar células que no se dividen y se pueden usar para la transferencia de genes y la expresión de secuencias de ácidos nucleicos tanto in vivo como ex vivo. Por ejemplo, un lentivirus recombinante capaz de infectar una célula que no se divide en donde una célula hospedadora adecuada se transfecta con dos o más vectores que llevan las funciones de empaquetamiento, concretamente *gag*, *pol* y *env*, así como *rev* y *tat*, se describe en la patente de EE.UU. N.º 5 994 136, incorporada aquí mediante esta referencia. Uno puede dirigirse al virus recombinante mediante el enlace de la proteína de la cubierta con un anticuerpo o un ligando particular para dirigirse a un receptor de un tipo de célula particular. Mediante la inserción de una secuencia (incluida una región reguladora) de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica el ligando de un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector ahora es específico de la diana.

15 **Terapia de combinación**

[0306] En ciertas modalidades de la invención, los métodos de la presente invención para aspectos clínicos se combinan con otros agentes efectivos en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, tales como agentes anticancerosos. Un agente «anticanceroso» es capaz de afectar negativamente al cáncer en un sujeto, por ejemplo, al destruir células cancerosas, inducir la apoptosis en las células cancerosas, reducir la tasa de crecimiento de las células cancerosas, reducir la incidencia o el número de metástasis, reducir el tamaño del tumor, inhibir el crecimiento tumoral, reducir el suministro de sangre a un tumor o células cancerosas, promover una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas o un tumor, prevenir o inhibir la progresión del cáncer, o aumentar la esperanza de vida de un sujeto con cáncer. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad combinada eficaz para destruir o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar poner en contacto las células cancerosas con la construcción de expresión y el agente o agentes o factores múltiples al mismo tiempo. Esto se puede lograr poniendo en contacto la célula con una sola composición o formulación farmacológica que incluya ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas al mismo tiempo, donde una composición incluye la construcción de expresión y la otra incluye el segundo agente(s).

[0307] La resistencia de las células tumorales a los agentes de quimioterapia y radioterapia representa un problema importante en oncología clínica. Uno de los objetivos de la investigación actual sobre el cáncer es encontrar formas de mejorar la eficacia de la quimioterapia y la radioterapia combinándolas con otras terapias. En el contexto de la presente invención, se contempla que la terapia celular podría usarse de forma similar junto con una intervención quimioterapéutica, radioterapéutica o inmunoterapéutica, así como agentes reguladores del ciclo celular o proapoptóticos.

[0308] Alternativamente, la terapia puede preceder o seguir al tratamiento con otro agente en intervalos que van desde minutos hasta semanas. En las modalidades en las que el otro agente y la presente invención se aplican por separado al individuo, generalmente se aseguraría de que no transcurriera un período de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de modo que el agente y la terapia inventiva aún pudieran ejercer un efecto combinado beneficioso sobre la célula. En tales casos, se contempla que uno puede poner en contacto la célula con ambas modalidades en un período de alrededor de 12-24 horas entre sí y, más preferiblemente, de alrededor de 6-12 horas entre sí. Sin embargo, en algunas situaciones, puede ser deseable extender significativamente el período de tiempo para el tratamiento, donde varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) transcurren entre las respectivas administraciones.

[0309] En algunas modalidades, los ciclos de tratamiento se repiten según sea necesario. También se contempla que pueden aplicarse diversas terapias estándares, así como intervenciones quirúrgicas, en combinación con la terapia celular de la invención.

Quimioterapia

[0310] Las terapias contra el cáncer también incluyen una variedad de terapias combinadas con tratamientos químicos y basados en radiación. Las quimioterapias combinadas incluyen, por ejemplo, abraxano, altretamina, docetaxel, herceptina, metotrexato, novantrona, zoladex, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier análogo o variante derivada de los anteriores y también

combinaciones de estos.

