

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células citolíticas naturales (NK) derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) que comprende:

(A) proporcionar una población de células en masa que comprende células progenitoras hematopoyéticas (HPC) (masa de células HP) derivadas de células madre pluripotentes inducidas,

(B) cultivar la masa de células HP en medios de inducción de CD4/CD8 que comprenden un inhibidor de p38 y SDF-1 para generar una población de células heterogéneas intermedia que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8- y células CD4+/CD8+ (masa de células DP), y

(C) cultivar la masa de células DP en medios de inducción de NK que comprenden al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD3, IL-2 e IL-7 para producir una población de células que comprende al menos un 50% de células NK CD56+/CD3-,

en donde el método no incluye un paso de aislamiento celular.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el método no incluye un paso de aislamiento celular en los pasos (A) y (B).

3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la masa de células HP en (A) comprende células CD34+, en donde entre el 20% y el 90% de la masa de células HP son células CD34+.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método no incluye un paso de aislamiento de células CD4+/CD8+.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de inducción de HPC comprende 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), inhibidor de TGF β , y combinaciones de los mismos,

en donde el medio de inducción de HPC comprende:

- (a) BMP4 en una concentración de entre 5 ng/ml y 500 ng/ml;
- (b) bFGF en una concentración de entre 5 ng/ml y 500 ng/ml;
- (c) Flt3L en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml; y
- (d) TPO en una concentración de entre 1 ng/ml y 200 ng/ml;

en donde el medio de células en masa comprende:

- (a) VEGF en una concentración de entre 5 ng/ml y 500 ng/ml; y
- (b) ácido ascórbico en una concentración de entre 5 μ g/ml y 500 μ g/ml.

6. El método de la reivindicación 5, en donde la BMP4 se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.

7. El método de la reivindicación 5, en donde el VEGF se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.

8. El método de la reivindicación 5, en donde bFGF se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.

9. El método de la reivindicación 5, en donde el ácido ascórbico se encuentra presente en una concentración de 50 μ g/ml.

10. El método de la reivindicación 5, en donde Flt3L se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.
11. El método de la reivindicación 5, en donde TPO se encuentra presente en una concentración de 100 ng/ml.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-11, en donde el medio de inducción de CD4/CD8 comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, factor de células madre (SCF), IL-7, Flt3L, trombopoyetina (TPO), inhibidor de p38, SDF-1, y combinaciones de los mismos.
13. El método de la reivindicación 12, en donde el medio de inducción de CD4/CD8 comprende:
- (a) ácido ascórbico en una concentración de entre 5 µg/ml y 500 µg/ml;
 - (b) SCF en una concentración de entre 5 ng/ml y 100 ng/ml;
 - (c) IL-7 en una concentración de entre 1 ng/ml a 100 ng/ml;
 - (d) Flt3L en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml;
 - (e) TPO en una concentración de entre 1 ng/ml y 200 ng/ml;
 - (f) inhibidor de p38 en una concentración de entre 0,5 µM a 100 µM;
 - (g) SDF-1 en una concentración de entre 10 ng/ml y 100 ng/ml.
14. El método de la reivindicación 13, en donde el ácido ascórbico se encuentra presente en una concentración de 50 µg/ml.
15. El método de la reivindicación 13, en donde el SCF se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.

16. El método de la reivindicación 13, en donde IL-7 se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.
17. El método de la reivindicación 13, en donde Flt3L se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml de Flt3L.
18. El método de la reivindicación 13, en donde TPO se encuentra presente en una concentración de 100 ng/ml.
19. El método de la reivindicación 13, en donde el inhibidor de p38 es SB203580.
20. El método de la reivindicación 19, en donde SB203580 se encuentra presente en una concentración de 15 μ M.
21. El método de la reivindicación 13, en donde el SDF-1 se encuentra presente en una concentración de 30 nM.
22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-21, en donde el medio de inducción de NK comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD3, IL-2, IL7, y combinaciones de los mismos, en donde el medio de inducción de NK comprende:
- (a) IL-2 en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml; y
 - (b) IL-7 en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml.
23. El método de la reivindicación 22, en donde IL-2 se encuentra presente en una concentración de 10 ng/ml.

24. El método de la reivindicación 22, en donde IL-7 se encuentra presente en una concentración de 10 ng/ml.
25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en donde cada uno de los pasos de cultivo se realiza con entre 3-6% de oxígeno.
26. El método de la reivindicación 25, en donde cada uno de los pasos de cultivo se realiza con 5% de oxígeno.
27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-26, en donde el cultivo de células madre pluripotentes en el medio de células en masa para obtener una masa de células HP dura entre 11 y 15 días.
28. El método de la reivindicación 27, en donde el cultivo de células madre pluripotentes en el medio de células en masa para obtener masas de células HP dura 14 días.
29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-26, en donde las iPSC se obtienen a partir de células mononucleares de sangre periférica.
30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-29, en donde 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% de las células producidas son células CD56+/CD3- sin un paso de enriquecimiento, en donde 0% a 25% de las células producidas son células CD3+, y en donde el porcentaje de células producidas se determina mediante citometría de flujo o mediante secuenciación de ARN de una sola célula (scRNAseq).

31. El método de la reivindicación 30, que comprende además un paso de aislamiento de células CD56+/CD3-.
32. El método de la reivindicación 31, en donde las células CD56+/CD3- se aíslan mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o clasificación magnética.
33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde las células inmunitarias CD56+/CD3- son células NK.
34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en donde las células CD56+/CD3- se modifican genéticamente para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR), o complejo IL-15R α /IL-15.
35. El método de la reivindicación 34, en donde el antígeno es CD19.