

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células citolíticas naturales (NK) que comprende:

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

(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), en donde el inhibidor de p38 se encuentra en una concentración de entre 0,5 μ M y 100 μ M y el SDF-1 se encuentra en una concentración de entre 10 ng/ml y 100 ng/ml;

(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 la IL-2 se encuentra en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml y la IL-7 se encuentra en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml;

en donde las etapas de cultivo (B) y (C) se realiza con entre 3-6% de oxígeno; y

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

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

(A) cultivar una población de células en masa que comprende células progenitoras hematopoyéticas (HPC) (masa de células HP) en un medio de inducción de HPC, en donde el medio de inducción de HPC comprende:

(a) proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) en una concentración de entre 5 ng/ml y 500 ng/ml,

(b) factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en una concentración de entre 5 ng/ml y 500 ng/ml,

(c) ligando Flt3 (Flt3L) en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml,

(d) trombopoyetina (TPO) en una concentración de entre 1 ng/ml y 200 ng/ml,

(e) factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en una concentración de entre 5 ng/ml y 500 ng/ml, y

(f) ácido ascórbico en una concentración de entre 5 µg/ml y 500 µg/ml;

(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 heterogénea intermedia que comprende células CD4-/CD8-, células CD4-/CD8+, células CD4+/CD8- y células CD4+/CD8+ (masa de células DP), en donde el inhibidor de p38 se encuentra en una concentración de entre 0,5 µM y 100 µM y el SDF-1 se encuentra en una concentración de entre 10 ng/ml y 100 ng/ml;

(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 la IL-2 se encuentra en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml y la IL-7 se encuentra en una concentración de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml; en donde las etapas de cultivo (B) y (C) se realizan con entre 3-6% de oxígeno; y en donde el método no incluye un paso de aislamiento celular.

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

4. El método de las reivindicaciones 1-3, en donde el método no incluye un paso de aislamiento de células CD4+/CD8+ a partir de la masa de células DP.

5. El método de la reivindicación 2, en donde la BMP4 se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.
6. El método de la reivindicación 2, en donde el VEGF se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.
7. El método de la reivindicación 2, en donde bFGF se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.
8. El método de la reivindicación 2, en donde el ácido ascórbico se encuentra presente en una concentración de 50 µg/ml.
9. El método de la reivindicación 2, en donde Flt3L se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.
10. El método de la reivindicación 2, en donde TPO se encuentra presente en una concentración de 100 ng/ml.
11. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el medio de inducción de CD4/CD8 comprende además un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, factor de células madre (SCF), IL-7, Flt3L y trombopoyetina (TPO) en donde:
 - (a) el ácido ascórbico se encuentra a una concentración entre 5 µg/ml y 500 µg/ml;
 - (b) el SCF se encuentra a una concentración entre 5 ng/ml y 100 ng/ml;
 - (c) el IL-7 se encuentra a una concentración entre 1 ng/ml a 100 ng/ml;
 - (d) el Flt3L se encuentra a una concentración entre 1 ng/ml y 100 ng/ml; y

- (e) el TPO se encuentra a una concentración entre 1 ng/ml y 200 ng/ml.
12. El método de la reivindicación 11, en donde el ácido ascórbico se encuentra presente en una concentración de 50 µg/ml.
13. El método de la reivindicación 11, en donde el SCF se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.
14. El método de la reivindicación 11, en donde IL-7 se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.
15. El método de la reivindicación 11, en donde Flt3L se encuentra presente en una concentración de 50 ng/ml.
16. El método de la reivindicación 11, en donde TPO se encuentra presente en una concentración de 100 ng/ml.
17. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el inhibidor de p38 es SB203580.
18. El método de la reivindicación 17, en donde SB203580 se encuentra presente en una concentración de 15 µM.
19. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el SDF-1 se encuentra presente en una concentración de 30 nM.
20. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde IL-2 se encuentra presente en una concentración de 10 ng/ml.

21. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde IL-7 se encuentra presente en una concentración de 10 ng/ml.
22. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde los pasos de cultivo (B) y (C) se realizan con 5% de oxígeno.
23. El método de la reivindicación 2, en donde el cultivo en el medio de células en masa para obtener la masa de células HP dura entre 11 y 15 días.
24. El método de la reivindicación 23, en donde el cultivo en el medio de células en masa para obtener la masa de células HP dura 14 días.
25. El método de la reivindicación 2, en donde las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) se obtienen a partir de células mononucleares de sangre periférica.
26. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde las células inmunitarias CD56+/CD3- son células NK.
27. El método de la reivindicación 26, en donde las células CD56+/CD3- se modifican genéticamente para expresar un receptor de antígenos quiméricos (CAR).
28. El método de la reivindicación 27, en donde las células se modifican adicionalmente de manera genética para expresar un complejo IL-15R α /IL-15.
29. El método de la reivindicación 27, en donde el antígeno es CD19.