[0311] En modalidades específicas, la quimioterapia para el individuo se emplea junto con la invención, por ejemplo, antes, durante y/o después de la administración de la invención Radioterapia

5 **[0312]** Otros factores que causan daños en el ADN y que se han utilizado ampliamente incluyen lo que comúnmente se conoce como rayos gamma, rayos X y/o la entrega dirigida de radioisótopos a las células tumorales. También se contemplan otras formas de factores que dañan el ADN tales como microondas y radiación UV. Es muy probable que todos estos factores produzcan una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación
10 y reparación del ADN y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens para períodos prolongados (3 a 4 semanas), a dosis únicas de entre 2000 y 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían en gran medida y dependen de la semivida del isótopo, la potencia y el tipo de radiación emitida, así como la absorción de las células neoplásicas.

15 **[0313]** Los términos «en contacto» y «expuesto», cuando se aplican a una célula, se utilizan aquí para describir el proceso mediante el cual una construcción terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se administran a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para lograr la destrucción o estasis celular, ambos agentes se administran a una célula en una cantidad combinada eficaz para destruir la célula o
20 evitar que se divida.

Inmunoterapia

[0314] La inmunoterapia generalmente se basa en el uso de células y moléculas efectoras inmunitarias para atacar y destruir las células cancerosas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una
25 célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como efector de la terapia o puede reclutar otras células para efectuar realmente la destrucción celular. El anticuerpo también se puede conjugar a un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionúclido, cadena de ricina A, toxina de cólera, toxina Pertussis, etc.) y servir meramente como un agente de direccionamiento. De manera alternativa, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula de superficie que interactúa,
30 ya sea directa o indirectamente, con una diana de célula tumoral. Varias células efectoras incluyen células NK y linfocitos T citotóxicos.

[0315] La inmunoterapia distinta de la terapia de la invención descrita en el presente documento podría utilizarse como parte de una terapia combinada junto con la presente terapia celular. El enfoque general para la terapia combinada se analiza a continuación. Generalmente, la célula tumoral debe llevar algún marcador que sea susceptible de direccionamiento, es decir, que no esté presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos pueden ser adecuados para dirigirse en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen PD-1, PD-L1, CTLA4, antígeno carcinoembrionario, antígeno prostático específico, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno sialil Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p155.

Genes

[0316] En otra modalidad más, el tratamiento secundario es una terapia génica en la que se administra un polinucleótido terapéutico antes, después o al mismo tiempo que las modalidades clínicas de la presente invención. La invención abarca una variedad de productos de expresión, incluidos los inductores de la proliferación celular, los inhibidores de la proliferación celular o los reguladores de la muerte celular programada.

Cirugía

[0317] Aproximadamente el 60% de las personas con cáncer se someterán a algún tipo de cirugía, que incluye cirugía preventiva, diagnóstica o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento para el cáncer que se puede usar junto con otras terapias, como el tratamiento de la presente invención, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

[0318] La cirugía curativa incluye resección en la que todo o parte del tejido canceroso se quita, extirpa y/o destruye físicamente. La resección tumoral se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección de tumores, el tratamiento quirúrgico incluye cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada miscópicamente (cirugía de Mohs). Se contempla además que la presente invención se puede usar junto con la eliminación de cánceres superficiales, precánceres o mínimas cantidades de tejido normal.

[0319] Tras la escisión de parte de todas las células, tejidos o tumores cancerosos, se puede formar una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede lograr mediante perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia anticancerosa adicional. Tal

tratamiento se puede repetir, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser de dosificaciones variadas también.

EJEMPLOS

- 5 **[0320]** Otras características, objetos y ventajas de la presente invención son evidentes en los ejemplos que siguen. Debe entenderse, sin embargo, que, si bien indican modalidades de la presente divulgación, los ejemplos se brindan únicamente a modo de ilustración y no son taxativos. Varios cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de los ejemplos.

10 ***Ejemplo 1. Diferenciación de células iPS en masa de células HP***

- [0321]** La cepa Ffl-01s04, una cepa de células iPS, se derivó de células mononucleares de sangre periférica de un individuo sano. Se sembraron 6×10^5 células/pocillo de células Ffl-01s04 dispersas en medio completo StemFit en una placa de 6 pocillos tratada con adhesión ultrabaja en condiciones de bajo oxígeno (5% O₂) (Día 0). El medio completo StemFit incluía
- 15 CHIR99021 10 μ M y Y-27632 50 μ M. Al día siguiente (es decir, el día 1), las células Ffl-01s04 se dispersaron en un medio de diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) que contenía BMP4 (50 ng/ml), VEGF (50 ng/ml), bFGF (50 ng/ml) y ácido ascórbico 2-fosfato (50 μ g/ml). El medio de inducción de HPC incluía StemPro34 suplementado con insulina humana (10 μ g/ml), transferrina humana (5,5 μ g/ml), selenito de sodio (6,7 ng/ml), L-glutamina
- 20 (2 mM) y α -monotioglicerol (0,4 mM). El día 2, se añadió SB431542 (6 μ M en medio) al medio de cultivo (es decir, células que contenían medio de diferenciación HPC), y las células se cultivaron durante 2 días. El día 4, las células se redispersaron en otro medio que contenía VEGF (50 ng/ml), bFGF (50 ng/ml), SCF (50 ng/ml) y ácido ascórbico 2-fosfato (50 μ g/ml), y se cultivó durante 3 días más. El día 7, las células se expusieron a otro medio que contenía VEGF
- 25 (50 ng/ml), bFGF (50 ng/ml), SCF (50 ng/ml), ácido ascórbico 2-fosfato (50 μ g/ml), TPO (30 ng/ml) y Flt3L (10 ng/ml), y se cultivó usando este medio durante 7 días adicionales. El medio se cambió cada 2-3 días durante este período de cultivo de 7 días.

Ejemplo 2. Diferenciación de la masa de células HP en una población que comprende CD4/CD8

- 30 En el día 14, la población de células obtenida del ejemplo 1 sin someterse a ningún aislamiento celular (masa de células HP) se sembró en placas de 15 cm como $3,12 \times 10^6$ células/placa y se

cultivaron a 37°C en 5% de O₂. Se observa que se pueden usar varias densidades de siembra, y la densidad de siembra mencionada anteriormente es una modalidad. Cada placa de 15 cm se cubrió con quimera Fc/rh-DLL4 (Sino Biological) y RetroNectin (Takara Bio Inc). Se cambió el medio cada 2-3 días durante el período de cultivo. MEM α (Thermo Fisher Scientific (Gibco))
 5 suplementado con FBS al 15 %, L-glutamina 4 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2-mercaptoetanol 55 µM, 50 µg/ml de ácido ascórbico 2-fosfato, 10 µg/ml de insulina humana, 5,5 µg/ml de transferrina humana, 6,7 ng/ml de selenito de sodio, 50 ng/ml de SCF, 50 ng/ml de IL-7, 50 ng/ml de Flt3L, 100 ng/ml de TPO, SB203580 15 µM, SDF-1 α 30 nM se usó como medio para cultivar estas células. El día 21, las células se pasaron a placas nuevas
 10 de 15 cm recién cubiertas con hDLL4/RetroNectin. En el día 28, se volvió a pasar las células a placas de 15 cm recubiertas recientemente con hDLL4/RetroNectin. El día 35, se recogieron todas las células, incluidas CD4/CD8, entre otras, (masa de células DP).

Ejemplo 3. Diferenciación de masa de células DP a masa de células NK

[0322] El día 35, se sembró la masa de células DP, es decir, las células obtenidas del
 15 ejemplo 2 sin someterse a ningún aislamiento celular, en una placa de 48 pocillos a 1 x 10⁶ células/pocillo y se cultivaron en 5% de CO₂ a 37°C durante tres días. El medio MEM α suplementado con 15% FBS, L-glutamina 4 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 ng/ml de estreptomicina, 50 µg/ml de ácido ascórbico 2-fosfato, 10 µg/ml de insulina humana, 5,5 µg/ml de transferrina humana, 6,7 ng/ml de selenito de sodio, 500 ng/ml de anticuerpo anti-CD3
 20 (UCHT1), 10 ng/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-7 se usó como medio de cultivo. En el día 38, las células se dispersaron en otro medio MEM α complementado con FBS al 15%, y se usaron L-glutamina 4 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 ng/ml de estreptomicina, 50 µg/ml de 2-fosfato de ácido ascórbico, 10 µg/ml de insulina humana, 5,5 µg/ml de transferrina humana, 6,7 ng/ml de selenita de sodio, 10 ng/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-7 como medio de cultivo. El día 42, se
 25 recogieron todas las células, incluidas las células NK (masa de células NK).

Ejemplo 4. Análisis de citometría de flujo

[0323] A continuación, la masa de células NK se tiñó con un conjunto de anticuerpos enumerados en la **Tabla 1** y se analizó mediante citometría de flujo. Como se muestra en la FIG. 1, una parte de la masa de células NK negativas para CD3 expresó CD56 (células inmunitarias
 30 positivas para CD56). **FIG. 1.** Las células inmunitarias CD56 positivas y CD3 negativas son linfocitos citolíticos naturales (células NK). Por lo tanto, se prepararon células inmunitarias

positivas para CD56 y negativas para CD3 a partir de una masa de células HP derivada de células iPS (cepa Ffl-01s04). Una célula que expresa CD56 que se obtuvo en el proceso anterior a veces se denomina célula NK iPS. Los anticuerpos utilizados para la citometría de flujo se muestran en la Tabla 1.

5 Tabla 1:

Anticuerpo anti-CD3	CD3 APC/Cy7 BioLegend
Anticuerpo anti-CD56	CD56 Biolegend PE

Ejemplo 5. Análisis de secuencia de ARN de células individuales (scRNAseq)

[0324] Con el fin de identificar diferentes tipos de células en la población de la masa de células NK (es decir, las células obtenidas en el Ejemplo 3), se utilizó una técnica de reducción de dimensionalidad no lineal (aproximación y proyección de variedad uniforme (UMAP) basada en la secuenciación de ARN de una sola célula (scRNAseq)).

[0325] Diez mil células de la masa de células NK se sometieron a secuenciación de ARN de células individuales en el Illumina NextSeq 500 de Genewiz. Usando el algoritmo SingleR y el etiquetado manual de grupos, los eventos se clasificaron en cuatro poblaciones celulares amplias: monocitos, linfocitos B, células NK y linfocitos T en muestras de PBMC. El conjunto de datos de PBMC, disponible gratuitamente de 10X Genomics, se utilizó como control para el análisis de datos.

[0326] Como se muestra en la **FIG. 2**, alrededor del 75 % de las células en la masa de células NK se identificaron como células NK, mientras que alrededor del 25 % de las células en la masa de células NK se identificaron como linfocitos T. Por lo tanto, la masa de células NK incluía tanto células NK como linfocitos T según la determinación de perfiles de ARNm mediante secuenciación de ARN de células individuales.

Ejemplo 6. Preparación de células CAR-NK

[0327] Las células NK se modificaron adicionalmente para expresar uno o más CAR. La modificación de las células NK incluye los siguientes pasos: (1) sintetizar un gen de CAR anti-CD19 y un gen de IL-15 α /IL-15; (2) preparar un vector de retrovirus que contiene el gen de CAR anti-CD19 y genes de IL-15 α /IL-15, y (3) transducir las células NK con el vector de retrovirus que contiene el gen de CAR anti-CD19 y genes de IL-15 α /IL-15

Preparación de células NK IL15/CAR

[0328] El gen de CAR anti-CD19 se preparó mediante la síntesis de oligopéptidos que

están diseñados para organizarse desde el extremo amino como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2:

Secuencia aminoterminal	Genes	Número de aminoácidos
1	Secuencia principal de la cadena pesada de una inmunoglobulina	22
2	Dominio variable en la cadena ligera del anticuerpo anti-CD19 (FMC60)	104
3	Enlazador GGGGS	15
4	Dominio variable en la cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 (FMC60)	120
5	Secuencia derivada de CD8 (que contiene dominio transmembrana)	83
6	Dominio intracelular de 4-1BB	47
7	Dominio intracelular de CD3 zeta	112

[0329] Se construyó un CAR anti-CD19 de acuerdo con WO2014/153270, incorporado aquí mediante esta referencia en su totalidad.

5 Preparación de gen de IL-15R α /IL-15

[0330] El gen IL-15R α /IL-15 se preparó sintetizando oligopéptidos que están diseñados para organizarse desde el extremo amino. IL-15R α /IL-15 se construyó de acuerdo con Mortier et ál., 2006, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 281, N.º 3, páginas 1612-1619, 20 de enero de 2006; Chertova et ál., *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, N.º 25, páginas 18093-18103, 21 de junio de 2013; y Rowley et ál., *Eur J Immunol*, febrero de 2009; 39(2):491-506, cada uno de los cuales se incorpora mediante esta referencia en su totalidad.

Tabla 4:

Secuencia aminoterminal	Genes	Número de aminoácidos
1	Secuencia principal de IL-2 humana	23
2	Secuencia carboxiterminal de IL-15 humana	114
3	Enlazador GGGGS	24
4	Secuencia carboxiterminal de IL-15RA humana	239

Preparación de un vector de retrovirus que contiene el gen CAR anti-CD19

[0331] El gen CAR anti-CD19 se incorporó en un sitio de clonación múltiple de un vector de retrovirus pMY. El vector de retrovirus se generó usando células FRY-RD18 para la producción de vectores de retrovirus.

5 Preparación de vector de retrovirus que contiene gen de IL-15R α /IL-15

[0332] El gen IL-15R α /IL-15 se incorporó en un sitio de clonación múltiple de otro vector de retrovirus pMY. El vector de retrovirus se generó con la célula de FRY-RD18 para la producción de vector de retrovirus.

Transducción del gen CAR anti-CD19 y el gen IL-15R α /IL-15 en la célula NK iPS

10 **[0333]** Las células NK iPS se transdujeron con los vectores de retrovirus que contenían el gen CAR anti-CD19 y con los vectores de retrovirus que contenían el gen de IL-15R α /IL-15 para generar la célula NK iPS que expresa CAR anti-CD19 (iNK-CAR19).

Ejemplo 7. Actividad antitumoral in vivo de iNK-CAR19

15 **[0334]** Se trasplantaron (5×10^5 células) células Nalm6 que expresan luciferasa (ATCC; células cancerosas) en ratones NOD/Shi-scid nulos para IL-2R gamma (ratones NSG) a través de la vena de la cola. Los ratones NSG machos de 4 a 5 semanas de edad se obtuvieron del laboratorio The Jackson Laboratory. Cuatro días después del trasplante de células Nalm6, se administró iNK-CAR19 (1×10^7 células) disperso en 0,2 ml de PBS o solo 0,2 ml de PBS sin células a los ratones NSG trasplantados con Nalm6 a través de la vena de la cola. Después de
20 la administración de células iNK-CAR19 o PBS, se administró luciferina a los ratones a través de la vena de la cola. La actividad de luciferasa se midió utilizando el sistema de imágenes IVIS (PerkinElmer) durante más de 70 días.

- [0335]** En la **Fig. 3** se muestra la eficacia antitumoral de ratones NSG trasplantados con Nalm6 tratados con células iNK-CAR19 y no tratados (tratados solamente con amortiguador). Apenas después de tres días, se detectó luminiscencia en todos los ratones tratados con amortiguador D-PBS. Por el contrario, no se detectó luminiscencia en otros ratones (tratados con células CAR T primarias o células iNK-CAR) hasta 28 días después de la administración, y no se detectó luminiscencia en un ratón tratado con células iNK-CAR19 incluso 70 días después del tratamiento. . Por lo tanto, las células iNK-CAR19 demostraron claramente una mayor toxicidad contra las células cancerosas Nalm6.

EQUIVALENTES Y ALCANCE

- 10 **[0336]** Los expertos en la técnica reconocerán o podrán determinar, solamente mediante el uso de experimentos de rutina, muchos equivalentes de las modalidades específicas de la invención descrita en la presente. El alcance de la presente invención no pretende limitarse a la descripción anterior, sino que se establece en las siguientes reivindicaciones: