

HIDROGELES FUNCIONALIZADOS Y MÉTODOS DE USO EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS T

Solicitudes relacionadas

[0001] Esta solicitud está relacionada con la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 63/603,323, presentada el 28 de noviembre de 2023, titulada “Hidrogeles Funcionalizados y Métodos de Uso” (“Functionalized Hydrogels and Methods of Use”), y reivindica su prioridad y el beneficio de la misma, la cual se incorpora en el presente documento por referencia.

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a hidrogeles novedosos tales como hidrogeles funcionalizados, a composiciones que comprenden componentes de dichos hidrogeles, a los componentes de dichas composiciones y a métodos para fabricar y utilizar cualquiera de los anteriores. En algunos aspectos, la invención se utiliza para la diferenciación de células T. En otros aspectos, la invención puede utilizarse para la generación de células T, incluyendo células T progenitoras, precursoras y maduras.

Listas de Secuencias – Incorporación por referencia del material presentado electrónicamente

[0003] La lista de Secuencias, que forma parte de la presente divulgación, se presenta conjuntamente con la memoria descriptiva de conformidad con la Norma 26 de la OMPI (ST26). El archivo fue creado el 28 de noviembre de 2024 y cargado en formato compatible XML directamente en la Oficina Receptora del PCT en el momento de la presentación, con un tamaño de 8 Kb; el nombre del archivo es T8486105WO.XML. El objeto del Listado de Secuencias se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia.

[0004] Por medio del presente se declara que la información registrada en formato legible por computador es idéntica a los listados de secuencias a los que se hace referencia en esta descripción.

Antecedentes de la invención

[0005] Las células T son los principales componentes de sistema inmunitario adaptativo responsables de mediar las respuestas inmunitarias basadas en células. Son un tipo de glóbulo blanco que ayuda al organismo a combatir infecciones y enfermedades. Se han desarrollado y continúan desarrollándose diversas terapias con células T. Estas incluyen, la inmunoterapia con células T, incluyendo la terapia

de transferencia de células T, y la terapia de células T adoptiva, tal como la inmunoterapia con células T con receptor antígeno quimérico (CAR) y las terapias de células T con receptor de celular T (TCR). Las terapias con células T se han utilizado en el tratamiento de diversos cánceres, incluyendo para restaurar los niveles de células T tras la quimioterapia u otra depleción asociada al tratamiento, y las células T modificadas se han utilizado para tratar cánceres como en la terapia CAR-T. La terapia CAR-T ha sido aprobada para el tratamiento de diversos cánceres y es un tratamiento emergente para la enfermedad autoinmune.

[0006] La terapia con células CAR-T utiliza células T del paciente que son genéticamente modificadas en el laboratorio para reconocer y atacar específicamente a las células cancerosas (Levine et al., 2017). El tratamiento con células CAR-T ha generado respuestas clínicas prometedoras en pacientes con leucemia y linfoma de células B (Stern & Stern, 2021). A diferencia de las terapias oncológicas tradicionales, datos recientes han demostrado que la terapia con células CAR-T puede inducir remisiones prolongadas y, en algunos casos, cura en pacientes con neoplasias malignas de células B, como la leucemia linfoblástica aguda de células B (Cappell & Kochenderfer, 2023).

[0007] Si bien la terapia con células CAR-T tiene un gran potencial para tratar los tipos de cáncer que actualmente no tienen cura, la escasez de células T de donante sigue siendo un obstáculo crítico (Tang et al., 2022). Además, se estima que el costo total del tratamiento puede alcanzar hasta los \$500.000 por paciente, lo que representa una carga económica significativa para el sistema de salud (Choi et al., 2022). Dado que el proceso implica la recolección de células T del paciente, si el paciente no está listo para recibir la terapia una vez preparada dentro de su vida útil, o si algo ocurre con el lote preparado de células T, o si el rendimiento es insuficiente, podrían requerirse muestras adicionales del paciente para producir el lote de células CAR-T, con tiempo adicional (demora) y costos adicionales.

[0008] Por ello, el potencial de dichas terapias se ve obstaculizado por la escasez de células T de donante. Para hacer el tratamiento más accesible, eficiente y rentable, existe la necesidad de nuevas estrategias para la producción de células T que aumenten el rendimiento y que sean más eficientes.

[0009] Las células T se desarrollan a partir de células madre de la médula ósea, es decir, células madre hematopoyéticas (HSC). Durante el desarrollo del linaje de células T, las HSC migran al timo, donde se desarrollan predominantemente en células T en contraposición a células del linaje mieloide. El microentorno tímico natural es un entorno único y controlado que facilita la diferenciación de células (Thapa & Farber, 2019). Además, fundamental para la maduración de células T en el timo nativo es la señalización Notch, activada por fuerzas de tracción ejercidas por los ligandos Notch de las células epiteliales tímicas sobre el receptor Notch 1 de las HSC y las células progenitoras hematopoyéticas (HPC; colectivamente HSPC o células progenitoras sanguíneas) (Zúñiga-Pflücker, 2004).

[0010] Se han realizado intentos para facilitar la diferenciación de células T terapéuticas a partir de células madre, cultivando células madre en plataformas diseñadas para recrear el microentorno tímico. Sin embargo, los modelos tímicos desarrollados hasta la fecha no han podido reproducir los elementos cruciales del microentorno tímico necesarios para la maduración de células T.

[0011] Un enfoque en la fabricación de células T *in vitro* se basa en ligandos Notch inmovilizados para impulsar la diferenciación. Por ejemplo, las HCS pueden cultivarse sobre una capa de células nodriza de fibroblastos murinos o células estromales de médula ósea transducidas para expresar los ligandos Notch Delta-like 1 o 4 (DLL1, DLL4) *in vitro* (Mohtashami et al., 2013; Schmitt & Zúñiga-Pflücker, 2002). Sin embargo, estos métodos son xenogénicos y utilizan medios suplementados con suero, lo que los hace difícilmente trasladables a entornos clínicos.

[0012] Para abordar estas limitaciones, se desarrolló un método bidimensional (2D) basado en placas mediante la inmovilización de ligandos Notch DLL4 y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1), una molécula de adhesión presente en el timo (Edgar et al., 2022; Michaels et al., 2022). El sistema generó células T maduras y funcionales a partir de HSCP derivadas tanto de sangre de cordón (SC) como de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Otro método consiste en presentar el ligando Notch a las HSPC en la superficie de perlas de poliestireno (Trotman-Grant et al., 2021). El método puede adaptarse para la diferenciación celular escalable en un sistema dinámico, como un biorreactor. Sin embargo, estos métodos se limitan a la generación de células T *in vitro* en una superficie 2D y, por tanto, son incapaces de recrear muchos elementos cruciales del microentorno tímico necesario para optimizar el desarrollo de células T, tales como la arquitectura tridimensional (3D) del timo y la compleja composición de la matriz extracelular (MEC) que determina la rigidez de la MEC y las intrincadas interacciones célula-célula y célula-MEC.

[0013] Las plataformas basadas en biomateriales también han sido exploradas como reservorios para la administración de células T, plataformas para activar y expandir células T maduras del paciente o como sistemas de diferenciación *in vivo* para HSC trasplantadas. Por ejemplo, estudios han demostrado que las células T administradas mediante biomateriales *in vivo* pueden tener mayores efectos antitumorales en comparación con las células T administradas por vía intravenosa (Hu et al., 2021; Stephan et al., 2015). Otros han demostrado que el trasplante de HSC junto con la inyección subcutánea de criogel de médula ósea funcionalizados con DLL4 en ratones mejora el prendimiento de células T progenitoras en el timo, donde dan lugar a células T citotóxicas maduras (Shah et al., 2019). Sin embargo, este enfoque se basó en atraer células para que migraran hacia el criogel en lugar de utilizar el criogel como un reservorio de administración. Los métodos actuales están limitados ya sea por la disponibilidad inicial de las células T maduras del paciente o por la dependencia del

prendimiento tímico para producir células T maduras (Shah et al., 2019; Chin et al., 2020; Hu et al., 2021).

[0014] El uso de hidrogeles 3D en intentos de imitar los microentornos tisulares implica el uso de una variedad de materiales para reconstruir aspectos de la MEC nativa. Sin embargo, los hidrogeles utilizados hasta la fecha no han imitado suficientemente el microentorno tímico. Por ejemplo, en algunos casos las células se encuentran en la superficie de un hidrogel funcionalizado, mientras que, en otros, las propiedades de rigidez o la arquitectura 3D no están optimizadas. Véase, por ejemplo, Kratzer et al., 2019, que describe el uso de hidrogel basado en PEG funcionalizado con DLL1 (inmovilizado mediante oro), en el que, una vez más, las células se encuentran en la superficie del hidrogel, sin lograr imitar el microentorno del timo, que es hipóxico en condiciones fisiológicas normales.

[0015] Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad no satisfecha para optimizar la diferenciación *in vitro* de células T y los rendimientos de producción de células T a partir de HSPC (tales como HSPC derivadas de sangre de cordón umbilical, médula ósea, sangre periférica e iPSC) de una manera que produzca células T funcionales adecuadas para diversos usos, tales como terapias regenerativas e inmunoterapias.

Resumen de la invención

[0016] En algunos aspectos, la presente invención proporciona un nuevo hidrogel tridimensional (3D) que puede ser funcionalizado con diversos componentes de la MEC tímica inmovilizados, tales como ligandos Notch, para producir células T humanas maduras y sus progenitoras *in vitro* (Figura 1). La invención también proporciona métodos para fabricar el hidrogel 3D y para desarrollar células T maduras y funcionales y sus progenitoras a partir de HSC, HPC o HSPC cultivadas en la composición de hidrogel.

[0017] En algunas realizaciones, la invención proporciona un hidrogel tridimensional (3D) que comprende:

- Un primer polímero biocompatible que es un polímero polisacárido
- Al menos un segundo polímero biocompatible, en el que el primer y el segundo polímeros biocompatibles están reticulados (directa o indirectamente, o en una realización modificados para ser conectados mediante química clic como se describe en el presente documento); y
- Al menos una molécula de señalización inmovilizada directa o indirectamente en el primer y/o segundo polímero biocompatible (o en una realización modificada para ser conectada mediante química clic, como se describe en el presente documento), o en algunas realizaciones en el

primer polímero biocompatible, en la que, en algunos aspectos de la invención, al menos una de las moléculas de señalización es:

- una que promueve la expansión y diferenciación de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC), células madre hematopoyéticas (HSC) y/o células progenitoras hematopoyéticas hacia células T progenitoras y precursoras y/o células T maduras; tal como, en algunas realizaciones, un ligando Notch, tal como, en algunas realizaciones, seleccionado de uno o más de los siguientes: DLL1, DLL3, DLL4, JAG1 y JAG2, o de DLL1 o DLL4, o es DLL4; y/o
- sola o además de "(i)" promueve la adhesión celular o es un ligando del receptor de integrina, tal como en algunas realizaciones VCAM-1, o una molécula con un sitio receptor de integrina RGD,
- en la que, en algunos aspectos, la molécula de señalización es una molécula humana o humana recombinante. En algunas realizaciones, la molécula de señalización está presente en el hidrogel en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 microgramos por mL de hidrogel.

[0018] En algunos aspectos de la invención, el primer polímero biocompatible del hidrogel se selecciona del grupo que consiste en: alginato, quitosano, celulosa, pectina, ácido hialurónico (HA), agarosa, sulfato de condroitina, carragenina, inulina, almidón, sales o ésteres de cualquiera de los anteriores y cualquier combinación de los anteriores, o se selecciona del grupo que consiste en alginato, quitosano, celulosa, pectina, ácido hialurónico (HA), sales o ésteres de cualquiera de los anteriores y cualquier combinación de los anteriores, o es ácido hialurónico o sales o ésteres del mismo, tal como hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de magnesio e hialuronato de calcio. En algunas realizaciones, el primer polímero tiene entre aproximadamente 150 y aproximadamente 300 kDa.

[0019] En algunas realizaciones, dicho al menos un segundo polímero biocompatible se selecciona de uno más de un polímero natural y/o un polímero sintético, tal como un polímero sintético que sea inerte a la degradación por enzimas celulares. En algunas otras realizaciones, dicho al menos un segundo polímero biocompatible es un alcohol polivinílico sintético, polietilenglicol (PEG), poliacrilato de sodio, polímeros y copolímeros de acrilato, sales o ésteres de los mismos, o un polímero sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 kDa de cualquiera de los anteriores.

[0020] En algunas realizaciones adicionales, al menos uno de dichos al menos un segundo polímero biocompatible es un reticulante y uno o más de un estabilizador de hidrogel, un agente de rigidización,

una molécula de adhesión celular, un polímero basado en RGD que promueve la adhesión y/o migración celular, y/o un polímero que tiene un sitio de unión al receptor de integrina, tal como RGD. En algunos otros aspectos de la invención, al menos uno de dichos segundos polímeros biocompatibles es una gelatina, tal como una gelatina de aproximadamente 40 a aproximadamente 70 kDa o, en algunos otros aspectos, de aproximadamente 60 kDa.

[0021] En otras realizaciones más, dicho al menos un segundo polímero biocompatible es un PEG, una gelatina o una combinación de los mismos.

[0022] En algunos aspectos de la invención, un experto en la técnica entendería que la selección del segundo polímero biocompatible puede depender del grado en que esté sujeto a la degradación por enzimas celulares, y que esto puede variar según la fuente de las células presentes en el hidrogel. En hidrogeles en los que la exposición a dichas enzimas celulares afecta la estabilidad del hidrogel, puede ser necesario añadir un polímero sintético que sea más inerte a dicha degradación. Por ejemplo, cuando el hidrogel es sembrado con células derivadas de sangre de cordón, el segundo polímero biocompatible puede ser natural (p. ej., una gelatina por sí sola), sintético (p. ej., PEG) o ambos. En otras realizaciones, cuando el hidrogel es sembrado con iPSC, el segundo polímero biocompatible es preferiblemente una combinación de un polímero natural (p. ej., gelatina) y uno sintético (p. ej., PEG). En otras realizaciones, puede ser cualquier polímero con un sitio de unión a RGD o de integrina combinado con un polímero que sea inerte (o más inerte o suficientemente inerte a la degradación por enzimas celulares a las que pueda estar expuesto).

[0023] En algunos aspectos, el hidrogel 3D de la invención forma una matriz 3D. En algunas realizaciones, el hidrogel de la invención se encuentra en forma líquida (tal como antes de la gelación). En otras realizaciones más, el hidrogel es un gel 3D.

[0024] En algunas realizaciones, el hidrogel 3D de la invención es sembrado con células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC), células madre hematopoyéticas (HSC) y/o células progenitoras hematopoyéticas (HPC) o combinaciones de las mismas, las cuales quedan encapsuladas en el interior del hidrogel 3D. En algunos aspectos, las células se añaden a la forma líquida del hidrogel y, cuando el hidrogel se gelifica, las células y las células derivadas de dichas células sembradas quedan en el interior del hidrogel o por el hidrogel. En algunos otros aspectos, el hidrogel con las células se cultiva bajo condiciones que promueven la expansión y diferenciación celular. En algunos otros aspectos, se forman esferoides que comprenden dichas células en el hidrogel.

[0025] En algunos aspectos, las células derivadas de cualquier fuente HSPC, HSC o HPC, o de células derivadas de sangre de cordón o de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), o en otros

aspectos las células mencionadas anteriormente son células humanas.

[0026] En algunos aspectos de la invención, el primer polímero biocompatible, el segundo polímero biocompatible y la molécula de señalización del hidrogel están conectados mediante química clic. En algunos aspectos adicionales, la molécula de señalización es una molécula de señalización de proteína de fusión Fc, y está unida a un agente de unión a proteína de fusión Fc, tal como Proteína A (ProA) o Proteína G (ProG). En algunos otros aspectos, el primer y el segundo polímero biocompatible y el agente de unión a proteína de fusión Fc son modificados para permitir dicha conjugación y/o reticulación, según corresponda, mediante química clic.

[0027] En algunos aspectos, los métodos y productos de la invención, incluyendo el proceso de diferenciación son no xenogénicos y utilizan medios libres de suero. Esto facilita el uso clínico de las células resultantes. En algunos otros aspectos, la presente invención proporciona un proceso de diferenciación que imita más fielmente los elementos cruciales del microentorno tímico necesarios para el desarrollo de células T, a saber, la arquitectura 3D del timo y la compleja composición de la MEC, que determinan la rigidez y las intrincadas interacciones célula-célula y célula-matriz. En algunos otros aspectos, la plataforma de diferenciación y sus componentes son biocompatibles y adecuados tanto para uso in vitro como in vivo, tal como un hidrogel inyectable en un paciente para la administración de células T in vivo y la generación de células T in situ, siendo utilizado así tanto como sistema de desarrollo como de administración de terapias con células T.

[0028] En términos generales, en algunos aspectos, la invención proporciona un hidrogel que comprende: un primer polímero biocompatible que es un polímero polisacárido; un segundo polímero biocompatible; un agente de unión a proteína de fusión Fc; y al menos un ligando de proteína de fusión Fc conjugado al agente de unión a proteína de fusión Fc, en el que el primer polímero biocompatible está (i) reticulado con el segundo polímero biocompatible y (ii) conjugado al agente de unión a proteína de fusión Fc mediante química clic. El primer y el segundo polímero biocompatible y el agente de unión a proteína de fusión Fc son modificados para permitir dicha reticulación y conjugación mediante química clic. En algunos aspectos, el hidrogel puede estar en estado líquido y/o gelificado. En algunos otros aspectos, el hidrogel está en estado gelificado, en el que los polímeros del hidrogel están reticulados para formar una matriz de hidrogel 3D. En otras realizaciones más, el hidrogel es sembrado con al menos una célula, la cual queda encapsulada en el interior del hidrogel en una estructura 3D.

[0029] En algunos aspectos, el hidrogel 3D puede ser sembrado con HSC, HPC o HSPC y utilizarse para promover y/o potenciar la expansión y diferenciación de las células sembradas hacia células T progenitoras y precursoras y células T maduras. En algunos otros aspectos, el hidrogel 3D es sembrado con aproximadamente 500,000 células por 1 ml de hidrogel. Otros intervalos incluyen, entre

otros, (aproximadamente 300,000 – aproximadamente 2,000,000 células por 1 mL de hidrogel). En la realización preferida de la invención, las células sembradas son HSC, HPC o combinaciones de las mismas (es decir, HSPC). En algunos otros aspectos, las células derivan de sangre de cordón utilizando métodos conocidos en la técnica. En otros aspectos más, las células derivan de iPSC utilizando métodos conocidos en la técnica.

[0030] La presente invención comprende además métodos para fabricar los hidrogeles 3D como se describe en el presente documento. En un aspecto, el método para fabricar el hidrogel 3D de la presente invención comprende (i) una etapa de reticulación, en la que un primer polímero biocompatible es reticulado con al menos un segundo polímero biocompatible para formar una matriz de hidrogel 3D, y en la que la reticulación puede lograrse mediante medios químicos, tal como la química clic, o medios físicos, tal como la fotorreticulación; y (ii) una etapa de inmovilización de la molécula de señalización, en la que al menos una molécula de señalización es inmovilizada en el interior de la matriz de hidrogel 3D mediante la conjugación directa o indirecta de dicha al menos una molécula de señalización al primer polímero biocompatible y/o a dicho al menos un segundo polímero biocompatible.

[0031] Se pretende que el presente documento sea leído en su totalidad como una divulgación unificada, y debe entenderse que el resumen precedente no tiene por objeto definir todos los aspectos de la invención. Otras características, objetos y ventajas de la presente invención resultan evidentes en la descripción detallada que sigue. Sin embargo, se entenderá que la descripción detallada, si bien indica realizaciones de la presente invención, se proporciona únicamente a modo de ilustración, y no de limitación.

[0032] Todas la combinaciones de características descritas en el presente documento quedan contempladas, incluso si la combinación de características no se encuentra en la misma oración, párrafo o sección de este documento. Además, la invención incluye, como aspecto adicional, todas las realizaciones de la invención que sean de alcance más restringido en cualquier forma que las variaciones específicamente mencionadas en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

[0033] La **Figura 1** es una representación esquemática de un método basado en hidrogel para imitar el microentorno tímico para la producción de células T, donde **(a)** muestra HSC CD34(+) endógenas generadas en la médula ósea que migran al timo, donde los ligandos Notch, incluyendo DLL4, presentados por las células epiteliales tímicas se unen al receptor Notch1 de las HSC, desencadenando la diferenciación de células T, y **(b)** muestra el enfoque de la presente invención que

comprende un sistema libre de suero y libre de células nodriza que utiliza un hidrogel funcionalizado con componentes tímicos tales como ligandos Notch, incluyendo el ligando DLL4, para crear un nicho 3D de tipo tímico que encapsula HSC en un medio que desencadena la diferenciación de células T.

[0034] La **Figura 2** ilustra la síntesis de HA-norborneno. **(a)** Representación esquemática de la síntesis de HA-norborneno. **(b)** RMN de ^1H típico (500 MHz, D_2O , δ) de HA-norborneno que muestra la sustitución exitosa de norborneno.

[0035] La **Figura 3** ilustra un método para la inmovilización de componentes tímicos en un hidrogel de HA mediante Proteína G. **(a)** La Proteína G (ProG) es modificada con metiltetrazina (Tz). **(b)** ProG-Tz conjugada a HA-norborneno se une a proteínas de fusión Fc, incluyendo DLL4-Fc, para la activación de Notch en las células encapsuladas. El HA es un polímero que comprende numerosos sitios de norborneno de este tipo para la conjugación de ProG-Tz y para la reticulación con reticulantes modificados con metiltetrazina, tales como PEG-Tz y/o gelatina-Tz. La figura muestra solo uno de dichos sitios de norborneno. **(c)** El HA-norborneno es reticulado con PEG-Tz y/o gelatina-Tz mediante química clic norborneno-tetrazina para formar una matriz de hidrogel. Del mismo modo, el HA es un polímero que comprende numerosos sitios de norborneno de este tipo para la reticulación con gelatina o PEG.

[0036] La **Figura 4** ilustra el grado de modificación de la Proteína G y la gelatina con metiltetrazina. **(a)** La modificación de la Proteína G con metiltetrazina se verifica mediante espectrometría de masas por ionización por electrospray. **(b)** La absorbancia de espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) a 524 nm se utiliza para cuantificar el grado de modificación de la gelatina con metiltetrazina.

[0037] La **Figura 5** ilustra la síntesis de PEG-Tz mediante una reacción de acoplamiento de amida. **(a)** Esquema de la síntesis de PEG-Tz de 4 brazos a partir de PEG amina de 4 brazos. **(b)** RMN de ^1H típico (500 MHz, D_2O , δ) de PEG-Tz de 4 brazos que muestra la sustitución exitosa.

[0038] La **Figura 6** ilustra la encapsulación celular en los hidrogeles. **(a)** Microscopía de esferoides formados en el hidrogel, en la que las células fueron teñidas para núcleos (DAPI) y actina (GFP) y fusionada con campo claro. Se muestra un apilado Z de un esferoide que demuestra que los esferoides no son huecos. Barra de escala = 10 μm . **(b)** Microscopía del hidrogel con esferoides celulares formados. Barra de escala = 100 μm . **(c)** Representación 3D y detección en transmisión de esferoides generados en los hidrogeles.

[0039] La **Figura 7** ilustra la generación de células T progenitoras (Pro-T) específicas de linaje y células T precursoras (Pre-T) comprometidas con el linaje en hidrogel de HA funcionalizado con DLL4.

(a) Las diferentes etapas de la maduración de células T incluyen progenitores tempranos de células T (ETP) CD7(+), células Pro-T específicas de linaje de células T CD7(+)CD5(+), células Pre-T comprometidas con el linaje de células T CD7(+)CD5(+)CD1a(+), células CD4(+) positivas simples iniciales (ISP), células CD4(+)CD8(+) doble positivas (DP) y células T CD4(+) o CD8(+) positivas simples (SP) maduras. **(b)** Esquema general y cronograma para evaluar la capacidad del hidrogel de HA funcionalizado con DLL4 para generar células Pro-T y Pre-T en el transcurso de 2 semanas. **(c)** Análisis por citometría de flujo de células que expresan CD5, CD7 y CD1a generadas en hidrogel de HA funcionalizado con DLL4 durante 2 semanas utilizando un medio con un suplemento de expansión de progenitores linfoides que contiene las citocinas SCF, IL7, TPO y Flt3L. La citometría de flujo es representativa de tres réplicas. **(d)** Frecuencia de células Pro-T generadas en hidrogeles basados en HA con Proteína G únicamente (HA-ProG), con DLL4-Fc no inmovilizado únicamente (HA-DLL4-Fc) y con DLL4 inmovilizado (HA-ProG-DLL4-Fc) en el día 14 (n=3). **(e)** Frecuencia de células Pro-T y Pre-T generadas en hidrogeles con 50, 100 y 200 µg de DLL4-Fc por 1 mL de hidrogel HA-ProG. Los datos representan la media ± DE para 3 réplicas biológicas. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. El hidrogel de HA en la descripción de las Figuras 7(b)-(d) también incluye PEG, es decir, HA-norborneno reticulado con PEG-Tz mediante química clic.

[0040] La **Figura 8** ilustra la capacidad de HSPC para generar células T en hidrogeles 3D HA-ProG-DLL4 reticulados con gelatina (HA-ProG-DLL4-G, donde G representa gelatina) en comparación con el sustrato 2D funcionalizado con DLL4+VCAM1 previamente verificado por los inventores. (a)-(c) Análisis por citometría de flujo de células Pro-T CD5(+)CD7(+), células Pre-T CD1a(+)CD7(+), células mieloides CD33(+), células NK CD56(+) y HSPC CD34(+) generadas después de 2 semanas. La citometría de flujo es representativa de 3 réplicas. **(a)** Análisis por citometría de flujo de células generadas utilizando controles negativos (hidrogeles sin DLL4). **(b)** Análisis por citometría de flujo de células generadas utilizando controles positivos (placa 2D recubierta con DLL4 y VCAM1). **(c)** Análisis por citometría de flujo de células generadas en hidrogeles HA-ProG-DLL4-G.

[0041] La **Figura 9** ilustra la influencia de la gelatina y VCAM1 en el compromiso de células T de HSC CD34(+) derivadas de SC en hidrogel HA-ProG-DLL4, donde la gelatina actúa como reticulante, agente de rigidización y molécula de adhesión celular que contiene secuencias RGD que interactúan con receptores de la superficie celular. **(a)** La gelatina es modificada con metiltetrazina (Tz). **(b)** Frecuencias de células Pro-T y Pre-T generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4 con concentraciones crecientes de gelatina-Tz (0, 2, 5, 10%) (n=3). En (b) a (e), PEG-Tz se utiliza en la condición de 0% de gelatina-Tz, mientras que PEG-Tz está ausente cuando se utiliza 2%, 5% o 10% de gelatina-Tz. **(c)** Cuantificación de los módulos de Young (kPa) del hidrogel HA-ProG-DLL4 con concentraciones crecientes de gelatina-Tz (0, 2, 5 y 10%) (n=3). **(d)** Frecuencias de ETP, células Pro-T, células Pre-T y

células mieloides generadas a partir de HSC CD34(+) derivadas de SC encapsuladas durante 2 semanas en diversas formulaciones de hidrogeles con y sin gelatina-Tz (HA-ProG-DLL4-G y HA-ProG-DLL4, respectivamente) y con o sin VCAM1-Fc (n=3). **(e)** Rendimiento de células Pro-T y Pre-T combinadas generadas por 1 HSC CD34(+) de entrada en presencia y ausencia de gelatina y/o VCAM1. Los datos representan la media $\pm$ DE para 3 réplicas biológicas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

[0042] La **Figura 10** ilustra que las células que migran fuera del hidrogel de ingeniería pueden continuar la diferenciación de células T en presencia de ligandos que potencian la señalización Notch. **(a)** Representación esquemática de un hidrogel que encapsula HSC en un transwell colocado sobre un pocillo recubierto con DLL4 y VCAM1. **(b)** Análisis por citometría de flujo que evalúa la expresión de CD5 y CD7 en células que permanecen en el interior del hidrogel durante 2 semanas, células que migraron fuera del gel hacia pocillos recubiertos con DLL4 y VCAM1, y células que migraron hacia pocillos sin recubrimiento. La citometría de flujo es representativa de tres réplicas. **(c)** Frecuencias de células Pro-T CD5(+)CD7(+) generadas en el interior del hidrogel, migradas fuera del hidrogel en presencia de DLL4 y VCAM1, y migradas fuera del hidrogel en ausencia de DLL4 y VCAM1. Los datos representan la media $\pm$ DE para 3 réplicas biológicas. * $p < 0,05$.

[0043] La **Figura 11** ilustra la cinética de diferenciación de células T en presencia y ausencia de VCAM1 al cambiar de un medio con un suplemento de expansión de progenitores linfoides que contiene las citocinas SCF, IL7, TPO y Flt3L a un medio con un suplemento de maduración que contiene IL-7 y Flt3L (pero no TPO ni SCF). **(a-b)** Frecuencias de células Pro-T y Pre-T generadas en hidrogeles con y sin VCAM1 durante 4 semanas de cultivo. Las citocinas TPO y SCF fueron retiradas del medio en la semana 2 (n=2). **(c-d)** Frecuencias de células Pro-T y Pre-T generadas en hidrogeles con y sin VCAM1 durante 5 semanas de cultivo. Las citocinas TPO y SCF fueron retiradas del medio en la semana 3 (n=2).

[0044] La **Figura 12** ilustra que las células T maduras y funcionales se desarrollan a partir de HSC CD34(+) derivadas de SC en hidrogel HA-ProG-DLL4-G. El hidrogel HA-ProG-DLL4-G de esta figura no incluye PEG. **(a)** Esquema general y cronograma para evaluar la capacidad del hidrogel para generar células T funcionales. **(b)** Frecuencias de ETP, células mieloides, células Pro-T y células Pre-T generadas durante 4 semanas en hidrogel HA-ProG-DLL4-G (n=3). **(c)** Análisis por citometría de flujo de células que expresan CD4, CD8b, CD3 y TCR $\alpha\beta$ generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-G en el día 35. La citometría de flujo es representativa de tres réplicas de estimulación. **(d)** Frecuencias de células T CD4(+) ISP, CD4(+)CD8(+) DP y CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+) generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-G en el día 35 (n=3). **(e)** Análisis por citometría de flujo de células que expresan CD4, CD8b, CD3 y TCR $\alpha\beta$

generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-G en el día 84 (n=3). La citometría de flujo es representativa de tres réplicas de estimulación. **(f)** Frecuencias de células T CD8(+) SP maduras y CD3(+)TCRαβ(+) generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-G en el día 84 (n=3). **(g)** Análisis por citometría de flujo de células que expresan CD4, CD8b, CD3 y TCRαβ generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-G durante 35 días y activadas con el reactivo Immunocult con CD3 y CD28 durante 14 días adicionales. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. **(h)** Frecuencias de células T CD4(+) SP, CD8(+) SP, CD4(+)CD8(+) DP y CD3(+)TCRαβ(+) generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-G durante 35 días y activadas con el reactivo Immunocult con CD3 y CD28 durante 14 días adicionales (n=3). Los datos representan la media ± DE para 3 réplicas biológicas. (i-j) Tras 14 días de activación y expansión, las células CD3(+) fueron evaluadas para la producción de proteínas efectoras en ausencia **(i)** o presencia **(j)** de estimulación inespecífica con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)/ionomicina. La citometría de flujo intracelular es representativa de tres réplicas de estimulación.

[0045] La **Figura 13** ilustra el desarrollo de células Pro-T a partir de HSPC derivadas de iPSC en hidrogel con DLL4 inmovilizado. **(a)** Esquema general del procedimiento de generación de células T a partir de iPSC, que incluye la inducción hemogénica en aggrewwells, el enriquecimiento de células CD34(+) mediante separación magnética, la transición endotelio-hematopoyética de células CD34(+) utilizando placas recubiertas con DLL4+VCAM1 y la encapsulación de HSPC brotadas en hidrogeles con DLL4 inmovilizado. **(b)** Análisis por citometría de flujo de células que expresan CD34, CD184, CD43 y CD73 generadas en aggrewwells tras 8 días de inducción hemogénica. La citometría de flujo es representativa de 3 réplicas de estimulación. **(c)** Análisis por citometría de flujo de células Pro-T CD5(+)CD7(+) generadas tras el cultivo de HSPC brotadas en placas recubiertas con DLL4+VCAM1. La citometría de flujo es representativa de 3 réplicas. **(d)** Esquema general y cronograma de la composición de los medios. Las HSPC generadas a partir de PSC fueron encapsuladas en los hidrogeles con DLL4 inmovilizado y cultivadas durante 2 semanas. El medio de expansión de progenitores linfoides que contiene IL-7, Flt3L, TPO y SCF fue utilizado durante 2 semanas de cultivo o reemplazado tras 1 semana de cultivo por el medio de maduración que contiene únicamente IL-7 y Flt3L. **(e)** Análisis por citometría de flujo de células que expresan CD5 y CD7 generadas en hidrogeles con DLL4 inmovilizado tras 2 semanas de encapsulación de HSPC en los hidrogeles. Las células Pro-T se identifican por la coexpresión de CD5 y CD7. La citometría de flujo es representativa de tres réplicas. **(f)** Frecuencias de células Pro-T CD5(+)CD7(+) y ETP CD5(-)CD7(+) generadas tras 2 semanas de encapsulación de HSPC en los hidrogeles. Las células cultivadas durante 1 semana en el medio de expansión de progenitores linfoides seguida de 1 semana en el medio de maduración fueron comparadas con las células cultivadas durante 2 semanas en el medio de expansión de progenitores linfoides (n=3). Los datos representan la media ± DE para 3 réplicas biológicas. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Los ejemplos que utilizan iPSC emplean tanto reticulantes de PEG como de gelatina,

donde la gelatina actúa como reticulante, agente de rigidización y molécula de adhesión celular que contiene secuencias RGD que interactúan con receptores de la superficie celular.

[0046] La **Figura 14** ilustra que el cultivo de HSPC derivadas de iPSC en hidrogel HA-ProG-DLL4 reticulado con PEG-Tz y gelatina-Tz (HA-ProG-DLL4-PEG-G) en condiciones hipóxicas potencia la diferenciación hacia células Pro-T. **(a)** Esquema general del cronograma y las condiciones de los medios utilizadas para evaluar los efectos de la concentración de DLL4 y la hipoxia en la diferenciación de HSPC derivadas de PSC hacia células Pro-T CD5(+)CD7(+). **(b)** Imágenes de campo claro de células generadas tras 2 semanas en hidrogeles HA-ProG-DLL4-PEG-G con concentraciones variables de DLL4 y en condiciones de normoxia frente a hipoxia. **(c)** Análisis por citometría de flujo y **(d)** frecuencias de células Pro-T CD5(+)CD7(+) generadas tras 2 semanas en hidrogeles HA-ProG-DLL4-PEG-G con concentraciones variables de DLL4 y en condiciones de normoxia frente a hipoxia.

[0047] La **Figura 15** ilustra las células T maduras se desarrollan a partir de HSPC derivadas de iPSC en hidrogel HA-ProG-DLL4 reticulado con PEG-Tz y gelatina-Tz (HA-ProG-DLL4-PEG-G). **(a)** Esquema general y cronograma de los experimentos para evaluar el fenotipo y la función de las células T. **(b)** Análisis por citometría de flujo de células Pro-T CD5(+)CD7(+) generadas tras el cultivo de HSPC brotadas en el sistema de hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG-G durante 14 días. La citometría de flujo es representativa de tres réplicas. **(c)** Frecuencias de células Pro-T CD5(+)CD7(+) generadas a partir de diferentes lotes de HSPC encapsuladas en hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG con y sin VCAM1 (n=3). **(d)** Análisis por citometría de flujo de células que expresan CD4, CD8b, CD3 y TCR $\alpha\beta$ generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG-G en el día 21. La citometría de flujo es representativa de tres réplicas. **(e)** Frecuencias de células que expresan CD4, CD8b, CD3 y TCR $\alpha\beta$ generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG-G en el día 21 (n=3). **(f)** Análisis por citometría de flujo de células que expresan CD4, CD8b, CD3 y TCR $\alpha\beta$ generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG-G en el día 28. La citometría de flujo es representativa de tres réplicas. **(g)** Análisis por citometría de flujo de células que expresan CD4, CD8b, CD3 y TCR $\alpha\beta$ generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG-G en el día 21, seguido de activación y expansión con el reactivo Immunocult con CD3 y CD28 durante 14 días adicionales fuera del hidrogel. La citometría de flujo es representativa de tres réplicas. **(h)** Análisis por citometría de flujo de células T CD8b(+) SP maduras y CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+) generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG-G en el día 21, seguido de activación y expansión con el reactivo Immunocult con CD3 y CD28 durante 14 días adicionales fuera del hidrogel (n=3). Los datos representan la media $\pm$ DE para 3 réplicas biológicas. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

[0048] La **Figura 16** ilustra que las células T generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-G-PEG-G a partir de HSPC derivadas de PSC son funcionales y capaces de secretar citocinas. Las células T

CD4(+)CD8(+) DP generadas en hidrogel HA-ProG-DLL4-G-PEG-G fueron recolectadas en el día 21, seguidas de activación y expansión con el reactivo Immunocult con CD3 y CD28 durante 14 días adicionales fuera del hidrogel. Las células T CD8(+) SP resultantes fueron cultivadas con el reactivo Immunocult con CD3 y CD28 durante 7 días adicionales. A continuación, las células CD3(+) fueron evaluadas para la producción de proteínas efectoras en presencia o ausencia de estimulación inespecífica con PMA/ionomicina. La citometría de flujo intracelular es representativa de tres réplicas de estimulación. Los datos representan la media $\pm$ DE para 3 réplicas biológicas.

Descripción detallada de la invención

[0049] En términos generales, la presente invención proporciona un enfoque novedoso para el desarrollo y uso de hidrogeles (hidrogeles 3D) para imitar los microentornos de nicho in vivo y dirigir la diferenciación y expansión celular. En algunos aspectos de la invención, el hidrogel comprende un polímero polisacárido biocompatible, preferiblemente uno que esté presente o imite a los que se encuentran en la MEC del tejido que se desea imitar, conjugado a un ligando adecuado (p. ej., ligando Notch, ligando de integrina u otro ligando deseado), opcionalmente mediante el uso de un conector de proteína de fusión (tal como Proteína A o Proteína G) a través de química clic (tal como la química clic norborneno/metiltetrazina), y en el que el polisacárido biocompatible está también reticulado con un polímero reticulante biocompatible y/o agente de rigidización mediante química clic (p. ej., norborneno/metiltetrazina), en el que el reticulante (p. ej., PEG y/o gelatina y/u otros reticulantes adecuados) y el agente de rigidización (p. ej., gelatina) son iguales o diferentes. Los componentes del hidrogel pueden mezclarse en solución con células (tales como HSPC) de modo que, cuando el hidrogel se forma, las células quedan encapsuladas en el interior del hidrogel. Las HSPC pueden derivarse de una variedad de fuentes, incluyendo sangre de cordón (SC) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Dado que el hidrogel es poroso, puede colocarse en medios de cultivo adecuados — por ejemplo, para promover la diferenciación y/o expansión y/o viabilidad— que alcanzarán las células encapsuladas. En algunos aspectos, los hidrogeles de la invención promueven la formación de esferoides celulares en el interior del hidrogel. Una vez producidas las células deseadas, estas pueden recuperarse eliminando el hidrogel, por ejemplo, mediante el uso de enzimas y/o hidrólisis, y recuperando o seleccionando las células deseadas, tal como seleccionando células con determinados marcadores celulares.

[0050] Mas particularmente, en ciertos aspectos, la presente invención proporciona un hidrogel tridimensional (3D) funcionalizado para promover la diferenciación de HSPC hacia células T. En algunos aspectos, la invención proporciona un hidrogel novedoso (tanto en forma líquida en solución como en forma de gel sólido) y una composición de hidrogel y métodos para producir células T

precursoras y/o progenitoras y/o células T, incluyendo células T humanas maduras in vitro. En contraste con las plataformas existentes, el hidrogel 3D de la invención, en algunos aspectos, permite el uso de medios libres de suero y el cultivo de las células T en desarrollo sin necesidad de co-cultivo con células nodriza xenogénicas.

[0051] En otros aspectos, la plataforma de hidrogel es biocompatible y está funcionalizada con componentes críticos de la matriz extracelular necesarios para el desarrollo de células T. La encapsulación de células en el hidrogel 3D en estas condiciones también permite y da lugar a la formación de esferoides 3D, proporcionando así interacciones célula-célula que promueven el desarrollo de células T. Además, la plataforma basada en hidrogel, en algunos aspectos de la invención, se forma de una manera que imita más fielmente el microentorno tímico, el cual promueve el desarrollo de células T (frente a células mieloides). Como resultado, la plataforma basada en hidrogel de la invención imita el microentorno tímico, produciendo células T y/o progenitoras y/o precursoras de células T que pueden ser adecuadas para uso en investigación y/o clínico, tal como la generación de células T CAR para uso clínico.

[0052] En otros aspectos más, la invención proporciona una manera fácil y eficiente de formar hidrogeles funcionales mediante química clic, en la que se pueden realizar ajustes en los componentes del hidrogel (incorporando ligandos y reticulantes mediante química clic, ajustando el tamaño y las proporciones) para lograr la rigidez deseada y otras propiedades que imiten las características de un tejido fisiológico.

[0053] Definiciones

[0054] Las definiciones de términos comunes en inmunología y biología molecular pueden encontrarse en *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 19.^a edición, publicado por Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); *The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, publicada por Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); *Immunology by Werner Luttmann*, publicado por Elsevier, 2006; *Janeway's Immunobiology*, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305); *Lewin's Genes XI*, publicado por Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); *Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 1936113414); Davis et al, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X); *Laboratory Methods in Enzymology: DNA*, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); *Current Protocols in Molecular*

Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), *Current Protocols in Protein Science (CPPS)*, John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005; y *Current Protocols in Immunology (CPI)* (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737), cuyos contenidos se incorporan en su totalidad en el presente documento por referencia.

[0055] Tal como se utiliza en el presente documento, “**biocompatibilidad**” se refiere a la cualidad de no tener efectos tóxicos o perjudiciales sobre los sistemas biológicos.

[0056] Tal como se utiliza en el presente documento, “**química clic**” o “**reacción clic**” se refiere a un enfoque de síntesis química que enfatiza la eficiencia, simplicidad, selectividad y modularidad en los procesos químicos utilizados para unir bloques de construcción moleculares. Incluye tanto el desarrollo como el uso de "reacciones clic", un conjunto de reacciones químicas simples y biocompatibles que cumplen criterios específicos como alto rendimiento, velocidades de reacción rápidas y subproductos mínimos. Se han identificado varias reacciones que se ajustan a este concepto, entre ellas: cicloadiciones [3+2], como la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen, en particular la variante escalonada catalizada por Cu(I), que a menudo se denominan simplemente reacciones clic; la reacción tiol-eno; la reacción de Diels-Alder y la reacción de Diels-Alder de demanda electrónica inversa; cicloadiciones [4+1] entre isonitrilos (isocianuros) como el norborneno y tetrazinas como las metiltetrazinas; la sustitución nucleofílica, especialmente en pequeños anillos tensionados como epóxidos y aziridinas; la formación de ureas de tipo química de carbonilos, pero no las reacciones de tipo aldol debido a la baja fuerza impulsora termodinámica; las reacciones de adición a dobles enlaces carbono-carbono, como la dihidroxilación o los alquinos en la reacción tiol-ino; y el intercambio de fluoruro de azufre (VI).

[0057] Tal como se utiliza en el presente documento, “**reticulación**” se refiere a la formación de una red o matriz polimérica en un hidrogel por medios físicos o químicos. Los hidrogeles pueden reticularse utilizando una variedad de métodos, incluyendo, entre otros, la reticulación química mediante agentes químicos como en la química clic y la fotorreticulación mediante polímeros fotosensibles tal como el metacrilato.

[0058] Tal como se utiliza en el presente documento, los “**hidrogeles funcionalizados**” son biomateriales creados mediante la combinación de hidrogeles con otros materiales funcionales para imitar las propiedades de tejidos biológicos. Por ejemplo, en un aspecto, la presente invención proporciona un hidrogel fabricado para imitar mejor la MEC del timo y promover la diferenciación de

HSPC para comprometer dichas células con el linaje de células T, mediante la incorporación de DLL4 inmovilizado. En algunos otros aspectos, el hidrogel tiene otras características que promueven la diferenciación y producción de células T.

[0059] Tal como se utiliza en el presente documento, **“gelatina”** es un biopolímero preparado por desnaturalización térmica de colágeno, que se obtiene frecuentemente de la piel, los huesos y el tejido conectivo de animales (como ganado bovino, pollo, cerdos y peces), en presencia de ácidos diluidos. La gelatina consiste en un gran número de residuos de glicina, prolina y 4-hidroxiprolina. Es una forma irreversiblemente hidrolizada del colágeno y se denomina frecuentemente "colágeno hidrolizado".

[0060] Tal como se utiliza en el presente documento, **“hidrogel”** se refiere a redes estructuradas tridimensionales (3D) de matrices poliméricas hidrófilas reticuladas, capaces de retener una gran cantidad de agua (> 10% por definición) y que exhiben características útiles como suavidad, tenacidad, biocompatibilidad, extensibilidad y deformabilidad. La reticulación entre las funcionalidades hidrófilas facilita su integridad estructural y evita su disolución inmediata en el entorno acuoso. Su capacidad para atrapar y preservar una cantidad sustancial de agua o soluciones biológicas, y la combinación única de suavidad y flexibilidad son similares a las de los tejidos blandos naturales, lo que los convierte en materiales prometedores para imitar sus propiedades (Dodda et al., 2023). Los hidrogeles pueden transitar del estado líquido al estado de gel bajo diversas condiciones, como temperatura, pH, luz y presión. Los polímeros naturales para la preparación de hidrogeles incluyen el ácido hialurónico, el quitosano, la heparina, el alginato, la gelatina y la fibrina. Los polímeros sintéticos comunes incluyen el alcohol polivinílico, el polietilenglicol, el poliacrilato de sodio, los polímeros de acrilato y sus copolímeros. Si bien los hidrogeles naturales generalmente no son tóxicos y a menudo ofrecen otras ventajas para uso médico, como biocompatibilidad, biodegradabilidad, efecto antibiótico/antifúngico y mejora de la regeneración del tejido circundante, su estabilidad y resistencia son generalmente mucho menores que las de los hidrogeles sintéticos. También existen hidrogeles sintéticos que pueden utilizarse para aplicaciones médicas, como el polietilenglicol (PEG), el poliacrilato y la polivinilpirrolidona (PVP). Hidrogeles químicos – enlaces covalentes. Los hidrogeles físicos generalmente tienen alta biocompatibilidad, no son tóxicos y también son fácilmente reversibles simplemente modificando un estímulo externo como el pH, la concentración iónica (alginato) o la temperatura (gelatina).

[0061] Tal como se utiliza en el presente documento, **“proceso”** y **“método”** se utilizan de manera intercambiable, al igual que “etapa” y “fase”.

[0062] Tal como se utiliza en el presente documento, las células utilizadas son células de cualquier sujeto (como se define a continuación), incluyendo células humanas. La invención no está necesariamente limitada a células humanas, y otras especies celulares con diferenciación y desarrollo celular similares pueden ser igualmente aplicables.

[0063] Tal como se utiliza en el presente documento, una **“célula endotelial hemogénica”**, **“célula del endotelio hemogénico”** o **“HEC”** es un subconjunto especializado de células endoteliales vasculares en desarrollo que adquiere potencial hematopoyético y puede dar lugar a células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) multilíneas. En la presente invención, la presencia de HEC fue identificada mediante el siguiente perfil de marcadores de superficie celular: CD34(+) y CD43(-).

[0064] Tal como se utiliza en el presente documento, una **“células madre pluripotentes”** o **“PSC”** son células que pueden autorrenovarse. La autorrenovación es la capacidad de las células madre para dividirse indefinidamente, produciendo células hijas sin alteraciones que mantienen las mismas propiedades de la célula progenitora. En condiciones particulares o bajo señales específicas, una célula madre es capaz de salir de la autorrenovación e iniciar un programa que conduce a la diferenciación en tipos celulares especializados derivados de las tres capas germinativas (ectodermo, endodermo y mesodermo). En general, existen dos tipos de PSC: las células madre embrionarias (CME) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las CME se derivan de la masa celular interna (MCI) de embriones preimplantacionales y pueden mantenerse y expandirse indefinidamente en el estado pluripotente in vitro. Las células madre pluripotentes también pueden obtenerse induciendo la desdiferenciación de células somáticas adultas mediante una tecnología in vitro conocida como reprogramación celular. Al igual que las CME, las iPSC pueden expandirse indefinidamente y son capaces de diferenciarse en todos los derivados de las tres capas germinativas.

[0065] Tal como se utiliza en el presente documento, las **“células madre”** son células indiferenciadas que pueden dividirse para producir algunas células hijas que continúan siendo células madre y otras que están destinadas a diferenciarse (especializarse). Pueden diferenciarse en células más especializadas, pero también tienen la capacidad de autorrenovación. Las células madre son una fuente continua de las células diferenciadas que conforman los tejidos y órganos de animales y plantas. Las células madre incluyen células madre pluripotentes (PSC) tales como células madre embrionarias (CME) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre multipotentes tales como células madre de sangre de cordón (SC) y células madre adultas, que se encuentran en diversos tejidos.

[0066] Tal como se utiliza en el presente documento, las **“células progenitoras”** descienden de las células madre que luego se diferencian en tipos celulares especializados (uno o más tipos de células). Son más específicas que una célula madre y pueden ser inducidas a diferenciarse en su célula "objetivo". Existen muchos tipos de células progenitoras en todo el cuerpo humano. Cada célula progenitora generalmente solo es capaz de diferenciarse en células que pertenecen al mismo tejido u órgano y típicamente no tiene la capacidad de autorrenovación.

[0067] Tal como se utiliza en el presente documento, un **“progenitor sanguíneo”** o **“célula progenitora sanguínea”** es una célula hematopoyética que tiene las propiedades de una célula madre hematopoyética (HSC) o de una célula progenitora hematopoyética (HPC, colectivamente HSPC). El término "célula progenitora sanguínea" puede utilizarse de manera intercambiable con los términos "célula madre/progenitora hematopoyética" o "célula madre y progenitora hematopoyética" (HSPC). En la presente invención, la presencia de células progenitoras sanguíneas/HSPC fue identificada mediante el siguiente perfil de marcadores de superficie celular: CD34(+)CD43(+). Dichas células tienen capacidad de desarrollo multilínea y son capaces de diferenciarse en células pertenecientes a múltiples linajes hematopoyéticos, incluyendo, entre otros, células mieloides, células eritroides, megacariocitos, células linfoides, mastocitos, basófilos y eosinófilos. Dichas células pueden o no ser capaces de autorrenovarse.

[0068] Tal como se utiliza en el presente documento, las **"células precursoras"** son células intermedias antes de diferenciarse, tras haber sido células madre. Por lo general, una célula precursora tiene la capacidad de diferenciarse en un único tipo celular.

[0069] Tal como se utiliza en el presente documento, las **“células T progenitoras”, “células T precursoras”** y **"células T progenitoras y precursoras"** se refieren a los tipos celulares intermedios derivados (directa o indirectamente) de una PSC, una HSPC CD34(+) u otra célula madre, que tienen la capacidad de diferenciarse en uno o más tipos de células T maduras. Tal como se utiliza en el presente documento, las células T progenitoras y precursoras incluyen los siguientes tipos celulares, enumerados según las etapas de maduración de células T de menor a mayor diferenciación (**Figura 7a**):

- a. **“progenitores tempranos de células T”** o **“células progenitoras tempranas de células T”** o **“ETP”**, que fueron identificados en la presente invención mediante el siguiente perfil de marcadores de superficie celular: CD7(+);
- b. **"células progenitoras específicas de linaje de células T"** o **"células T progenitoras específicas de linaje"** o **"células Pro-T"**, que fueron identificadas en la presente invención

mediante el siguiente perfil de marcadores de superficie celular: CD7(+)CD5(+);

- c. **"células precursoras comprometidas con el linaje de células T" o "células T precursoras comprometidas con el linaje" o "células Pre-T"**, que fueron identificadas en la presente invención mediante el siguiente perfil de marcadores de superficie celular: CD7(+)CD5(+)CD1a(+);
- d. **"células T positivas simples iniciales" o "ISP"**, que fueron identificadas en la presente invención mediante el siguiente perfil de marcadores de superficie celular: CD3(-)CD4(+)CD8(-); y
- e. **"células T doble positivas" o "DP"**, que fueron identificadas en la presente invención mediante el siguiente perfil de marcadores de superficie celular: CD3(+)CD4(+)CD8(+).

[0070] Tal como se utiliza en el presente documento, una **"célula T madura"** es una célula T que ha desarrollado su propio receptor celular T (TCR) o expresa un TCR de ingeniería en su superficie celular. En la presente invención, las células T maduras fueron identificadas como células CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+) que eran "positivas simples" o "SP", exhibiendo además uno de los siguientes perfiles de marcadores de superficie celular: CD4(+)CD8(-) o CD4(-)CD8(+). Una célula T SP madura también puede expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) y puede ser una célula T que expresa CAR, modificada por ingeniería para carecer de TCR. Las células T maduras también pueden identificarse mediante el siguiente perfil de marcadores de superficie celular: CD8(+)CAR(+).

[0071] Tal como se utiliza en el presente documento, **"aislado"** hace referencia a células o poblaciones celulares no presentes de manera natural, que no se encuentran en la naturaleza por sí mismas, por ejemplo, en un entorno celular, cultivo o medio diferente que no se encuentra en la naturaleza y que tiene utilidad en forma aislada que no está presente en células o poblaciones celulares no aisladas de origen natural. Por ejemplo, las células producidas por los métodos de la presente invención, tales como las células T progenitoras, precursoras y/o maduras resultantes u obtenibles, pueden, en una realización, ser aisladas mediante métodos de clasificación/aislamiento celular conocidos en la técnica, y/o seleccionando las células que presenten uno o más marcadores de superficie celular característicos.

[0072] Tal como se utiliza en el presente documento, **"agregar", "agregadas" o "agregación de"** PSC en estructuras multicelulares 3D se refiere a PSC que, de forma natural o cuando son inducidas por las condiciones del medio de cultivo, se agregan y forman estructuras multicelulares 3D. Los grupos de múltiples células se adhieren entre sí, pero no se adhieren al recipiente de cultivo celular. En algunas realizaciones, los agregados contienen más de una, más de dos, más de cinco o

generalmente entre 10 y 1000 células. Véase, por ejemplo, Ungrin et al., 2008.

[0073] Tal como se utiliza en el presente documento, **"disociar"** células significa utilizar métodos mecánicos o enzimáticos para separar agregados multicelulares en células individuales, por ejemplo, mediante el uso de una enzima de disociación celular tal como la tripsina.

[0074] Tal como se utiliza en el presente documento, **"aislamiento o recolección de células mediante expresión génica y/o marcadores de superficie celular que son característicos del tipo celular a aislar"** incluye, entre otros, la unión de células que presentan el marcador de superficie celular con anticuerpos conjugados a moléculas fluorescentes, o conjugados a moléculas que pueden ser unidas por perlas magnéticas o paramagnéticas, y la posterior selección de las células con el marcador de superficie celular deseado, por ejemplo, mediante clasificación celular activada por fluorescencia o uniendo las células a un sustrato.

[0075] Tal como se utiliza en el presente documento, **"someter las HSPC a una formulación de medio que dirige las células a diferenciarse en células T, células T progenitoras y/o precursoras"** significa el uso de medios de crecimiento que contienen factores que conducen a su diferenciación, por ejemplo, los medios descritos en los Ejemplos.

[0076] Tal como se utiliza en el presente documento, **"cultivar las células en el interior del hidrogel 3D en condiciones que promueven la especificación linfoide (linfopoyesis), la diferenciación en células T progenitoras y precursoras y la maduración de células T"** significa el uso de medios de crecimiento que contienen factores percibidos por las células hematopoyéticas que conducen a su diferenciación en células T progenitoras y precursoras y/o células T maduras, por ejemplo, en algunas realizaciones que comprenden o consisten en un medio basal común tal como IMDM, RPMI, α MEM, SFEM II o StemPro34 y suplementado con IL-7, Flt3L y uno o más de los factores adicionales SCF, TPO, CXCL12, TNF- α , IL3 u otras pequeñas moléculas adicionales tales como inhibidores de la apoptosis, metabolitos, vitaminas, albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana u otros componentes adicionales.

[0077] Cuando las células se cultivan en **"medio"** o **"medios escalonados"**, la invención no está limitada a los medios y etapas descritos en el presente documento. Un componente puede sustituirse o complementarse con otro componente o componentes de función y propósito similares dentro del medio, y las cantidades y los tiempos de las etapas pueden variar en consecuencia. Además, "medio base" o "medio basal" tal como se utiliza en el presente documento puede ser cualquier medio base,

es decir, cualquier medio diseñado, optimizado y adecuado para el crecimiento y/o cultivo de los tipos celulares particulares, o conocido por ser compatible con el cultivo y/o crecimiento de tipos celulares particulares.

[0078] Tal como se utiliza en el presente documento, **"xenogénico"** se refiere a la designación, relación o participación de tejidos celulares o células pertenecientes a individuos de diferentes especies, mientras que **"no xenogénico"** tiene el significado contrario.

[0079] Tal como se utiliza en el presente documento, **"libre de células nodriza"** se refiere a condiciones de cultivo libres de células de otras fuentes, por ejemplo, en referencia al cultivo de células madre pluripotentes humanas y sus derivadas, sin añadir células al medio de otras fuentes que no sean células madre hematopoyéticas; y "libre de suero" se refiere a condiciones de cultivo diseñadas para cultivar un tipo celular específico o realizar una aplicación específica en ausencia de suero y que son no xenogénicas.

[0080] Tal como se utiliza en el presente documento, un **"medio de cultivo definido"** se refiere a una formulación químicamente definida compuesta únicamente de componentes químicamente definidos. Un medio definido puede incluir componentes con composiciones químicas conocidas. Los componentes del medio pueden ser sintéticos y/o derivados de fuentes no sintéticas conocidas. Por ejemplo, un medio definido puede incluir uno o más factores de crecimiento secretados por tejidos o células conocidos. Sin embargo, el medio definido no incluirá el medio acondicionado de un cultivo de dichas células. Un medio definido puede incluir componentes específicos y conocidos del suero aislados de un animal, incluidos componentes del suero humano, pero el medio definido no incluirá suero. Cualquier componente del suero proporcionado en el medio definido, tal como, por ejemplo, la albúmina sérica bovina (BSA), es preferiblemente sustancialmente homogéneo.

[0081] Tal como se utiliza en el presente documento, **"ácido hialurónico"** incluye el ácido hialurónico y sus sales, tales como hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de magnesio y el hialuronato de calcio. El ácido hialurónico es un polímero de disacáridos compuestos por ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, unidos mediante enlaces glucosídicos alternos β -(1→4) y β -(1→3). El ácido hialurónico puede tener hasta 25,000 repeticiones de disacáridos de longitud. Los polímeros de ácido hialurónico pueden oscilar en tamaño entre 5,000 y 20,000,000 Da in vivo. En algunas realizaciones preferidas, el ácido hialurónico de la invención tiene entre aproximadamente 150 o 151 y aproximadamente 300 kDa.

[0082] Tal como se utiliza en el presente documento, una **"molécula de señalización"** que **"puede activar o potenciar la activación de la vía de señalización Notch"** incluye, entre otros, los ligandos Notch DLL1, DLL3, DLL4, JAG1 y JAG2 y los ligandos de integrina. En una realización preferida de la invención, dichos ligandos se seleccionan de ligandos Notch tales como DLL4 y ligandos de integrina tales como gelatina, VCAM1 y otros. Los ligandos Notch, tales como DLL4, interactúan con los receptores Notch y los activan. Los ligandos de integrina, que en algunas realizaciones corresponden a VCAM1, son moléculas de adhesión celular que se unen al dímero de integrina $\alpha 4\beta 1$, promoviendo la interacción entre la célula y la superficie funcionalizada, permitiendo así una interacción adicional entre la célula y el ligando Notch unido a la superficie, tal como DLL4. Por lo tanto, los ligandos Notch y de integrina juntos potencian la activación de la vía de señalización Notch cuando entran en contacto con la superficie celular. Los presentes inventores han demostrado previamente efectos sinérgicos de los ligandos DLL4 y VCAM1 inmovilizados o adsorbidos en la producción de HSPC, células T progenitoras y células T maduras (Michaels et al., 2022).

[0083] Tal como se utiliza en el presente documento, **"Delta-like-4"**, **"DL4"**, **"DLL4"** y **"ligando Notch DL4"** se refieren a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen DLL4. DL4 es un miembro de la vía de señalización Notch y también se conoce en la técnica como "ligando Delta-like 4" y "DLL4". En el presente documento, la referencia a DLL4 no se limita a la proteína DL4 completa, sino que incluye al menos la porción del péptido de señalización de DLL4. Por ejemplo, un producto disponible comercialmente (Sino Biological) que comprende el dominio extracelular (Met 1-Pro-524) de DLL4 humano (número de acceso de DLL4 de longitud completa NP_061947.1; SEQ ID NO: 1) fusionado a la región Fc de IgG 1 humana en el extremo C-terminal es una proteína DL4 adecuada para su uso en el presente documento.

[0084] Tal como se utiliza en el presente documento, **"Molécula de adhesión celular vascular 1"**, **"VCAM-1"** y **"VCAM1"** se refieren a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen VCAM1. VCAM1 es una sialoglicoproteína de superficie celular, una proteína de membrana de tipo I que es miembro de la superfamilia de las Ig. VCAM1 también se conoce en la técnica como "proteína de adhesión celular vascular 1" y "grupo de diferenciación 106" (CD106). En el presente documento, la referencia a VCAM1 no se limita a la proteína VCAM1 completa, sino que incluye al menos la porción del péptido de señalización de VCAM1 (QIDSPL (**SEQ ID NO: 2**) o TQIDSPLN (**SEQ ID NO: 3**)). Por ejemplo, una proteína quimérica VCAM-1 Fc de ratón disponible comercialmente (R&D) que comprende la región (Phe25-Glu698) de VCAM-1 de ratón (número de acceso de VCAM-1 murina de longitud completa CAA47989; **SEQ ID NO: 4**) fusionada con la región Fc de IgG 1 humana es una proteína VCAM-1 adecuada para su uso en el presente documento. El uso de al menos una porción de VCAM-1

humana (número de acceso de VCAM-1 humana de longitud completa P19320, NP001069, EAW72950; **SEQ ID NO: 5**) también puede ser adecuado para su uso en el método proporcionado en el presente documento.

[0085] Tal como se utiliza en el presente documento, **"integrina(s)"** se refiere a una superfamilia de receptores de adhesión celular que se unen a ligandos de la matriz extracelular (MEC), ligandos de la superficie celular y ligandos solubles. Son heterodímeros $\alpha\beta$ transmembrana y en seres humanos se conocen al menos 18 subunidades α y ocho subunidades β , que generan 24 heterodímeros. Al unirse al ligando, las integrinas transducen señales hacia el interior celular; también pueden recibir señales intracelulares que regulan su afinidad de unión al ligando.

[0086] Tal como se utiliza en el presente documento, **"administración"**, **"administrar"** y sus variantes se refieren a la introducción de una composición o agente (p. ej., ácidos nucleicos tales como ADNc) en un sujeto, e incluyen la introducción simultánea y secuencial de una o más composiciones o agentes. Por ejemplo, la administración puede referirse a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, diagnósticos, de investigación, de placebo y experimentales. La administración también abarca tratamientos in vitro y ex vivo. La administración puede realizarse por cualquier vía adecuada, incluyendo la oral, la pulmonar, la intranasal, la parenteral (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea), la rectal, la intralinfática, la intratumoral o la tópica. La administración incluye la autoadministración y la administración por parte de terceros. Una vía de administración adecuada permite que la composición o el agente realice su función prevista. Por ejemplo, si la vía adecuada es la intravenosa, la composición se administra introduciendo la composición o el agente en una vena del sujeto.

[0087] Tal como se utiliza en el presente documento, **"vehículo"** incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, tampones, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Los ingredientes activos suplementarios también pueden incorporarse a las composiciones.

[0088] La expresión **"farmacéuticamente aceptable"** se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción tóxica, alérgica o adversa de naturaleza similar cuando se administran a un huésped.

[0089] Tal como se utiliza en el presente documento, el término **"exógeno"** se refiere a una sustancia

presente en una célula u organismo que no es su fuente nativa. El término "exógeno" tal como se utiliza en el presente documento puede referirse a un ácido nucleico (p. ej., que codifica un polipéptido) o un polipéptido que ha sido introducido mediante un proceso en un sistema biológico, tal como una célula u organismo, en el que normalmente no se encuentra, y que se desea introducir en dicha célula u organismo. Alternativamente, "exógeno" puede referirse a un ácido nucleico o un polipéptido que ha sido introducido mediante un proceso en un sistema biológico, tal como una célula u organismo, en el que se encuentra en cantidades relativamente bajas y se desea aumentar la cantidad del ácido nucleico o del polipéptido en la célula u organismo (p. ej., para crear expresión o niveles ectópicos). Por el contrario, tal como se utiliza en el presente documento, el término "**endógeno**" se refiere a una sustancia que es nativa del sistema biológico o la célula en la que se encuentra.

[0090] El término "***in vivo***" se refiere a ensayos y procesos que ocurren en o dentro de un organismo, tal como un animal multicelular. En algunos aspectos descritos en el presente documento, puede decirse que un método o uso ocurre "***in vivo***" cuando se utiliza un organismo unicelular, como una bacteria. El término "***ex vivo***" se refiere a métodos y usos que se realizan mediante el uso de una célula viva con una membrana intacta que se encuentra fuera del cuerpo de un animal multicelular o una planta (p.ej., explantes, células cultivadas —incluyendo células primarias y líneas celulares—, líneas celulares transformadas, tejido extraído o células —incluyendo células sanguíneas—, entre otras). En algunos aspectos preferidos de la invención, los métodos para producir células progenitoras sanguíneas y células derivadas de las mismas, tales como células T progenitoras y células T, se realizan *ex vivo*.

[0091] El término "***in vitro***" se refiere a ensayos y métodos que no requieren la presencia de una célula con membrana intacta, como los extractos celulares, y puede referirse a la introducción de un circuito biológico sintético programable en un sistema no celular, como un medio que no contenga células o sistemas celulares, tales como los extractos celulares.

[0092] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**sujeto**" se refiere a un ser humano o animal al que se le administra un tratamiento, incluyendo el tratamiento profiláctico. Por lo general, el animal es un vertebrado, como, entre otros, un primate, un roedor, un animal doméstico o un animal de caza. Los primates incluyen, entre otros, **chimpancés**, monos cynomolgus, monos araña y macacos (p. ej., Rhesus). Los roedores incluyen, entre otros, ratones, ratas, marmotas, hurones, conejos y hámsters. Los animales domésticos y de caza incluyen, entre otros, vacas, caballos, cerdos, ciervos, bisontes, búfalos, especies felinas (p. ej., gatos domésticos), especies caninas (p. ej., perro, zorro y lobo), especies aviares (p. ej., pollo, emú y avestruz) y peces (p. ej., trucha, bagre y salmón). En ciertos aspectos descritos en el presente documento, el sujeto es un **mamífero** (p. ej., un primate o un ser

humano). Un sujeto puede ser macho o hembra. Además, un sujeto puede ser un bebé o un niño. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un neonato o un sujeto no nacido (p. ej., in utero). Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo o una vaca, pero no se limita a estos ejemplos. Los mamíferos distintos de los seres humanos pueden utilizarse ventajosamente como sujetos que representan modelos animales de enfermedades y trastornos. Además, los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden utilizarse para animales domésticos y/o mascotas. Un sujeto humano puede ser de cualquier edad, sexo, raza o grupo étnico (p. ej., caucásico (blanco), asiático, africano, negro, afroamericano, afroeuropeo, hispano, mediorienta, etc.). En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un paciente u otro sujeto en un entorno clínico. En algunas realizaciones, el sujeto ya se encuentra en tratamiento.

[0093] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos **"suprimir", "disminuir", "interferir", "inhibir", "reducir"** y términos similares se refieren generalmente al acto de reducir, ya sea directa o indirectamente, una concentración, nivel, función, actividad o comportamiento con respecto a la condición natural, esperada o promedio, o con respecto a una condición de control.

[0094] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos **"tratar", "tratando" y "tratamiento"** incluyen la supresión, la inhibición sustancial, la ralentización o la reversión de la progresión de una afección, la mejora sustancial de los síntomas clínicos de una afección, la prevención sustancial de la aparición de los síntomas clínicos de una afección y/o la obtención de resultados clínicos beneficiosos o deseados. El tratamiento también se refiere a lograr uno o más de los siguientes: (a) reducir la gravedad de uno o más trastornos; (b) limitar el desarrollo de síntomas característicos de uno o más trastornos que se estén tratando; (c) limitar el empeoramiento de síntomas característicos de uno o más trastornos que se estén tratando; (d) limitar la recurrencia de uno o más trastornos en pacientes que hayan tenido previamente dicho(s) trastorno(s); y (e) limitar la recurrencia de síntomas en pacientes que presentaron previamente síntomas de uno o más trastornos.

[0095] **"Resultados clínicos beneficiosos o deseados"**, tales como efectos farmacológicos y/o psicológicos, incluyen, entre otros, la prevención de la aparición de una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto que puede o no estar predispuesto a la enfermedad, trastorno o afección pero que aún no experimenta ni manifiesta síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico); el alivio de los síntomas de una enfermedad, trastorno o afección; la disminución de la extensión de una enfermedad, trastorno o afección; la estabilización (sin empeoramiento) de una enfermedad, trastorno o afección; la prevención de la propagación de una enfermedad, trastorno o afección; el retraso o la ralentización de la

progresión de una enfermedad, trastorno o afección; la mejora o paliación de una enfermedad, trastorno o afección; y combinaciones de los mismos, así como la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en ausencia de tratamiento.

[0096] Tal como se utiliza en el presente documento **“cantidad eficaz”** es una cantidad suficiente para producir un efecto deseado (p. ej., potenciar el cultivo celular, la diferenciación en diversos tipos celulares o la inhibición de la expresión de un gen o secuencia diana). Los ensayos adecuados para medir la expresión de un gen o secuencia diana incluyen, por ejemplo, el examen de los niveles de proteínas o ARN mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como dot blots, Northern blots, hibridación in situ, ELISA, inmunoprecipitación y función enzimática, así como ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la técnica.

[0097] Tal como se utiliza en el presente documento, **“efecto terapéutico”** se refiere a una consecuencia del tratamiento cuyos resultados se consideran deseables y beneficiosos. Un efecto terapéutico puede incluir, directa o indirectamente, la detención, reducción o eliminación de una manifestación de la enfermedad y/o la progresión de una manifestación de la enfermedad.

[0098] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos **“cantidad(es) terapéutica(s)”**, **“cantidad(es) terapéuticamente eficaz(ces)”**, **“una cantidad eficaz”** y **“cantidad(es) farmacéuticamente eficaz(ces)”** de un agente activo se utilizan de manera intercambiable para referirse a una cantidad suficiente para proporcionar el beneficio previsto de un tratamiento. Sin embargo, los niveles de dosificación se basan en una variedad de factores, incluyendo el tipo de lesión, la edad, el peso, el sexo y/o la condición médica del paciente, la gravedad de la afección, la vía de administración y el agente activo particular empleado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar considerablemente, pero puede determinarse de forma rutinaria por un médico o profesional de la salud mediante métodos estándar. Además, los términos **“cantidad(es) terapéutica(s)”**, **“cantidad(es) terapéuticamente eficaz(ces)”** y **“cantidad(es) farmacéuticamente eficaz(ces)”** incluyen cantidades profilácticas o preventivas de las composiciones de la invención descrita. En las aplicaciones profilácticas o preventivas de la invención descrita, se administran composiciones farmacéuticas o medicamentos a un paciente susceptible o que de otro modo se encuentre en riesgo de padecer una enfermedad, trastorno o afección, en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, trastorno o afección, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, trastorno o afección, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad, trastorno o afección. En general, se prefiere utilizar una dosis máxima, es decir, la dosis más alta considerada

segura según criterio médico. Los términos **"dosis"** y **"dosificación"** se utilizan de manera intercambiable en el presente documento.

[0099] Para cualquier agente terapéutico descrito en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse inicialmente a partir de estudios preliminares *in vitro* y/o modelos animales. Una dosis terapéuticamente eficaz también puede determinarse a partir de datos en seres humanos. La dosis aplicada puede ajustarse en función de la biodisponibilidad relativa y la potencia del compuesto administrado. El ajuste de la dosis para lograr la eficacia máxima basándose en los métodos descritos en el presente documento y otros métodos bien conocidos está dentro de las capacidades de una persona con conocimientos ordinarios en la técnica. Los principios generales para determinar la eficacia terapéutica pueden encontrarse en el Capítulo 1 de Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.^a edición, McGraw-Hill (Nueva York) (2001), que se incorpora en el presente documento por referencia.

[0100] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos **"que comprende"**, **"comprender"**, **"contener"** y sus variantes se utilizan en referencia a composiciones, métodos y sus respectivos componentes que son esenciales para el método o la composición, pero abiertos a la inclusión de elementos no especificados, ya sean esenciales o no.

[0101] Tal como se utiliza en el presente documento, el término **"que consiste esencialmente en"** se refiere a los elementos necesarios para una realización determinada. El término permite la presencia de elementos que no afectan sustancialmente las características básicas y novedosas o funcionales de dicha realización.

[0102] Tal como se utiliza en el presente documento, **"que consiste en"** se refiere a composiciones, métodos y sus respectivos componentes que excluyen cualquier elemento no mencionado en dicha descripción de la realización.

[0103] Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares **"un"**, **"una"** y **"el/la"** incluyen referencias en plural, tales como "uno o más", a menos que el contexto requiera lo contrario. Por ejemplo, las referencias a **"el método"** incluyen uno o más métodos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que resultarán evidentes para los expertos en la técnica al leer esta divulgación, entre otros. Del mismo modo, la palabra "o" tiene la intención de incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la

práctica o comprobación de esta divulgación, en el presente documento se describen métodos y materiales adecuados. La abreviatura "**p. ej.**" se deriva del latín *exempli gratia* y se utiliza en el presente documento para indicar un ejemplo no limitativo. Por lo tanto, la abreviatura "p. ej." es sinónima del término "por ejemplo". Con respecto a los elementos descritos como uno o más dentro de un conjunto, debe entenderse que todas las combinaciones dentro del conjunto quedan contempladas. Si los aspectos de la invención se describen como "que comprenden" una característica, también se contemplan realizaciones que incluyen "que consisten en" o "que consisten esencialmente en" dicha característica.

[0104] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "**tales como**", "**por ejemplo**" y similares tienen la intención de referirse a realizaciones a modo de ejemplo y no de limitar el alcance de la presente divulgación.

[0105] A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tendrán los significados que son comúnmente comprendidos por las personas con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece la invención y/o divulgación.

[0106] Salvo en los ejemplos operativos o donde se indique lo contrario, todos los números que expresen cantidades de ingredientes, peso molecular, condiciones de reacción y similares, tal como se describen en el presente documento, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". A menos que se indique lo contrario, el término "aproximadamente" cuando se utiliza en relación con porcentajes puede significar $\pm 1\%$. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar en función de las propiedades deseadas que se busca obtener con la presente invención. Como mínimo, y sin pretender limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de cifras significativas indicadas y aplicando técnicas de redondeo ordinarias.

[0107] Sin perjuicio de que los intervalos numéricos y parámetros que establecen el alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos operativos específicos se indican con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de ensayo.

[0108] La implementación práctica puede incluir cualquiera de las características descritas en el presente documento o todas ellas. Estos y otros aspectos, características y diversas combinaciones pueden expresarse como métodos, aparatos, sistemas, medios para realizar funciones, usos y de otras maneras, combinando las características descritas en el presente documento.

[0109] Las características, propiedades, compuestos, fracciones o grupos químicos descritos en relación con un aspecto, realización o ejemplo particular de la invención deben entenderse como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo, a menos que sean incompatibles con los mismos. Todas las características divulgadas en el presente documento (incluyendo cualquier reivindicación adjunta, resumen y dibujos), y/o todas las etapas de cualquier método o proceso así divulgado, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto combinaciones en las que al menos algunas de dichas características y/o etapas se excluyan mutuamente. La invención no está restringida a los detalles de ningún ejemplo o realización descrito en el presente documento. La invención se extiende a cualquier elemento novedoso, o cualquier combinación novedosa, de las características divulgadas en la presente memoria descriptiva (incluyendo cualquier reivindicación adjunta, resumen y dibujos) o a cualquier etapa novedosa, o cualquier combinación novedosa de etapas, de cualquier método o proceso divulgado.

I. Hidrogeles funcionalizados

[0110] Los hidrogeles son redes reticuladas de polímeros hidrófilos que han sido ampliamente utilizados para el cultivo celular 3D (Oliveira & Reis, 2008). Tienen el potencial de imitar fielmente la rigidez de la MEC y las intrincadas interacciones 3D célula-célula y célula-matriz de los órganos nativos (Xue et al., 2022). En algunos aspectos, la presente invención proporciona un hidrogel que está funcionalizado para imitar el microentorno y la MEC del timo.

[0111] En algunos aspectos, la invención proporciona un hidrogel 3D para promover la diferenciación y/o expansión de células, tales como HSPC, HSC, HPC o combinaciones de las mismas, en un método para producir células T progenitoras y precursoras, o en otras realizaciones células T maduras.

[0112] En términos generales, la invención proporciona un hidrogel que comprende: un primer polímero biocompatible que es un polímero polisacárido; un segundo polímero biocompatible; un agente de unión a proteína de fusión Fc; y al menos un ligando de proteína de fusión Fc conjugado al agente de unión a proteína de fusión Fc, en el que el primer polímero biocompatible está conjugado a (i) el segundo polímero biocompatible y (ii) el agente de unión a proteína de fusión Fc mediante química clic. El primer y el segundo polímero biocompatible y el agente de unión a proteína de fusión Fc son modificados para

permitir dicha conjugación mediante química clic. En algunos aspectos, el hidrogel puede estar en estado líquido y/o gelificado, en el que en el estado gelificado [oración incompleta en el original]. En otras realizaciones más, el hidrogel es sembrado con al menos una célula, la cual queda encapsulada en el interior del hidrogel en una estructura tridimensional. En algunos otros aspectos, el hidrogel es sembrado con aproximadamente 500,000 células por 1 mL de hidrogel. En algunos otros aspectos, el hidrogel es sembrado con aproximadamente 300,000 a aproximadamente 2,000,000 células/mL de hidrogel. En la realización preferida de la invención, las células sembradas son HSPC, HSC, HPC o combinaciones de las mismas. En algunos otros aspectos, las células derivan de sangre de cordón (SC), utilizando métodos conocidos en la técnica. En otros aspectos más, las células derivan de iPSC, utilizando métodos conocidos en la técnica.

[0113] En términos generales, en algunos aspectos, el hidrogel 3D de la invención comprende un primer polímero biocompatible que es un polímero polisacárido, al menos un segundo polímero biocompatible y al menos una molécula de señalización inmovilizada directa o indirectamente en los primeros y/o segundos polímeros, en el que el primer polímero biocompatible está reticulado con dicho al menos un segundo polímero biocompatible mediante química clic, y en el que el primer y el segundo polímero biocompatible son modificados para permitir la reticulación mediante química clic.

[0114] En algunos aspectos, los componentes del hidrogel 3D se seleccionan para imitar la estructura 3D, el microentorno y/o la rigidez de la MEC del timo. En algunos aspectos, la rigidez del hidrogel está determinada por las cantidades relativas de los polímeros biocompatibles y corresponde a la rigidez de una región del timo humano. En algunos otros aspectos, la rigidez del hidrogel 3D tiene un módulo de Young de 2,5 a 3,5 kPa.

[0115] En algunas realizaciones de la invención, el primer polímero puede comprender polisacáridos sintéticos o naturales, incluyendo, entre otros, alginato, quitosano, celulosa o ácido hialurónico (HA) o sales o ésteres de los mismos. El HA es un polisacárido natural que se encuentra en la matriz extracelular tímica y de la médula ósea (Goncharova et al., 2012; Lins, 2022). Es un polímero comúnmente utilizado en sistemas de hidrogel debido a su biocompatibilidad y la abundancia de grupos funcionales, tales como grupos carboxilo, hidroxilo y N-acetilo, para la funcionalización o reticulación (An et al., 2021). Además, estudios han demostrado que la adición de HA en el cultivo en hidrogel de HSPC mejora su proliferación, mientras que los microgeles 3D basados en gelatina se han utilizado para el co-cultivo de OP9-DLL4 con HSC murinas para producir células T progenitoras (**Vallmajo-Martin et al., 2020; Suraiya et al., 2020**). Por ello, en una realización preferida, el primer polímero del hidrogel es ácido hialurónico (HA) o una sal o éster del mismo. En algunos aspectos, el ácido hialurónico es una sal de ácido hialurónico seleccionada del grupo que consiste en hialuronato de sodio, hialuronato de

potasio, hialuronato de magnesio e hialuronato de calcio. En algunos aspectos, el primer polímero biocompatible es una sal de ácido hialurónico de entre aproximadamente 150 y aproximadamente 300 kDa. En otra realización, es un ácido hialurónico modificado para permitir la unión a un segundo polímero y a un agente de unión a proteína de fusión Fc mediante química clic.

[0116] En algunos aspectos, dicho al menos un segundo polímero biocompatible se selecciona de uno o más de un polímero natural y/o un polímero sintético, tal como un polímero sintético que sea inerte a la degradación por enzimas celulares. En algunos otros aspectos, dicho al menos un segundo polímero biocompatible actúa tanto como (i) reticulante y como (ii) uno o más de un estabilizador de hidrogel, un agente de rigidización, una molécula de adhesión celular, un polímero basado en RGD que promueve la adhesión y/o migración celular y un polímero que tiene un sitio de unión al receptor de integrina, tal como RGD. En otros aspectos más, dicho al menos un segundo polímero biocompatible es un alcohol polivinílico sintético, polietilenglicol (PEG), poliacrilato de sodio, polímeros y copolímeros de acrilato, sales o ésteres de los mismos, un polímero sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 kDa, o una combinación de cualquiera de los anteriores.

[0117] En algunas realizaciones, dicho al menos un segundo polímero biocompatible es una gelatina, un PEG o una combinación de los mismos. En otras realizaciones, dicho al menos un segundo polímero biocompatible es una gelatina, que puede tener entre aproximadamente 40 y aproximadamente 70 kDa. Un experto en la técnica comprenderá que otros polímeros biocompatibles con propiedades variables serán adecuados.

[0118] En algunas realizaciones, la molécula de señalización puede ser una proteína de fusión Fc, en el que el hidrogel 3D comprende además un agente de unión a proteína de fusión Fc, en el que el primer polímero biocompatible está conjugado al agente de unión a proteína de fusión Fc mediante química clic, y en el que el primer polímero biocompatible y el agente de unión a proteína de fusión Fc son modificados para permitir dicha conjugación mediante química clic. En algunos aspectos, se utiliza química clic norborneno-tetrazina (p. ej., metiltetrazina) para reticular el primer y el segundo polímero biocompatible. En algunos aspectos, el primer polímero es modificado con al menos dos norbornenos y el segundo polímero y el agente de unión a proteína de fusión Fc son modificados cada uno con al menos una metiltetrazina.

[0119] En algunas realizaciones la química clic utilizada en la formación de los hidrogeles de la invención es una ligación norborneno (Nb)-tetrazina (tal como metiltetrazina), en la que el primer polímero (p. ej., HA) es modificado con norborneno (p. ej., 5-norborneno-2-metilamina) para producir HA-norborneno. Dado que el HA es un polímero, en algunas realizaciones de 150 a 300 kDa, habrá

muchas moléculas de norborneno en el polímero de HA (p. ej., en algunas realizaciones 1,5 equivalentes de norborneno en comparación con el HA), siendo cada una sitios potenciales para la química clic norborneno-tetrazina (metiltetrazina) para la conjugación con el segundo polímero o el agente de unión a proteína de fusión Fc, siendo cada uno de los últimos modificados con una tetrazina tal como una metiltetrazina, tal como el éster metiltetrazina-sulfo-NHS. En algunas realizaciones, se utilizan aproximadamente 24 µg de ProG por 1 mg de HA. Por lo tanto, el primer polímero modificado es conjugado mediante química clic al agente de unión a proteína de fusión Fc modificado a través de un enlace norborneno-metiltetrazina, y también conjugado al segundo polímero modificado a través de un enlace norborneno-metiltetrazina.

[0120] En algunas realizaciones, el segundo polímero es una fracción reticulante. El agente de reticulación puede seleccionarse de una variedad de reticulantes naturales o sintéticos. En algunas realizaciones, el reticulante de segundo polímero es un polímero sintético, tal como el polietilenglicol (PEG), incluyendo, entre otros, PEG de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 kDa. Un experto en la técnica comprenderá que intervalos más amplios serán adecuados. En algunas realizaciones es un PEG multibrazo, tal como un PEG de 4 brazos, p. ej., un PEG de 4 brazos bioinerte, o en algunas otras realizaciones un PEG de 6 brazos. En algunos aspectos, el PEG es un derivado de PEG multibrazo seleccionado del grupo que consiste en PEG-amina, PEG-azida, PEG-tiol, PEG-acrilamida, PEG-maleimida, éster PEG-NHS, PEG-hidroxilo, PEG-DBCO, ácido PEG, PEG-aldehído, metoxi-PEG, PEG-acrilato, biotina-PEG, colesterol-PEG, PEG-epóxido, PEG-hidrazida, diacrilato de PEG y sales de los mismos, o en otras realizaciones es una PEG-amina o sal de la misma.

[0121] En una realización, el segundo polímero biocompatible es PEG debido a su conveniencia, flexibilidad y capacidad para prevenir la adsorción de proteínas y la adhesión celular. Esta selección permite investigar las consecuencias de la introducción de elementos bioactivos en el biomaterial (Moore & West, 2019). Por ello, en algunas realizaciones preferidas, el segundo polímero modificado es una PEG-tetrazina (o PEG-metiltetrazina). En algunas realizaciones, el PEG está presente en cantidades de 0 a aproximadamente 16,8 mg/mL de hidrogel. En algunas otras realizaciones, el PEG de 4 brazos modificado es una PEG-amina de 4 brazos con una concentración de aproximadamente 126 mg por 1 mL de hidrogel 3D. En otras realizaciones más, la PEG-amina o sal de la misma es modificada con un ácido metiltetrazina.

[0122] En algunas otras realizaciones, el segundo polímero puede ser un reticulante. En algunas realizaciones también puede ser un agente de rigidización, tal como una molécula de adhesión, incluyendo, entre otros, gelatina, fibronectina y sus derivados, colágeno y sus derivados, laminina y sus derivados y P-selectina. Se ha demostrado que la incorporación de moléculas de adhesión en los

sistemas de diferenciación de células T potencia la diferenciación (Shukla et al., 2017a; Edgar et al., 2022; Iriguchi et al., 2021). Los hidrogeles de gelatina han encontrado aplicación en la ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad, características de adhesión celular y facilidad de modificación (K. Han et al., 2021). Además, la gelatina se deriva de la desnaturalización del colágeno, que es una de las proteínas de la MEC más abundantes en el cuerpo humano y es responsable de activar vías de señalización pro-supervivencia en diversos tipos celulares (Castagnaro et al., 2018; Gendron et al., 2003). Si bien se ha demostrado que la gelatina favorece la diferenciación de HSC murinas en progenitores de células T, la gelatina no ha sido utilizada para el desarrollo de células T humanas (Suraiya et al., 2020). Por ello, en algunas realizaciones preferidas, el segundo polímero modificado es una gelatina-tetrazina (o gelatina-metiltetrazina). En algunas realizaciones, la gelatina es de aproximadamente 60 kDa. En otras realizaciones, tiene entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 kDa, y en otras entre aproximadamente 40 y aproximadamente 70 kDa. En algunas otras realizaciones, la gelatina está presente en el hidrogel en una proporción de aproximadamente 1 a aproximadamente 10% p/v; en otras realizaciones de aproximadamente 2 a aproximadamente 10%; en otras realizaciones más de aproximadamente 2 a aproximadamente 5%; y en otras realizaciones más al aproximadamente 5% p/v del hidrogel.

[0123] En otras realizaciones más, el hidrogel puede comprender más de un tipo de segundo polímero, tal como puede comprender un polímero sintético, un polímero natural o ambos, o más particularmente en algunas realizaciones puede comprender un PEG, una gelatina o ambos, siendo cada uno modificado con una tetrazina (p. ej., una metiltetrazina) para permitir el enlace clic al primer polímero modificado. En algunas realizaciones, dichos uno o más segundos polímeros comprenden, de forma separada o combinada, entre 0 y aproximadamente 10% p/v del hidrogel. La cantidad de polímeros secundarios naturales (p. ej., gelatina) y sintéticos (p. ej., PEG) puede variar y ajustarse para obtener la estabilidad y rigidez deseadas. En otra realización, cuando las HSPC se derivan de sangre de cordón, el segundo polímero puede ser un PEG, una gelatina o ambos. En otra realización más, cuando las HSPC se derivan de iPSC, dicho al menos un segundo polímero comprende tanto gelatina como PEG.

[0124] En una realización preferida de la presente invención para la generación de células T progenitoras y precursoras y células T maduras, la rigidez del hidrogel imitaría la de la MEC del timo. En algunas realizaciones, el módulo de Young es de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5 kPa; en algunas otras realizaciones, de aproximadamente 2,8 a aproximadamente 3,3 kPa; en otras realizaciones más, de aproximadamente 3,0 kPa; y en otras realizaciones más, de aproximadamente $3,1 \pm 1,74$ kPa.

[0125] En algunas realizaciones, el agente de unión a proteína de fusión Fc está presente para unirse a

un ligando de señalización e inmovilizarlo, tal como un ligando de señalización Notch o un ligando de integrina o de adhesión, seleccionado para funcionalizar el hidrogel y lograr la diferenciación y expansión celular deseadas. En una realización preferida, el agente de unión a proteína de fusión Fc es Proteína G (ProG) o Proteína A (ProA); en algunas otras realizaciones es ProG. Por consiguiente, el agente de unión a proteína de fusión Fc se une a una proteína de fusión Fc, tal como al menos una proteína de señalización de fusión Fc humana, que es una proteína de señalización fusionada al dominio Fc de la inmunoglobulina humana. Dicho al menos un ligando de señalización se selecciona del grupo que consiste en uno o más ligandos Notch, uno o más ligandos de integrina y una combinación de los mismos, en el que el uno o más ligandos Notch se seleccionan del grupo que consiste en DLL1, DLL3, DLL4, JAG1, JAG2 y una combinación de los mismos, siendo más preferiblemente DLL4 o DLL4 humano recombinante. En algunos otros aspectos, el ligando Notch (DLL4) está presente en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 $\mu\text{g/mL}$ de hidrogel, o en algunas realizaciones de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 $\mu\text{g/mL}$ de hidrogel. En algunos otros aspectos, el uno o más ligandos de integrina se seleccionan del grupo que consiste en VCAM1, ICAM1, vitronectina, fibrinógeno, fibronectina y sus derivados, colágeno y sus derivados, laminina y combinaciones de los mismos.

[0126] El agente de unión a proteína de fusión Fc ProG es modificado con tetrazina (metiltetrazina, o más específicamente con el éster metiltetrazina-sulfo-NHS o un éster de metiltetrazina adecuado) para conjugarse mediante química clic al primer polímero modificado (p. ej., HA-norborneno). En algunas realizaciones, el ProG-Tz tiene una concentración de aproximadamente 24 μg por 1 mg de ácido hialurónico.

[0127] Estudios previos sugirieron que, dependiendo del tipo celular, la rigidez específica de la MEC puede potenciar la señalización Notch, que desempeña un papel crucial en el desarrollo de células T (Kretschmer et al., 2023; Safaee et al., 2017). Además, los inventores han demostrado previamente que VCAM1 aumenta la señalización Notch de HSC en diferenciación en sistemas de cultivo 2D y dirige las células madre hacia el destino de células T (Shukla et al., 2017a; Michaels et al., 2022). Estudios previos han explorado el uso de proteínas que promueven la adhesión celular, tales como VCAM1 y retronectina, para potenciar la diferenciación de células T a partir de HSPC (Iriguchi et al., 2021; Michaels et al., 2022). Una realización de la presente invención adopta un enfoque novedoso, incorporando gelatina con hidrogeles funcionalizados con ligandos Notch para la diferenciación acelerada de células T. Si bien se sabe que los hidrogeles de gelatina potencian la diferenciación de algunas células encapsuladas, incluyendo la diferenciación neural y angiogénica a partir de células madre mesenquimales (Lee et al., 2017; Yao et al., 2021), no se ha informado que los hidrogeles de gelatina afecten el desarrollo de células T humanas.

[0128] En otras realizaciones más, el hidrogel de la invención se encuentra en forma líquida o gelificada. En otras realizaciones más, en forma gelificada.

[0129] En otras realizaciones más, la invención proporciona composiciones de diversos componentes y combinaciones de componentes del hidrogel, tales como: el primer polímero modificado (p. ej., HA-norborneno), el segundo polímero modificado (p. ej., PEG-Tz o gelatina-Tz), el agente de unión a proteína de fusión Fc modificado (p. ej., ProG-Tz), el agente de unión a proteína de fusión Fc y la proteína de fusión Fc (p. ej., ProG-Fc-DLL4) o el agente de unión a proteína de fusión Fc modificado y la proteína de fusión Fc (p. ej., mTz-ProG-Fc-DLL4). En otras realizaciones, HA-norborneno-ProG-Tz con o sin DLL4-Fc y/o HA-norborneno conjugado a uno o más segundos polímeros modificados. Los componentes pueden añadirse a una solución en condiciones adecuadas para formar el hidrogel con las propiedades deseadas. En otros aspectos más, la invención proporciona una solución del hidrogel líquido y células sembradas (HSPC), así como el hidrogel gelificado con células encapsuladas y/o esferoides.

[0130] En términos muy generales, en algunos aspectos el hidrogel comprende:

Primer polímero	Segundo polímero		Ligando inmovilizado
HA (u otro polisacárido)	Gelatina/Colágeno	PEG	Ligando Notch inmovilizado
0.75 - 1.1% w/v	1-10% w/v (o 2-10% o 2-5% o 5%)	0-2% w/v	50-200 mg/mL de hidrogel 0.005-0.02% w/v

[0131] La presente invención comprende además métodos para fabricar los hidrogeles 3D como se describe en el presente documento.

[0132] En un aspecto, el método para fabricar el hidrogel 3D de la presente invención comprende (i) una etapa de reticulación, en la que un primer polímero biocompatible es reticulado con al menos un segundo polímero biocompatible para formar una matriz de hidrogel 3D, y en la que la reticulación puede lograrse mediante medios químicos, tal como la química clic, o medios físicos, tal como la fotorreticulación; y (ii) una etapa de inmovilización de la molécula de señalización, en la que al menos una molécula de señalización es inmovilizada en el interior de la matriz de hidrogel 3D mediante la conjugación directa o indirecta de dicha al menos una molécula de señalización al primer polímero biocompatible y/o a dicho al menos un segundo polímero biocompatible.

[0133] En un aspecto, el primer polímero biocompatible y dicho al menos un segundo polímero biocompatible son modificados para permitir la etapa de reticulación, para permitir la etapa de inmovilización de la molécula de señalización, o para permitir tanto la etapa de reticulación como la etapa de inmovilización de la molécula de señalización.

[0134] En otro aspecto, la molécula de señalización es modificada para permitir la etapa de inmovilización de la molécula de señalización. En una realización, se utiliza un agente de unión para inmovilizar la molécula de señalización en el interior de la matriz de hidrogel 3D, y el agente de unión es modificado para permitir la conjugación con el primer polímero biocompatible y/o con dicho al menos un segundo polímero biocompatible. En otro aspecto más, la molécula de señalización es una proteína de fusión Fc humana y el agente de unión es una proteína que se une con alta afinidad a la proteína de fusión Fc, tal como Proteína A o Proteína G.

[0135] En una realización, los polímeros biocompatibles y/o el agente de unión son modificados con grupos reactivos de química clic. En otra realización, se utiliza química clic norborneno-tetrazina. Por ejemplo, en una realización, el primer polímero biocompatible es modificado con un grupo norborneno y dicho al menos un segundo polímero biocompatible es modificado con un grupo metiltetrazina. En otra realización, el agente de unión es modificado con un grupo reactivo de química clic, tal como un grupo norborneno o un grupo metiltetrazina.

[0136] En un aspecto, el primer polímero biocompatible, dicho al menos un segundo polímero biocompatible y la molécula de señalización se mezclan en una solución para formar el hidrogel 3D en estado líquido; dicha al menos una célula puede ser sembrada en el hidrogel 3D en estado líquido, siendo dicha al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en células madre hematopoyéticas (HSC), células progenitoras hematopoyéticas (HPC) y una combinación de las mismas (es decir, HSPC); y a continuación el hidrogel 3D pasa a estado gelificado, encapsulando así la al menos una célula sembrada.

II. Método para producir células T y sus progenitoras mediante las composiciones e hidrogeles de la invención

[0137] La invención proporciona un método para el desarrollo de células T in vitro, tal como el desarrollo de células T humanas, que comprende: proporcionar el hidrogel 3D de la invención y sembrar el hidrogel 3D con HSC, HPC o HSPC. En algunos aspectos de la invención, las células son células humanas. En otros aspectos, las células son células derivadas de sangre de cordón o derivadas de iPSC. El hidrogel se encuentra en una forma (líquida, de gel u otra) que le permite

encapsular las células en la forma gelificada 3D del gel.

[0138] En algunos aspectos de la invención, el método implica cultivar las células en el interior del hidrogel 3D en condiciones que promueven la especificación linfoide (linfopoyesis), la diferenciación en células T progenitoras y precursoras y la maduración de células T, generando [al menos un tipo celular seleccionado del grupo que consiste en] progenitores tempranos de células T (ETP) CD7(+), células Pro-T específicas de linaje CD7(+)/CD5(+), células Pre-T comprometidas con el linaje CD7(+)/CD5(+)/CD1a(+), células CD4(+) positivas simples iniciales (ISP), células CD4(+)/CD8(+) doble positivas (DP), células T CD4(+) o CD8(+) positivas simples (SP) maduras capaces de secretar citocinas y combinaciones de las mismas.

[0139] En algunos otros aspectos, las células son sembradas en el hidrogel 3D a una densidad celular de aproximadamente 300,000 a aproximadamente 2,000,000 células por 1 mL de hidrogel 3D. En otro aspecto, las células son sembradas a una densidad de aproximadamente 500,000 células por 1 mL de hidrogel 3D. En otro aspecto más, las células son sembradas en el hidrogel 3D cuando el hidrogel se encuentra en estado líquido.

[0140] En algunos aspectos de la invención, las condiciones de cultivo son no xenogénicas, libres de células nodriza y libres de suero; y las condiciones comprenden un medio de cultivo definido.

[0141] En algunos aspectos, las condiciones comprenden cultivar las células en un medio basal suplementado con al menos una citocina. En algunos otros aspectos, el medio basal se selecciona del grupo que consiste en IMDM, RPMI, α MEM, SFEM II, StemPro34, XVIVO 15 y cualquier medio adecuado diseñado y optimizado para el cultivo de células madre humanas; y dicha al menos una citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-7, Flt3L, SCF, TPO, CXCL12, TNF- α , IL3, otras pequeñas moléculas incluyendo inhibidores de la apoptosis, metabolitos, vitaminas, albúmina sérica bovina y albúmina sérica humana y combinaciones de las mismas.

[0142] En algunos otros aspectos del método, las células son células madre hematopoyéticas (HSC) derivadas de sangre de cordón umbilical humana (SC), y el método comprende cultivar las células en el interior del hidrogel 3D, tal como la forma gelificada del hidrogel, que comprende:

- a. una primera etapa de cultivo, en la que las condiciones comprenden un medio basal suplementado con SCF, IL7, TPO y Flt3L durante 2 a 3 semanas; y
- b. una segunda etapa de cultivo, en la que las condiciones comprenden un medio basal suplementado con IL7 y Flt3L durante 3 a 10 semanas adicionales.

[0143] El método, en algunas realizaciones para células derivadas de SC, comprende además: disolver el hidrogel 3D tras la segunda etapa de cultivo mediante una solución enzimática y/o hidrólisis en función del segundo polímero; aislar las células T CD4(+)CD8(+) DP generadas tras la segunda etapa de cultivo; transferir las células T CD4(+)CD8(+) DP a un sustrato bidimensional (2D) recubierto con DLL4 y VCAM1; y cultivar las células T CD4(+)CD8(+) DP en un medio basal suplementado con IL7, Flt3L, un activador CD3/CD28 e IL-15 durante 2 semanas para generar células T CD8(+) SP maduras y células T CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+).

[0144] En algunas otras realizaciones las células son células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) derivadas de células madre pluripotentes (PSC). En otros aspectos, son células humanas. En otros aspectos, cultivar las HSPC derivadas de PSC en el interior del hidrogel 3D comprende: una primera etapa de cultivo, en la que las condiciones comprenden un medio basal suplementado con SCF, IL7, TPO y Flt3L durante aproximadamente 1 a 2 semanas; y una segunda etapa de cultivo, en la que las condiciones comprenden un medio basal suplementado con IL7 y Flt3L durante aproximadamente 2 a 10 semanas adicionales. En otros aspectos, el método comprende además: disolver el hidrogel 3D tras la segunda etapa de cultivo mediante una solución enzimática; aislar las células T CD4(+)CD8(+) DP generadas tras la segunda etapa de cultivo; transferir las células T CD4(+)CD8(+) DP a un sustrato 2D recubierto con DLL4 y VCAM1; y cultivar las células T CD4(+)CD8(+) DP en un medio basal suplementado con IL7, Flt3L, un activador CD3/CD28 e IL-15 durante 2 o más semanas para generar células T CD8(+) SP maduras y células T CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+).

[0145] En otros aspectos más, las células se cultivan en condiciones hipóxicas para potenciar la diferenciación y/o expansión.

III. Células producidas por/obtenibles a partir de los métodos y el uso de los hidrogeles de la presente invención

[0146] El cultivo de HSPC, tales como HSPC derivadas de sangre de cordón o derivadas de iPSC, encapsuladas en los hidrogeles funcionalizados de la presente invención, en los que los hidrogeles comprenden ligandos Notch inmovilizados, tales como DLL4, promueve la diferenciación de las células hacia células T progenitoras y precursoras que tienen la capacidad de diferenciarse adicionalmente en células T maduras en condiciones de cultivo adecuadas, ya sea en el interior del hidrogel o fuera de él. La invención también incluye los esferoides formados durante el cultivo celular mientras las células se encuentran aún en el interior del hidrogel. Las células y los esferoides generados por los métodos de la presente invención mediante los hidrogeles pueden recolectarse de los hidrogeles a través de reacciones enzimáticas y/o hidrólisis en función del segundo polímero. En el caso de polímeros

naturales como la gelatina, pueden utilizarse enzimas, mientras que en el caso del PEG, puede eliminarse mediante hidrólisis. Las células recolectadas pueden utilizarse entonces, como se describe en el presente documento, para diversas aplicaciones, incluyendo como fuente de células derivadas de donante: células T y células T progenitoras y precursoras.

IV. Usos de la invención

[0147] Los inventores han demostrado que los hidrogeles de la invención pueden utilizarse en el desarrollo de células T maduras y funcionales tanto a partir de células madre hematopoyéticas derivadas de sangre de cordón como inducidas. La encapsulación de células madre en el interior del hidrogel antes de la diferenciación también puede ser adecuada como material inyectable para la administración de células T in vivo y la generación de células T in situ.

[0148] Los datos descritos en el presente documento establecen la prueba de concepto para el uso de esta plataforma de hidrogel para producir células T maduras y funcionales a partir de las propias células madre del paciente. Se han generado datos adicionales que respaldan el uso del hidrogel como material inyectable para la producción de células T in situ.

[0149] En algunas realizaciones de la invención, los hidrogeles funcionalizados de la presente invención podrían formularse en una composición que puede administrarse o trasplantarse a un sujeto que lo necesite. En algunos aspectos, los hidrogeles comprenden células HSPC que pueden diferenciarse y expandirse in vivo y potenciar la capacidad del sujeto para producir células T y células T progenitoras y precursoras y/o esferoides de cualquiera de los anteriores. En algunos otros aspectos, las células T progenitoras y precursoras, las células T y los esferoides que las comprenden producidos pueden recolectarse y utilizarse en inmunoterapia, terapias de transferencia de células T y terapia CAR-T. En otros aspectos, las células HSPC en los hidrogeles se derivan de las propias células del sujeto. En otros aspectos, los hidrogeles que comprenden células T y células T progenitoras y precursoras podrían administrarse o trasplantarse en un sujeto. En otros aspectos, las células y los esferoides producidos por los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse en investigación y en el desarrollo de terapias/fármacos, y para otros usos descritos y contemplados en el presente documento. En aspectos adicionales, los hidrogeles de la presente invención podrían utilizarse en aplicaciones de impresión 3D. A continuación se amplían algunos de los usos de la presente invención.

[0150] En contraste con las plataformas de diferenciación existentes que utilizan sustratos 2D, los sistemas basados en hidrogeles 3D pueden utilizarse para proporcionar una plataforma para estudiar

los efectos de la MEC 3D en el desarrollo de células T y pueden replicar elementos cruciales del microentorno tímico necesarios para el desarrollo de células T, a saber, la arquitectura 3D del timo y la compleja composición de la MEC, que determinan la rigidez y las intrincadas interacciones célula-célula y célula-matriz.

[0151] En contraste con las plataformas existentes, la composición de hidrogel de la invención proporciona una plataforma no xenogénica libre de células nodriza y libre de suero que permite el desarrollo de células T clínicamente útil a partir de células progenitoras sanguíneas (HSPC) derivadas de SC y de PSC. La composición de hidrogel de la invención puede, por lo tanto, utilizarse potencialmente tanto como plataforma de desarrollo como de administración de células T para diversas terapias con células T, inyectando los biomateriales (p. ej., células T y/o sus progenitoras y/o precursoras encapsuladas en el hidrogel) en un paciente.

[0152] Además, la composición de hidrogel de la invención comprende polímeros biocompatibles, lo que permite que la composición de hidrogel se utilice para la producción de células T in vivo. En una realización, la composición de hidrogel es un nicho tímico artificial 3D que puede utilizarse como base para una plataforma que dirija la producción de células T a partir de las propias células progenitoras sanguíneas del paciente cuando se inyecta in vivo. Un enfoque similar fue explorado previamente utilizando criogeles de alginato funcionalizados con ligandos Notch (Shah et al., 2019). En contraste con el enfoque previamente descrito, el hidrogel de la presente invención permite la encapsulación directa de células y no depende de atraer células para que migren hacia el hidrogel. Además, si bien el criogel de alginato previamente descrito generó progenitores linfoides, no demostró capacidad para producir células T maduras, a diferencia de la composición de hidrogel de la presente invención, que sí es capaz de producirlas.

[0153] La invención tiene un potencial comercial sustancial. Las células T maduras y funcionales y/o sus progenitoras derivadas de los métodos de la presente invención pueden utilizarse en diversas terapias, incluyendo el reemplazo celular e inmunoterapias. También pueden ser una fuente de células T modificadas genéticamente. Las células T derivadas de la propia sangre del paciente y modificadas por ingeniería para reconocer una diana presente en células tumorales se utilizan actualmente como tratamientos potentes para cánceres hematológicos. A pesar de su eficacia, estos tratamientos personalizados o autólogos son extremadamente costosos, lo que ha limitado drásticamente su adopción generalizada. Las PSC tienen la capacidad de crecimiento ilimitado y, por lo tanto, proporcionan una fuente renovable y económica de material de partida para producir células T y/o sus progenitoras derivadas de progenitores sanguíneos (HSPC). La producción de células T progenitoras y

células T a partir de PSC utilizando los métodos clínicamente compatibles de la presente invención podría reducir el costo de la terapia con células T y hacerla más accesible. La terapia celular, incluyendo la inmunoterapia con células T, representa un mercado en rápido crecimiento de miles de millones de dólares con aplicaciones no solo para neoplasias malignas hematológicas sino también para el tratamiento de tumores sólidos, inmunodeficiencia y autoinmunidad. Las células producidas por o obtenibles a partir de los métodos de la presente invención también pueden modificarse genéticamente y/o utilizarse para terapia génica. Por ejemplo, el uso de la composición de hidrogel biocompatible similar a un nicho tímico como reservorio de administración en el trasplante de HSPC CAR puede acelerar la diferenciación de células madre, permitiendo la obtención de células T CAR más potentes en la terapia oncológica (Agarwalla et al., 2022; Gschweng et al., 2014).

[0154] [CUALQUIER OTRO USO/APLICACIÓN. LA APLICACIÓN *IN VIVO* PUEDE NO ESTAR RESPALDADA.]

EJEMPLOS

[0155] Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración, y no de limitación.

Métodos y materiales

Modificación de la Proteína G (ProG) con metiltetrazina

[0156] Se disolvieron 10 mg de Proteína G (ProG) (ThermoFisher Scientific, Fuente: *E. coli*, PM ~21,6 kDa, pureza del 98-100%) en 1 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente. Se añadieron 4 mg de éster metiltetrazina-sulfo-NHS (Click Chemistry) a la solución de ProG y se agitó durante la noche a 4 °C. La molécula de reticulante no reaccionada fue eliminada purificando el producto de la reacción mediante una columna de desalinización por centrifugación de 7 kDa (ThermoFisher Scientific), para obtener Proteína G funcionalizada con metiltetrazina (ProG-Tz). La ProG-Tz purificada fue caracterizada mediante espectrometría de masas por ionización por electrospray (ESI-MS).

Síntesis del hidrogel de HA e inmovilización de DLL4 y VCAM1

[0157] El HA fue modificado con grupos norborneno reactivos según se describe previamente en Delplace et al. *Nonswelling, ultralow content inverse electron-demand Diels-Alder hyaluronan hydrogels with tunable gelation time: Synthesis and in vitro evaluation*. Adv Funct Materials 2020;30(14):1903978; doi: 10.1002/adfm.201903978. Se disolvió 1 g de hialuronato de sodio (NaHA; Lifecore Biomedical, Fuente: fermentación bacteriana, PM 151-300 kDa) en ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 0,1 M a pH 5,5, y se hizo reaccionar con cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio (DMTMM) (3 eq) durante 30 minutos, seguido de la adición de 5-norborneno-2-metilamina (1,5 eq). Tras 15 horas, el producto de la reacción fue purificado mediante diálisis exhaustiva (membrana con umbral de corte de peso molecular (UCPM) de 100 kDa) contra NaCl 0,1 M (2 veces al día, 1 día) y después agua desionizada (AD) (2 veces al día, 4 días). La solución fue liofilizada y almacenada a -20 °C hasta su uso posterior. El grado de sustitución fue determinado mediante RMN de ¹H (500 MHz, D₂O, δ).

[0158] El HA-norborneno fue puesto a reaccionar con ProG-Tz purificado (5 eq) durante la noche a 4 °C. Una vez completada la reacción, el ProG-Tz no reaccionado fue bloqueado con ácido 5-norborneno-2-carboxílico durante 2 horas, seguido de diálisis (membrana UCPM de 100 kDa) contra tampón PBS 1x (2 veces al día, 1 día) y después AD (2 veces al día, 4 días). La solución fue liofilizada y almacenada a -

20 °C hasta su uso posterior. La cantidad de ProG inmovilizada en el HA (HA-ProG) fue cuantificada mediante análisis de aminoácidos utilizando el sistema Waters Pico-Tag y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Waters Corporation, Milford, MA).

[0159] Las muestras de HA que contenían ProG fueron hidrolizadas hasta obtener aminoácidos individuales utilizando HCl 6 N a 110 °C durante 24 horas. El HCl en exceso fue eliminado mediante evaporación a presión reducida, y los aminoácidos hidrolizados fueron sometidos a derivatización con fenilisotiocianato (PITC). Posteriormente, los aminoácidos marcados con grupos fenilo fueron aislados, y las muestras fueron cuantificadas empleando el estándar de aminoácidos Pierce H. La separación se llevó a cabo mediante una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 mm × 10 cm) a 48 °C. La detección de la señal tuvo lugar a 254 nm con un detector ACQUITY TUV, y los resultados fueron procesados mediante el software de cromatografía Waters Empower 2. Para los fines del análisis, se utilizaron los valores de glicina, y cada condición implicó tres réplicas de gel.

[0160] Para conjugar DLL4-Fc (Sino Biological) o VCAM1-Fc (RnDSystems), el HA-ProG fue disuelto primero a 25 mg/mL en el medio StemSpan SFEM II con citocinas (preparado según se describe en otro lugar de la descripción), seguido de la adición y conjugación de DLL4-Fc o VCAM1-Fc durante la noche a 4 °C.

Síntesis de gelatina-metiltetrazina y PEG-metiliterazina

[0161] Para sintetizar gelatina-metiltetrazina, se disolvió primero 1 g de gelatina (Sigma-Aldrich, Fuente: piel de pez de agua fría, PM 60 kDa) en 50 mL de PBS 10x. A continuación, se añadieron 48,5 mg de éster metiltetrazina-sulfo-NHS a la solución y se agitó durante la noche a 4 °C. El producto de la reacción fue purificado mediante diálisis exhaustiva (membrana UCPM de 12-14 kDa) contra AD (2 veces al día, 4 días). La solución fue liofilizada y almacenada a -20 °C hasta su uso posterior. El grado de sustitución fue determinado mediante espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis).

[0162] El reticulante de PEG fue modificado con grupos metiltetrazina reactivos según se describe previamente en Delplace et al., 2020. Se disolvieron 0,29 g de ácido metilfenil-tetrazina (Click Chemistry Tools) en 10 mL de diclorometano (Millipore Sigma) y se activó con 0,16 g de N,N'-diisopropilcarbodiimida. Se añadió 1 g de clorhidrato de PEG-amina de 4 brazos (JenKem, PM 5,240 kDa) y se agitó con 0,25 g de N,N-diisopropiletilamina (Sigma-Aldrich). Tras 72 horas, la solución fue concentrada al vacío y se mezcló con 20 mL de una solución 1:1 de dimetilformamida (Sigma-Aldrich) y agua destilada, seguido de diálisis exhaustiva (membrana UCPM de 2 kDa). El producto final fue

lioofilizado y almacenado a -20 °C hasta su uso posterior.

Propiedades mecánicas

[0163] Los módulos de compresión de los hidrogeles fueron medidos utilizando un sistema micromecánico Mach-1 (Biomomentum) conectado a un Controlador de Movimiento Universal (Newport). Se prepararon muestras de hidrogel de 100 μL (0,32 cm^2) en portaobjetos con cámara de 16 pocillos a 37 °C y se equilibraron en PBS durante la noche antes de ser retiradas de los portaobjetos con cámara. Las muestras cilíndricas fueron colocadas entre dos placas planas impermeables y mantenidas en 50 μL de PBS hasta el momento de la prueba para evitar la evaporación (menos de 5 minutos por muestra), utilizando una célula de carga de un solo eje (150 g, ATI Industrial Automation). La altura de las muestras (distancia entre las dos placas) fue medida utilizando una fuerza inicial de 0,01 N. Se aplicó compresión uniaxial no confinada al 10% de deformación basada en la altura del gel para compensar cualquier defecto superficial. El módulo de compresión de las muestras fue medido aplicando un 10% adicional de deformación en 5 pasos secuenciales de 2% de deformación. La pendiente de las curvas de tensión-deformación resultantes para cada muestra fue promediada para calcular el módulo de compresión.

Diferenciación de progenitores de células T en hidrogel: sistema transwell

[0164] Se recubrieron placas estándar de 24 pocillos con solución de DLL4-Fc y VCAM1-Fc a concentraciones de 15 $\mu\text{g/mL}$ y 2,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, en 300 μL de PBS por pocillo, lo que resultó en una concentración de recubrimiento de aproximadamente 24 ng/mm^2 de DLL4-Fc y 4 ng/mm^2 de VCAM1-Fc. Las placas recubiertas fueron incubadas bien durante la noche a 4 °C o durante 3 horas a 37 °C. Los hidrogeles con HSC derivadas de SC encapsuladas fueron colocados sobre transwells (Corning) con un tamaño de poro de 8 μm , y los transwells fueron insertados en las placas de pocillos recubiertas con DLL4-Fc y VCAM1-Fc o en placas de pocillos sin recubrimiento. Se añadió 1 mL de medio StemSpan SFEM II (STEMCELL Technologies) con suplemento de expansión de progenitores linfoides StemSpan al 10% (STEMCELL Technologies) que contiene SCF, IL7, TPO y Flt3L a cada pocillo.

Clasificación de HSC derivadas de sangre de cordón umbilical (SC) humana

[0165] La SC humana fue recolectada de donantes que otorgaron su consentimiento en hospitales, de acuerdo con las políticas del comité de ética en investigación institucional. Se utilizó centrifugación por

gradiente de densidad en medio de gradiente de densidad Lymphoprep (STEMCELL Technologies) para aislar células mononucleares. Las células CD34(+) fueron aisladas de la SC mediante el kit de selección positiva EasySep Human CD34(+) (STEMCELL Technologies) o columnas MACS (Miltenyi Biotec) a una pureza >90%. Las HSC CD34(+) aisladas fueron criopreservadas en suero bovino fetal (SBF) con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y almacenadas a -150 °C. Antes de su uso, las células fueron descongeladas en un baño de agua a 37 °C, y se añadió gota a gota un volumen 10x de Medio de Dulbecco Modificado de Iscove + insulina-transferrina bovina (IMDM+BIT) a 37 °C. A continuación, las células fueron centrifugadas durante 7 minutos a 300 g y lavadas con IMDM+BIT. Seguidamente se procedió a resuspender las células a la densidad celular deseada en el medio adecuado.

Generación de HSPC CD34(+) a partir de iPSC

[0166] Las HSPC CD34(+) fueron generadas según se describe previamente en Michaels et al., 2022. La línea celular de iPSC humana iPS11 (ALSTEM Cell Advancements, derivada de fibroblastos de prepucio humano) fue cultivada y mantenida en el medio completo mTeSR plus libre de suero (STEMCELL Technologies) sobre extracto de membrana basal Geltrex (Life Technologies, A1413302). El medio de crecimiento fue cambiado diariamente, y las células fueron mantenidas a 37 °C con 5% de CO₂. Las células fueron cultivadas hasta alcanzar el 90% de confluencia y disociadas en células individuales con la enzima de disociación celular TrypLE Express durante 3 minutos a 37 °C. Las células disociadas fueron recogidas, contadas y sedimentadas a 200 g durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 2 mL de medio T0 por pocillo y depositadas en placas AggreWell 400 de seis pocillos (STEMCELL Technologies, 34425) preparadas con Solución de Enjuague AggreWell (STEMCELL Technologies, 07010) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron sembradas a una densidad de $1,26 \times 10^6$ células por pocillo de una placa de seis pocillos y agregadas mediante centrifugación a 200 g durante 5 minutos. Durante el período de inducción de CD34(+), las células fueron cultivadas a 37 °C en un incubador hipóxico al 5% de CO₂ y 5% de O₂. La inducción de CD34(+) fue realizada durante 8 días. Las formulaciones de medio de inducción preferidas se enumeran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Formulación del medio utilizada para promover la inducción de endotelio hemogénico a partir de PSC en AggreWells

Componente	Concentración	Día				
		0	1	1.75	4	6
Medio StemPro34 + Suplemento (Invitrogen)	N/A	x	x	x	x	x
P/S	0,5x	x	x	x	x	x
1-tioglicerol [MTG] (Sigma)*	3 µl/mL	x	x	x	x	x
Ácido Ascórbico (Sigma)	50 µg/mL	x	x	x	x	x
Transferrina (Roche)	150 µg/mL	x	x	x	x	x
ROCKi	5 µM	x				
BMP4	10 ng/mL	x	x	x		
bFGF	5 ng/mL		x	x	x	x
SB-431542	6 µM			x		
CHIR-99021	3 µM			x		
VEGF	15 ng/mL				x	x
IL-6 (sol. stock diluida 1/10)	10 ng/mL				x	x
IL-11	5 ng/mL				x	x
EPO	2 U/mL					x
IGF-I	25 ng/mL					x
SCF	25 ng/mL					x

[0167] 192 horas después de iniciar la inducción de CD34(+), los agregados fueron recogidos y sedimentados mediante centrifugación a 200 g durante 5 minutos. Los agregados fueron disociados en 3 mL de TrypLE suplementado con desoxirribonucleasa I (Millipore Sigma, 260913-10MU) durante 10 a 15 minutos. Las células fueron pipeteadas hasta obtener una suspensión de células individuales, lavadas y contadas. Las células CD34(+) fueron enriquecidas utilizando el kit de selección positiva CD34(+) (Miltenyi Biotec, 130-046-702) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células enriquecidas en CD34(+) fueron criopreservadas con CryoStor CS10 (STEMCELL Technologies, 07930) para su uso en cultivos posteriores.

Cultivo de transición endotelio-hematopoyética (TEH)

[0168] Las células CD34(+) generadas anteriormente fueron utilizadas como material de partida para el cultivo de TEH. La solución de recubrimiento fue preparada utilizando PBS estéril combinado con DLL4-Fc (15 µg/mL; Sino Biological, 10171-H02H) y VCAM1-Fc (2,5 µg/mL; R&D Systems, 643-VM). Las placas de 96 pocillos tratadas para cultivo celular (Fisher Scientific, 12-556-008) fueron prereducubiertas con 50 µL de solución de recubrimiento durante la noche a 4 °C. La solución de recubrimiento fue aspirada y las placas fueron lavadas con PBS. Las células enriquecidas en CD34(+) fueron resuspendidas en medio de TEH (Tabla 2) a una concentración de 1×10^5 células/mL, salvo que se indique lo contrario. Las células (10.000/100 µL) fueron sembradas en cada pocillo de la placa de 96 pocillos, salvo que se indique lo contrario. Los cultivos fueron incubados a 37 °C con 5% de CO₂.

durante 7 días, y las células no adherentes fueron recolectadas mediante pipeteo suave. Las células recolectadas fueron encapsuladas en hidrogeles para la diferenciación de células T.

Tabla 2: Formulación del medio utilizada para promover la transición endotelio-hematopoyética

Componente	Concentración
Medio StemPro34 + Suplemento (Invitrogen)	N/A
Glutamax (Invitrogen)	1%
P/S	0.5X
1-tioglicerol [MTG] (Sigma)*	3 μ l/mL
Ácido Ascórbico (Sigma)	50 μ g/mL
Transferrina (Roche)	150 μ g/mL
bFGF	5 ng/mL
VEGF	5 ng/mL
IL-6 (sol. stock diluida 1/10)	10 ng/mL
IL-11	5 ng/mL
TPO	30 ng/mL
IGF-I	25 ng/mL
SCF	50 ng/mL
IL-3	10 ng/mL
ROCKi	10uM
BMP4	10 ng/mL
FLT3L	10 ng/mL

Encapsulación de HSPC CD34(+) clasificadas y cultivo *in vitro*

[0169] Las HSPC CD34(+) fueron encapsuladas en hidrogeles a una densidad celular de 0,5 millones de células por 1mL de hidrogel. Todos los polímeros utilizados para la encapsulación celular fueron disueltos en el medio StemSpan SFEM II (STEMCELL Technologies) con suplemento de expansión de progenitores linfoides StemSpan (STEMCELL Technologies) que contiene SCF, IL7, TPO y Flt3L. Soluciones de polímeros de 15 a 30 μ L que contenían 0,75% de HA-ProG y 100 μ g de DLL4-Fc por 1 mL de hidrogel y/o HA-DLL4-VCAM1 (a las concentraciones descritas en los ejemplos operativos) y diferentes concentraciones de gelatina-metiltetrazina fueron vertidas en moldes cilíndricos de polidimetilsiloxano (PDMS). Tras 15 minutos, los hidrogeles formados mediante reticulación metiltetrazina-norborneno fueron colocados en placas estándar de fondo plano de 48 o 96 pocillos. El medio fue cambiado cada 3 a 4 días según la **Figura 12A** para HSPC derivadas de SC y según la **Figura 15A** para HSPC derivadas de iPSC. En algunas realizaciones, el suplemento de expansión de progenitores linfoides es reemplazado por el suplemento de maduración de progenitores de células T StemSpan (STEMCELL Technologies) que contiene IL7 y Flt3L pero no SCF ni TPO (Tabatabaei-Zavareh et al., 2017). Los hidrogeles fueron disueltos en los momentos indicados con solución enzimática. Las células fueron recuperadas posteriormente, lavadas con HF y preparadas para análisis posteriores.

Verificación de la capacidad de HSPC derivadas de SC y PSC para desarrollarse en progenitores de células T mediante el sistema 2D DLL4+VCAM1

[0170] Debido a la variabilidad lote a lote en su capacidad para producir células T, se realizó la verificación del potencial de las células para diferenciarse en células T (**Figura 8:** derivadas de SC; **Figura 13c:** derivadas de PSC). El sistema 2D funcionalizado con DLL4 y VCAM1 divulgado previamente por los inventores en WO 2022/241558 A1 fue utilizado para este fin de verificación. DLL4-Fc (Sino Biological) fue diluido en PBS a 15 µg/mL junto con VCAM1-Fc (R&D Systems) a 2,5 µg/mL. Las placas estándar de 96 pocillos de fondo plano fueron recubiertas con 50 µL de solución proteica preparada por pocillo, lo que resultó en una concentración de recubrimiento de 24 ng/mm² de DLL4-Fc y 4 ng/mm² de VCAM1-Fc. Las placas de pocillos recubiertas fueron incubadas bien durante la noche a 4 °C o durante 3 horas a 37 °C.

[0171] Tras la incubación, cada pocillo recubierto fue lavado dos veces con 100 µL de PBS y sembrado con 10.000 HSPC CD34(+) derivadas de SC o PSC resuspendidas en 100 µL de medio StemSpan SFEM II (STEMCELL Technologies) con suplemento de expansión de progenitores linfoides StemSpan al 10% (STEMCELL Technologies) que contiene SCF, IL7, TPO y Flt3L. El medio fue cambiado cada 3 a 4 días según la recomendación del fabricante. En el día 14, las células fueron recolectadas y lavadas con PBS con bloqueo de Fc y teñidas con el colorante de viabilidad Zombie UV (BioLegend) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron teñidas con anticuerpos contra los marcadores de células Pro-T CD5 y CD7. Los anticuerpos y diluciones utilizados se enumeran en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Anticuerpos utilizados para verificar la capacidad de HSPC derivadas de SC y PSC para desarrollarse en progenitores de células T

Anticuerpo	Proveedor	Clon	Dilución
CD5 PE-Cy7	eBioscience/ThermoFisher	UCHT2	300
CD7 BB515	BD Biosciences	M-T701	300
Zombie UV	BioLegend	n/a	500
Bloqueo de Fc	BD Biosciences	n/a	100

Imágenes celulares

[0172] Para la obtención de imágenes celulares con faloidina/4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), el medio fue retirado del cultivo celular, y los hidrogeles con células encapsuladas fueron lavados con PBS tres veces con intervalos de 5 minutos entre lavados. Se añadió paraformaldehído al 4% en solución

salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) a los hidrogeles durante 45 minutos, seguido de tres lavados con DPBS con intervalos de 5 minutos entre lavados. A continuación se procedió a la permeabilización de las células en el interior de los hidrogeles con Triton X-100 al 0,1% en DPBS durante 20 minutos. La actina filamentosa fue teñida con Alexa Fluor 488 conjugado a faloidina durante 45 minutos a 37 °C y lavada tres veces con DPBS. La tinción de actina fue seguida de la tinción de núcleos celulares con DAPI (Invitrogen NucBlue) durante la noche a 4 °C. Tras la tinción de núcleos, los hidrogeles fueron lavados tres veces con DPBS. Las imágenes fluorescentes fueron obtenidas en un microscopio Nikon (Nikon AXR).

Citometría de flujo y anticuerpos

[0173] La tinción de marcadores de superficie para los experimentos descritos fue realizada con anticuerpos de ratón anti-humano conjugados (BD Biosciences). Todas las muestras fueron analizadas en un citómetro CytoFLEX LX (Beckman Coulter). En el día 14 de cultivo, las células obtenidas de los hidrogeles fueron lavadas múltiples veces con Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS; Thermo Fisher Scientific) suplementada con suero bovino fetal (SBF) al 2% (en conjunto, HBSS + SBF = tampón HF) y teñidas a una dilución 1:300 con anticuerpos contra CD33, CD56, CD34, CD7, CD5 y CD1a durante 20 minutos en hielo. Las células fueron lavadas dos veces con HF, y las células muertas fueron excluidas utilizando 7-AAD a una dilución 1:1000. Alternativamente, las células muertas fueron excluidas utilizando el colorante de viabilidad Zombie UV (BioLegend) a una dilución 1:500 en PBS durante 15 minutos, seguido de la tinción con anticuerpos. Los anticuerpos y diluciones utilizados se enumeran en la **Tabla 4**.

Table 4: Anticuerpos utilizados para determinar el fenotipo de células diferenciadas de HSPC en hidrogeles

Anticuerpo	Proveedor	Clon	Dilución
CD7 APC	BD Biosciences	M-T701	300
CD34 PE	BD Biosciences	581	300
CD1a BV421	BD Biosciences	HI149	300
CD56 BB515	BD Biosciences	B159	300
CD5 PE-Cy7	eBioscience/ThermoFisher	UCHT2	300
CD33 AF700	BD Biosciences	WM53	300
7-aminoactinomicina D (7-AAD)	ThermoFisher	n/a	1000

[0174] Las células evaluadas por su capacidad para generar células T maduras fueron recolectadas en el día 35 y lavadas con PBS con bloqueo de Fc y teñidas con el colorante de viabilidad Zombie UV (BioLegend) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron teñidas con anticuerpos

contra CD4, CD8, CD3 y TCR $\alpha\beta$. Las células fueron lavadas una vez y resuspendidas en tampón HF para su análisis. Los anticuerpos y diluciones utilizados se enumeran en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Anticuerpos utilizados para evaluar el fenotipo y la cantidad de células T maduras generadas a partir de HSPC en hidrogeles

Anticuerpo	Proveedor	Clon	Dilución
CD3 APC-Cy7	BioLegend	UCHT1	200
CD4 BB515	BD Biosciences	SK3	200
CD8b PE-Cy7	Invitrogen	SID8BEE	150
TCR $\alpha\beta$ BV711 BB515	BioLegend	IP26	200
Zombie UV	BioLegend	n/a	500
Bloqueo de Fc	BD Biosciences	n/a	100

[0175] Los datos de citometría de flujo fueron analizados y procesados mediante el software CytExpert (Beckman Coulter) y FlowJo, y posteriormente analizados en GraphPad Prism.

Producción de citocinas

[0176] Para evaluar la producción de IL-2, TNF- α e IFN- γ , las células T fueron recolectadas 7 días después del inicio de la expansión y fueron sometidas a estimulación inespecífica. Las células fueron sembradas a razón de 50.000 a 100.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos en 200 μ L de medio IMDM+BIT a 37 °C que contenía 25 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e ionomicina a 1 μ g/mL (Sigma). Tras 1 hora, se añadieron 3 μ g/mL de brefeldina A y las células fueron cultivadas durante 5 horas adicionales. Las células fueron fijadas y teñidas para citometría de flujo según se describe anteriormente.

Análisis estadístico

[0177] En todas las leyendas de figuras, n representa el número de réplicas biológicas independientes, y los datos se representan como media $\pm$ desviación estándar (DE) o media $\pm$ error estándar de la media (EEM) según se indique. El análisis estadístico fue realizado mediante el software GraphPad Prism, y los valores de p fueron calculados mediante ANOVA ordinario de una vía o de dos vías con pruebas de comparaciones múltiples de Tukey o Sidak para determinar la significación estadística. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 y **** p < 0,0001 se consideraron significativos.

EJEMPLO 1: Síntesis de un hidrogel de ácido hialurónico-norborneno y polietilenglicol-tetrazina funcionalizado con Proteína G y ligando Notch para la generación de células Pro-T y Pre-T derivadas de HSPC

[0178] La **Figura 1** es una representación esquemática de una composición de hidrogel utilizada para imitar el microentorno tímico para la producción de células T. La composición de la presente invención comprende un hidrogel libre de suero y libre de células nodriza basado en ácido hialurónico (HA) funcionalizado con componentes tímicos, tales como el ligando DLL4, para crear un nicho tímico 3D.

[0179] La química clic metiltetrazina-norborneno se utiliza para controlar la reticulación del hidrogel con fines de encapsulación celular debido a su corto tiempo de reacción, irreversibilidad, alta especificidad y la ventaja de no requerir un catalizador (Hansell et al., 2011). Además, esta reacción ha sido utilizada previamente en hidrogeles con aplicaciones en cultivos celulares 3D, ya que la reacción tetrazina-norborneno no demuestra efectos sobre la viabilidad celular y es inerte a las proteínas (Delplace et al., 2020; Gopinathan & Noh, 2018; Koshy et al., 2016).

[0180] El hidrogel es funcionalizado con uno o más ligandos Notch. La interacción de las HSC con el ligando Notch inmovilizado es esencial para su compromiso con el linaje de células T; por lo tanto, DLL4, el ligando Notch más potente, es conjugado a los hidrogeles de HA (Rutz et al., 2005). Estudios previos han informado que la inmovilización de DLL4-Fc en HA funcionalizado con Proteína G (ProG) facilita la diferenciación de colangiocitos dependiente de la señalización Notch (Rizwan et al., 2022). El uso de ProG para la inmovilización del ligando Notch hace que el sistema sea más ajustable y permite la inmovilización simultánea de diversas moléculas de señalización. Por lo tanto, ProG es conjugado primero al HA, seguido de la inmovilización de la proteína de fusión DLL4-Fc. Además, este enfoque elimina posibles cambios conformacionales de DLL4 durante la síntesis.

[0181] En primer lugar, el HA es modificado con 5-norborneno-2-metilamina, que puede caracterizarse mediante RMN de ¹H (**Figura 2**), seguido de una reacción con Proteína G (ProG) modificada con metiltetrazina mediante el éster metiltetrazina-sulfo-NHS (**Figura 3a-b**). La modificación de ProG con metiltetrazina [es/puede ser] verificada mediante espectrometría de masas antes de la inmovilización en HA-norborneno, y puede oscilar entre 1 y 4 fracciones de tetrazina por mol de ProG (**Figura 4a**). La cantidad de ProG inmovilizada por hidrogel puede medirse utilizando, por ejemplo, cromatografía HPLC de aminoácidos, y puede comprender 24 µg de ProG por 1 mg de HA. Este HA funcionalizado con ProG (HA-ProG) es modificado con DLL4-Fc humano recombinante a través de la afinidad de ProG por las proteínas que contienen Fc (**Figura 3b**). El hidrogel es reticulado utilizando gelatina modificada con éster metiltetrazina-sulfo-NHS [y/o] PEG-amina de 4 brazos modificado con ácido metiltetrazina (**Figura**

3c). El grado de modificación con metiltetrazina puede confirmarse mediante [espectroscopía UV-Vis o] RMN de ^1H (**Figuras 4b, 5b**).

[0182] Cuando las HSC CD34(+) derivadas de SC son encapsuladas a 500.000 células/mL en HA-ProG, HA-DLL4 o HA-ProG-DLL4 como suspensiones de células individuales, forman esferoides en el día 7 del cultivo celular (Figura 6). Todas las formulaciones de hidrogel probadas dan lugar a la formación de esferoides. Los esferoides encapsulados resultantes no son huecos, imitando los lóbulos del timo y resultando en interacciones célula-célula maximizadas. Es posible que los esferoides carezcan de interacción con el hidrogel.

[0183] De manera similar al desarrollo de células T en el timo nativo y sobre sustratos 2D funcionalizados con DLL4 y VCAM1 divulgados previamente por los inventores en WO 2022/241558 A1, las HSC encapsuladas en el hidrogel HA-ProG-DLL4 se diferencian hasta convertirse en células T progenitoras (Pro-T) específicas de linaje CD7(+)CD5(+) y células T precursoras (Pre-T) comprometidas con el linaje CD7(+)CD5(+)CD1a(+) (**Figura 7a-d**). La Figura 7b proporciona un esquema general del cronograma y los medios utilizados para promover la diferenciación de HSC encapsuladas en los hidrogeles. La Figura 7c muestra un análisis representativo por citometría de flujo de células Pro-T y Pre-T generadas a partir de HSC encapsuladas en el hidrogel HA-ProG-DLL4 durante 14 días con suplemento de expansión de progenitores linfoides que contiene SCF, IL7, TPO y Flt3L. La Figura 7d muestra que las células Pro-T son generadas únicamente en el hidrogel HA-ProG-DLL4 y no en los hidrogeles HA-ProG o HA-DLL4.

[0184] Debido a la posible variabilidad lote a lote en la capacidad de las HSC para producir células T, la verificación del potencial de las HSC para diferenciarse en células Pro-T puede realizarse utilizando los sustratos 2D funcionalizados con DLL4 y VCAM1 divulgados previamente por los inventores en WO 2022/241558 A1 (**Figura 8**). La Figura 8a muestra un control negativo en el que las HSC derivadas de SC son encapsuladas en el hidrogel HA-ProG en ausencia de DLL4 durante 2 semanas. La Figura 8b muestra un control positivo en el que las HSC derivadas de SC son cultivadas sobre un sustrato 2D funcionalizado con DLL4 y VCAM1 durante 2 semanas. La Figura 8c representa las HSC derivadas de SC cultivadas en el hidrogel HA-ProG-DLL4 durante 2 semanas.

[0185] Notablemente, como se muestra en la Figura 8, las HSC derivadas de SC cultivadas en el hidrogel HA-ProG-DLL4 (Figura 8c) generan mayores proporciones de células Pro-T CD7(+)CD5(+) y células Pre-T CD7(+)CD5(+)CD1a(+) que las células cultivadas sobre el sustrato 2D funcionalizado con DLL4 y VCAM1 (Figura 8b), lo que demuestra que el hidrogel 3D promueve una generación de células Pro-T y Pre-T superior a la del sustrato 2D funcionalizado con DLL4 y VCAM1 divulgado previamente

por los inventores en WO 2022/241558 A1. Además, las HSC derivadas de SC cultivadas en el hidrogel HA-ProG-DLL4 (Figura 8c) generan menos células mieloides CD33(+) que cuando se cultivan sobre el sustrato 2D funcionalizado con DLL4 y VCAM1 (Figura 8b).

[0186] Para determinar la cantidad preferida de DLL4 que debe añadirse al HA-ProG para el desarrollo de células T derivadas de HSPC, pueden evaluarse formulaciones con concentraciones variables de DLL4-Fc. La Figura 7e muestra que el aumento de la concentración de DLL4-Fc de 50 a 100 µg por mL de HA-ProG incrementa el rendimiento de células Pro-T generadas a partir de HSC CD34(+) derivadas de SC encapsuladas en los hidrogeles. Sin embargo, el aumento adicional de la concentración de DLL4-Fc a 200 µg/mL no incrementa adicionalmente el rendimiento de células Pro-T. Por lo tanto, en una realización preferida y en los ejemplos operativos divulgados en el presente documento, la composición de hidrogel contiene DLL4-Fc a una concentración de 100 µg/mL.

EJEMPLO 2: La gelatina potencia el compromiso de células T de HSC CD34(+) derivadas de SC

[0187] Las propiedades fisicoquímicas de la gelatina son similares a las del colágeno; por lo tanto, los hidrogeles basados en gelatina pueden imitar eficazmente la MEC natural rica en colágeno. En consecuencia, se ha demostrado que los hidrogeles de gelatina potencian la viabilidad y la proliferación celular, incluyendo las HSC CD34(+) murinas (Suraiya et al., 2020). Algunos estudios han demostrado la capacidad de la gelatina para influir en la diferenciación de células madre al proporcionar una MEC similar a aquella en la que las células se desarrollan de forma natural (Yao et al., 2021; Y. Lee et al., 2017). En contraste con estudios previos que implican células murinas y/o sistemas no basados en hidrogel (Lins, 2022), los inventores examinaron si la adición de gelatina al hidrogel HA-ProG-DLL4 aumenta la diferenciación de células T humanas *in vitro* al imitar la MEC típica rica en colágeno.

[0188] La gelatina es modificada con grupos metiltetrazina (Tz) y reticulada con HA-norborneno mediante la reacción de la gelatina con el éster metiltetrazina-sulfo-NHS (**Figura 9a**). El grado de modificación puede confirmarse mediante espectroscopía UV-Vis con absorbancia de tetrazina a 524 nm. En una realización preferida, el grado de modificación de la gelatina con Tz es de 0,05 µmol de tetrazina por 1 mg de gelatina (**Figura 4b**).

[0189] Para determinar la concentración preferida de gelatina en la composición de hidrogel para el desarrollo de células T derivadas de HSPC, pueden sintetizarse y evaluarse formulaciones de HA-ProG-DLL4 reticuladas con cantidades variables de gelatina-metiltetrazina (G). La Figura 9b muestra que el aumento del contenido de gelatina en los hidrogeles HA-ProG-DLL4-G hasta el 5% incrementa significativamente el rendimiento de células Pro-T y/o Pre-T generadas a partir de HSC CD34(+) y/o

derivadas de SC encapsuladas en los hidrogeles tras 14 días de cultivo. El aumento adicional del contenido de gelatina del 5 al 10% no afecta significativamente la diferenciación, pero resulta en una solución más viscosa con un tiempo de reticulación más corto.

[0190] Estudios previos han demostrado que la señalización Notch puede verse influenciada por la rigidez de la MEC (Kretschmer et al., 2023; Safaee et al., 2017). Debido al papel de la señalización Notch en el desarrollo de células T, los inventores determinaron si las propiedades mecánicas del hidrogel HA-ProG-DLL4-G se correlacionan con la diferenciación de células T comparando los módulos de Young de formulaciones de hidrogel con niveles variables de gelatina-metiltetrazina. La Figura 9c muestra que el módulo de Young de los hidrogeles que comprenden 2% de gelatina no difiere significativamente del módulo de Young de los hidrogeles reticulados con PEG (0% de gelatina). El aumento de la concentración de gelatina por encima del 2%, por ejemplo al 5% o al 10%, genera hidrogeles más rígidos.

[0191] Cabe destacar que la formulación de hidrogel que comprende 5% de gelatina, la concentración óptima para la diferenciación de células Pro-T y Pre-T a partir de HSC derivadas de SC encapsuladas en los hidrogeles, tiene un módulo de Young de ~3,1 kPa (Figura 9c), lo que corresponde a un módulo de Young de 3 kPa de regiones específicas del timo (Asnaghi et al., 2021). Una concentración de gelatina del 5% puede, por lo tanto, mejorar la diferenciación de células T al aumentar la rigidez de la MEC a niveles tímicos in vivo comparables y/o al aumentar la cantidad de moléculas de adhesión que interactúan con las células en comparación con formulaciones con menores concentraciones de gelatina.

[0192] Por lo tanto, en una realización preferida y en los ejemplos operativos posteriores divulgados en el presente documento, la composición de hidrogel HA-ProG-DLL4-G contiene gelatina-metiltetrazina a una concentración del 5%.

EJEMPLO 3: VCAM1 no influye en el rendimiento de células Pro-T y Pre-T generadas a partir de HSC CD34(+) derivadas de SC en hidrogeles de ingeniería

[0193] VCAM1 actúa sinérgicamente con DLL4 para potenciar la activación de la vía Notch y mejorar la diferenciación de células T en plataformas de diferenciación 2D (Edgar et al., 2022; Michaels et al., 2022; Shukla et al., 2017). La Figura 9d-e muestra las proporciones y rendimientos de los tipos celulares generados a partir de HSC CD34(+) derivadas de SC encapsuladas durante 14 días en los hidrogeles de ingeniería en presencia o ausencia de VCAM1-Fc inmovilizado, con o sin gelatina. Las cuatro formulaciones de hidrogel incluyen: HA-ProG-DLL4, HA-ProG-DLL4+VCAM1, HA-ProG-DLL4+G y HA-

ProG-DLL4+G+VCAM1. La citometría de flujo puede utilizarse para cuantificar las poblaciones celulares generadas después de 14 días en las cuatro formulaciones de hidrogel.

[0194] La Figura 9d muestra que las HSC encapsuladas en cada una de las cuatro formulaciones se diferencian en ETP, células Pro-T, células Pre-T y células mieloides. Sin embargo, ninguna de las formulaciones produce células linfoides innatas CD56(+) (Figura 8c). Las cuatro formulaciones no varían significativamente en su capacidad para generar ETP o células mieloides CD33(+), y la mayoría de las células generadas en cada formulación son células Pro-T o Pre-T (que comprenden colectivamente al menos el 65% de las células generadas por cada formulación). Las formulaciones que contienen gelatina aumentan significativamente la proporción de células generadas que son células Pre-T (Figura 9d) ($p=0,0077$ para HA-ProG-DLL4 vs. HA-ProG-DLL4+G, $p=0,0133$ para HA-ProG-DLL4 vs. HA-ProG-DLL4+G+VCAM1, $p=0,0146$ para HA-ProG-DLL4+VCAM1 vs. HA-ProG-DLL4+G y $p=0,0245$ para HA-ProG-DLL4+VCAM1 vs. HA-ProG-DLL4+G+VCAM1), pero no afectan significativamente el rendimiento combinado de células Pro-T y Pre-T en el interior de los hidrogeles (Figura 9e), lo que indica que la gelatina facilita un compromiso más rápido de las HSC encapsuladas con el linaje de células T.

[0195] Por el contrario, a pesar de los efectos sinérgicos de DLL4 y VCAM1 sobre la activación de Notch y la diferenciación de células T en las plataformas de diferenciación 2D existentes, la adición de VCAM1 a las formulaciones de hidrogel no afecta significativamente la proporción de células generadas que son células Pre-T, ni el rendimiento combinado de células Pro-T y Pre-T (Figura 9d-e). Por lo tanto, en una realización preferida y en los ejemplos operativos divulgados en el presente documento, VCAM1-Fc no se incluye en la composición de hidrogel HA-ProG-DLL4-G al encapsular HSC CD34(+) derivadas de SC.

EJEMPLO 4: Las células que migran fuera de los hidrogeles se desarrollan en células Pro-T en presencia de ligandos que potencian la señalización Notch

[0196] Las células derivadas de HSC encapsuladas en los hidrogeles de ingeniería comienzan a migrar fuera de los hidrogeles en el día 7 de cultivo. La Figura 10a es una representación esquemática de un experimento en el que los hidrogeles con HSC encapsuladas son colocados sobre transwells con un tamaño de poro de 8 μm que se insertan en placas de pocillos sin recubrimiento o recubiertas con DLL4 y VCAM1. Esto permite que las células que migran fuera del hidrogel y atraviesan la membrana del transwell continúen siendo cultivadas en superficies 2D de placas de pocillos en presencia o ausencia de DLL4 y VCAM1.

[0197] La Figura 10b muestra un análisis representativo por citometría de flujo de la expresión de CD5 y

CD7 en el día 14 de cultivo para las células que permanecen en el interior del hidrogel, las células que migran fuera del hidrogel hacia pocillos recubiertos con DLL4 y VCAM1 y las células que migran hacia pocillos sin recubrimiento. La Figura 10c muestra la proporción de células en el día 14 de cultivo que son células Pro-T CD5(+)CD7(+), comparando las células que permanecen en el interior del hidrogel, las células que migran fuera del hidrogel hacia pocillos recubiertos con DLL4 y VCAM1 y las células que migran fuera del hidrogel hacia pocillos sin recubrimiento.

[0198] Como se muestra en la Figura 10c, la proporción de células en el día 14 de cultivo que son células Pro-T CD5(+)CD7(+) es significativamente menor entre las células que migran hacia pocillos sin recubrimiento en comparación con las células que permanecen en el hidrogel y en comparación con las células que migran hacia pocillos recubiertos con DLL4 y VCAM1. Por el contrario, las células que migran hacia pocillos recubiertos con DLL4 y VCAM1 generan células Pro-T en la misma medida que las células que permanecen en el hidrogel.

[0199] Este experimento confirma, por lo tanto, que las HSC encapsuladas generan células que tienen el potencial de continuar diferenciándose hacia el linaje de células T tras migrar fuera del hidrogel en presencia de ligandos que potencian la señalización Notch. Este hallazgo respalda la aplicación in vivo y/o clínica del hidrogel de ingeniería, por ejemplo, en terapias que implican la administración mediada por hidrogel de células T y/o sus progenitoras hacia sitios diana en el interior de un paciente.

EJEMPLO 5: Los hidrogeles de HA-gelatina funcionalizados con componentes tímicos respaldan las etapas tardías del desarrollo de células T

[0200] Los ejemplos operativos divulgados anteriormente muestran que la encapsulación de HSC derivadas de SC en hidrogeles HA-ProG-DLL4-G promueve y/o potencia la diferenciación en células Pro-T y Pre-T tras 2 semanas de cultivo con un suplemento de expansión de progenitores linfoides que contiene SCF, IL7, TPO y Flt3L. Para promover la diferenciación hacia etapas más maduras del desarrollo de células T (células Pre-T), las HSC encapsuladas pueden cultivarse durante un período más prolongado, en el que el suplemento de expansión de progenitores linfoides es reemplazado tras 2 semanas por un suplemento de maduración de progenitores de células T que contiene IL7 y Flt3L pero no SCF ni TPO.

[0201] La Figura 11a muestra las frecuencias de células Pro-T y Pre-T generadas a partir de HSC encapsuladas en hidrogel HA-ProG-DLL4-G durante 4 semanas, en las que el suplemento de expansión de progenitores linfoides es reemplazado tras 2 semanas por un suplemento de maduración de progenitores de células T. Las poblaciones celulares pueden cuantificarse mediante citometría de flujo.

Tras 4 semanas de cultivo en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G, las células Pre-T comprenden más del 90% de las células generadas.

[0202] La Figura 11c muestra las frecuencias de células Pro-T y Pre-T generadas a partir de HSC encapsuladas en hidrogel HA-ProG-DLL4-G durante 5 semanas, en las que el suplemento de expansión de progenitores linfoides es reemplazado tras 3 semanas por un suplemento de maduración de progenitores de células T. Este retraso de 1 semana en el cambio del suplemento de expansión al suplemento de maduración resulta en un retraso correspondiente de 1 semana en la generación de frecuencias similares (~90%) de células Pre-T. Estos hallazgos indican que las células Pro-T y Pre-T se generan a frecuencias similares en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G hasta que el suplemento de expansión de progenitores linfoides es reemplazado por un suplemento de maduración de progenitores de células T, momento en el cual las células se convierten predominantemente en células Pre-T.

[0203] Los ejemplos operativos descritos anteriormente establecen que VCAM1 no afecta el desarrollo de células T durante las primeras 2 semanas de cultivo en hidrogel HA-ProG-DLL4-G con el suplemento de expansión de progenitores linfoides. Las Figuras 11b y 11d muestran que la adición de VCAM1-Fc al hidrogel HA-ProG-DLL4-G tampoco tiene efecto sobre la generación de células Pre-T o Pro-T en momentos de tiempo posteriores (tras 4 y 5 semanas de cultivo, respectivamente) tras la sustitución del suplemento de expansión por el suplemento de maduración (a las 2 y 3 semanas de cultivo, respectivamente).

[0204] Por lo tanto, en una realización preferida, VCAM1-Fc no se incluye en la composición de hidrogel HA-ProG-DLL4-G, y el suplemento de expansión de progenitores linfoides es reemplazado por el suplemento de maduración de progenitores de células T tras 2 semanas de cultivo (Figura 12a).

EJEMPLO 6: Las células T funcionales se desarrollan a partir de HSC CD34(+) derivadas de SC en el hidrogel funcionalizado HA-ProG-DLL4-G

[0205] La Figura 12a es una representación esquemática del cronograma y las condiciones de cultivo utilizadas para generar células T maduras y funcionales a partir de HSC derivadas de SC encapsuladas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G. En algunas realizaciones que utilizan HSC derivadas de SC, las células encapsuladas son cultivadas con suplemento de expansión de progenitores linfoides que contiene SCF, IL7, TPO y Flt3L durante 2 semanas, seguido del suplemento de maduración de progenitores de células T que contiene IL7 y Flt3L pero no SCF ni TPO durante 3 semanas. En algunas realizaciones, las células T CD4(+)CD8(+) DP son generadas tras 5 semanas de cultivo y luego transferidas a placas recubiertas con DLL4+VCAM1 y cultivadas durante 2 semanas en un medio

suplementado con un activador CD3/CD28 e IL-15 para generar células T CD3(+)TCRαβ(+) y CD8(+) SP maduras y funcionales.

[0206] La Figura 12b muestra las frecuencias de ETP, células Pro-T, células Pre-T y células mieloides generadas durante las primeras 4 semanas de cultivo. En la semana 3, se produce un declive en las poblaciones tanto mieloide (~5% de las células generadas) como ETP (~4% de las células generadas). En la semana 4, las poblaciones mieloide y ETP son completamente reemplazadas por células Pro-T y predominantemente células Pre-T (más del 90% de las células generadas). Estos resultados confirman que el hidrogel HA-ProG-DLL4-G respalda las etapas tardías del desarrollo de células T.

[0207] Como se ilustra en la Figura 7a, las etapas más tardías del desarrollo de células T se caracterizan por la expresión inicial de CD4 (células T ISP), seguida de la coexpresión de CD4 y CD8 (células T DP) y, finalmente, la expresión única de CD4 o CD8 (células T SP). Las células T DP y SP también expresan CD3 y TCRαβ en diferentes grados. Las células T SP maduras son capaces de secretar citocinas.

[0208] La Figura 12c muestra un análisis representativo por citometría de flujo de la expresión de CD4, CD8b, CD3 y TCRαβ en células generadas a partir de HSC derivadas de SC encapsuladas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G tras 5 semanas de cultivo. La Figura 12d muestra las frecuencias de células T ISP, células T DP y células T CD3(+)TCRαβ(+) generadas tras 5 semanas de cultivo. En la semana 5, las células generadas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G comprenden ~23 a 43% de células T ISP, ~29-52% de células T DP y ~2,5 a 5,5% de células T CD3(+)TCRαβ(+).

[0209] En la semana 5, la mayoría de las células CD3(+)TCRαβ(+) generadas son células T DP, que pueden diferenciarse adicionalmente en células T SP. Estudios previos han demostrado que la generación de células T SP maduras en una plataforma 3D requiere un cultivo a largo plazo, por ejemplo, utilizando organoides tímicos artificiales para cultivar HSC durante 12 semanas (Seet et al., 2017). Debido a las interacciones célula-célula en el interior de los esferoides celulares generados en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G, los inventores plantearon la hipótesis de que una duración de cultivo similar promovería la selección y/o diferenciación hacia células T CD8(+) SP. En consecuencia, la Figura 12e-f muestra un análisis representativo por citometría de flujo de la expresión de CD4, CD8, CD3 y TCRαβ y las frecuencias de células CD8(+) SP y células T CD3(+)TCRαβ(+) generadas a partir de HSC derivadas de SC tras 12 semanas de cultivo en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G. En la semana 12, las células generadas comprenden ~9 a 26% de células T CD8(+) SP y ~3,75 a 8,75% de células T CD3(+)TCRαβ(+) según el donante. En la semana 12, las células generadas no expresan CD4.

[0210] Ciertos sistemas libres de células nodriza utilizan anticuerpos tales como anti-CD3 y anti-CD28 para simular la selección positiva y producir células T SP. En contraste con estudios previos que requieren cultivo a largo plazo (p. ej., 12 semanas), los inventores demuestran que la diferenciación hacia células T CD8(+) SP maduras puede acelerarse y/o potenciarse transfiriendo las células T DP generadas tras 5 semanas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G a placas recubiertas con DLL4+VCAM1 y cultivando durante 1 o más semanas en un medio suplementado con un activador CD3/CD28 e IL-15. En la semana 5, las células T DP pueden extraerse del hidrogel HA-ProG-DLL4-G utilizando una solución enzimática que contiene 25 mg/mL de hialuronidasa y 50 mg/mL de colagenasa en PBS 1x. Las células T DP extraídas pueden luego ser transferidas a placas recubiertas con DLL4+VCAM1 y cultivadas en un medio suplementado con 12,5 μ L/mL de activador ImmunoCult CD3/CD28 y 10 ng/mL de IL-15 durante 2 semanas adicionales.

[0211] La Figura 12g-h muestra un análisis representativo por citometría de flujo de la expresión de CD4, CD8, CD3 y TCR $\alpha\beta$ y las frecuencias de células T CD4(+)CD8(+) DP, CD4(+) SP, CD8(+) SP y CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+) generadas a partir de células T DP extraídas del hidrogel HA-ProG-DLL4-G en la semana 5 y luego cultivadas durante 2 semanas en placas recubiertas con DLL4+VCAM1 en presencia de un activador CD3/CD28 e IL-15. Estos resultados confirman que este método genera exitosamente células T CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+) y CD8(+) SP a partir de HSC derivadas de SC encapsuladas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G.

[0212] Para evaluar la funcionalidad de las células T maduras, las células T pueden ser estimuladas para producir citocinas con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e ionomicina. La brefeldina A puede utilizarse para acumular las citocinas producidas en el interior de las células (previniendo su secreción), permitiendo así el análisis por citometría de flujo. La Figura 12i-j muestra un análisis representativo por citometría de flujo de la producción de citocinas en células que fueron cultivadas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G durante 5 semanas, estimuladas en placas recubiertas con DLL4+VCAM1 con activador CD3/CD28 e IL-15 durante 2 semanas y luego estimuladas con PMA e ionomicina durante 6 horas, con brefeldina A añadida durante las últimas 5 horas. Como se muestra en la Figura 12i-j, las células estimuladas derivadas del método son capaces de secretar IL-2, TNF- α e IFN- γ , confirmando la funcionalidad de las células T maduras generadas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G.

[0213] Estos hallazgos demuestran que el hidrogel funcionalizado HA-ProG-DLL4-G permite la producción libre de suero y libre de células nodriza de células T maduras y funcionales a partir de HSC derivadas de SC.

EJEMPLO 7: Las células T maduras y funcionales se desarrollan a partir de HSPC derivadas de PSC en el hidrogel funcionalizado HA-ProG-DLL4-PEG

[0214] En el presente documento, los inventores demuestran una novedosa plataforma 3D libre de células nodriza y libre de suero para la generación de células T funcionales a partir de células derivadas de PSC utilizando un hidrogel funcionalizado HA-ProG-DLL4-PEG.

[0215] En una realización preferida, las HSPC derivadas de PSC son generadas primero en una etapa de inducción sanguínea utilizando el protocolo previamente descrito por los inventores (Michaels et al., 2022). En resumen, las células iPS11 humanas son sometidas a una etapa de inducción hemogénica o sanguínea, en la que las células son agregadas en placas AggreWell y cultivadas en condiciones de inducción de CD34 escalonadas durante 8 días (**Figura 13a, Tabla 1**) a 37 °C en un incubador hipóxico al 5% de CO₂ y 5% de O₂. La **Figura 13b** muestra un análisis representativo por citometría de flujo de las células generadas en AggreWells tras 8 días. A continuación, las células son disgregadas enzimática y/o mecánicamente hasta obtener una suspensión de células individuales, y las células CD34(+) son enriquecidas mediante, por ejemplo, una columna de aislamiento celular magnético. Las células enriquecidas en CD34(+), que comprenden células endoteliales hematopoyéticas (HEC), son sometidas entonces a una etapa de transición endotelio-hematopoyética (TEH), en la que las HEC son transferidas a placas recubiertas con DLL4-Fc/VCAM1-Fc en condiciones de TEH (Tabla 2) durante 7 días a 37 °C con 5% de CO₂.

[0216] Tras la TEH, las HSPC brotadas son recolectadas y encapsuladas en el hidrogel funcionalizado. Las HSPC recolectadas pueden validarse para su capacidad de generar células T utilizando el protocolo 2D previamente publicado por los inventores mediante placas recubiertas con DLL4+VCAM1 (**Figura 13c**) (Michaels et al., 2022).

[0217] Si bien el hidrogel HA-ProG-DLL4-G permanece estable al cultivar HSC derivadas de SC encapsuladas, esta formulación de hidrogel se degrada en un plazo de 7 días al cultivar HSPC derivadas de PSC encapsuladas. Por lo tanto, se utiliza el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG para el cultivo de HSPC derivadas de PSC encapsuladas, ya que el PEG de 4 brazos aumenta la densidad de reticulación del hidrogel al aumentar la relación metiltetrazina/norborneno. La adición de 2 µL a 126 mg/mL de reticulante de PEG previene la degradación del hidrogel.

[0218] Las células generadas a partir de HSPC derivadas de PSC cultivadas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG durante 2 semanas con el medio de expansión de progenitores linfoides comprenden ~7,6%

de células Pro-T CD5(+)CD7(+) (**Figura 13d, f**). Por lo tanto, la frecuencia de células Pro-T generadas a partir de HSPC derivadas de PSC es menor que la de aquellas generadas a partir de HSC derivadas de SC en los hidrogeles de ingeniería (Figuras 7c-e, 9d, 10c, 11a-b, 12b). Esto es consistente con los sistemas de diferenciación de células T 2D existentes, que producen un mayor número de células Pro-T utilizando HSC derivadas de SC (Edgar et al., 2022; Michaels et al., 2022). Como se demuestra en la Figura 11, la composición del medio tiene un impacto significativo en el desarrollo de células T a partir de HSC derivadas de SC encapsuladas en los hidrogeles de ingeniería. En consecuencia, la sustitución del suplemento de expansión de progenitores linfoides por el suplemento de maduración de progenitores de células T tras 1 semana de cultivo de HSPC derivadas de PSC en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG resulta en una mejora sustancial en la generación de células Pro-T, aumentando del 7,6% al 29,71% (**Figura 13d-f**). Por lo tanto, en una realización preferida, el suplemento de expansión de progenitores linfoides es reemplazado por el suplemento de maduración de progenitores de células T tras 1 semana de cultivo al encapsular HSPC derivadas de PSC en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG (Figuras 14a, 15a). Este intercambio de medio preferido resulta en una cinética de diferenciación en el interior de los hidrogeles similar a la observada en la plataforma de diferenciación 2D previamente descrita por los inventores (Michaels et al., 2022).

[0219] Además de la composición del medio, la concentración de DLL4 y los niveles de oxígeno influyen en el desarrollo de células T a partir de HSPC derivadas de PSC encapsuladas en los hidrogeles funcionalizados con DLL4. La Figura 14b muestra imágenes representativas de campo claro de células generadas a partir de HSPC derivadas de PSC encapsuladas durante 2 semanas en hidrogeles funcionalizados con DLL4 con diferentes condiciones de oxígeno y concentraciones de DLL4. Las Figuras 14c-d muestran un análisis representativo por citometría de flujo y las frecuencias de células Pro-T CD5(+)CD7(+) generadas. Como se muestra en la Figura 14b, las HSPC derivadas de PSC generan menos células en hidrogeles que contienen 50 µg de DLL4 por mL de hidrogel en comparación con 100 µg/mL de DLL4 tras 2 semanas tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. En condiciones de normoxia, las HSPC derivadas de PSC también generan frecuencias menores de células Pro-T en hidrogeles que contienen 50 µg/mL de DLL4 en comparación con 100 µg/mL de DLL4 (Figuras 14c-d). Sin embargo, en condiciones de hipoxia, la frecuencia de células Pro-T generadas no difiere entre 50 µg/mL y 100 µg/mL de DLL4, lo que indica que las condiciones hipóxicas potencian la diferenciación de HSPC derivadas de PSC en células Pro-T en hidrogeles funcionalizados con DLL4.

[0220] Dado que las HSPC derivadas de PSC no se expanden en la misma medida que las HSC derivadas de SC, se requiere un mayor volumen de hidrogel y un mayor número de HSPC derivadas de PSC encapsuladas para producir un número suficiente de células para el análisis por citometría de flujo. Sorprendentemente, el aumento del volumen de hidrogel y del número de HSPC derivadas de PSC

encapsuladas (de 15 μ L y 7.500 células a 30 μ L y 15.000 células), manteniendo la misma densidad celular utilizada para las HSC derivadas de SC, no solo genera un mayor número de células sino también una mayor frecuencia de células Pro-T generadas (**Figura 15b**). Por lo tanto, en una realización preferida, 15.000 HSPC derivadas de PSC son encapsuladas en 30 μ L de hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG.

[0221] Las Figuras 15b-c muestran un análisis representativo por citometría de flujo de las células Pro-T CD5(+)CD7(+) generadas y la frecuencia de células Pro-T generadas a partir de diferentes lotes de HSPC derivadas de PSC tras 2 semanas en hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG-G en presencia o ausencia de VCAM1. De manera similar a las HSC derivadas de SC cultivadas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-G (Figuras 9d-e, 10), la adición de VCAM1 en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG-G no afecta la formación de células Pro-T a partir de HSPC derivadas de PSC. Sin embargo, como se muestra en la Figura 15c, la frecuencia de células Pro-T generadas varía significativamente entre diferentes lotes de HSPC derivadas de PSC. Por lo tanto, en una realización preferida, VCAM1 no se añade al hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG.

[0222] La Figura 15a es una representación esquemática del cronograma y las condiciones de cultivo utilizadas para generar células T maduras y funcionales a partir de HSPC derivadas de PSC encapsuladas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG. En una realización preferida, las HSPC derivadas de PSC son generadas primero utilizando el protocolo previamente descrito por los inventores, en el que las PSC son sometidas a 8 días de inducción de CD34 (días -15 a -7), enriquecimiento de células CD34(+) y luego 7 días de TEH (días -7 a 0) (Michaels et al., 2022). Las HSPC derivadas de PSC son entonces encapsuladas en hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG-G con suplemento de expansión de progenitores linfoides que contiene SCF, IL7, TPO y Flt3L durante 1 semana, seguido del suplemento de maduración de progenitores de células T que contiene IL7 y Flt3L pero no SCF ni TPO durante 2 semanas. Las células T CD4(+)CD8(+) DP son generadas tras 3 semanas de cultivo en el hidrogel y luego transferidas a placas recubiertas con DLL4+VCAM1 y cultivadas durante 2 o más semanas en medio de maduración suplementado con un activador CD3/CD28 e IL-15 para generar células T CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+) y CD8(+) SP maduras y funcionales.

[0223] Las Figuras 15 d-e muestran un análisis representativo por citometría de flujo de la expresión de CD4, CD8b, CD3 y TCR $\alpha\beta$ y las frecuencias de células T ISP CD4(+), DP CD8(+)CD4(+), CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+) y SP CD8(+) generadas a partir de HSPC derivadas de PSC encapsuladas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG tras 3 semanas. En la semana 3, las células generadas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG comprenden 29% de células T DP y 2% de células T CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+).

[0224] La Figura 15f muestra un análisis representativo por citometría de flujo de la expresión de CD4, CD8b, CD3 y TCR $\alpha\beta$ en células generadas a partir de HSPC derivadas de PSC encapsuladas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG tras 4 semanas. En la semana 4, las células generadas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG no comprenden células T ISP CD4(+), DP CD8(+)/CD4(+) ni CD3(+)/TCR $\alpha\beta$ (+). Notablemente, el 27% de las células generadas expresa CD8.

[0225] Para obtener células T CD8(+) SP convencionales, las células T DP generadas tras 3 semanas de diferenciación pueden recolectarse, transferirse a placas recubiertas con DLL4+VCAM1 y cultivarse durante 2 semanas en medio de maduración suplementado con 12,5 μ L/mL de activador ImmunoCult CD3/CD28 y 10 ng/mL de IL-15. Las Figuras 15g-h muestran un análisis representativo por citometría de flujo de la expresión de CD4, CD8, CD3 y TCR $\alpha\beta$ y las frecuencias de células T CD8(+) SP y CD3(+)/TCR $\alpha\beta$ (+) generadas a partir de células T DP extraídas del hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG en la semana 3 y luego cultivadas durante 2 semanas en placas recubiertas con DLL4+VCAM1 en presencia de un activador CD3/CD28 e IL-15. Tras 2 semanas de cultivo con el activador CD3/CD28, las células generadas comprenden ~28% de células T CD8(+) SP maduras y ~8% de células T CD3(+)/TCR $\alpha\beta$ (+), confirmando que este método genera exitosamente células T maduras a partir de HSPC derivadas de PSC encapsuladas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG.

[0226] Para evaluar la funcionalidad de las células T maduras, las células T pueden ser estimuladas para producir citocinas utilizando PMA e ionomicina, junto con brefeldina A para acumular las citocinas producidas en el interior de las células (previniendo su secreción), permitiendo así el análisis por citometría de flujo. La Figura 16 muestra un análisis representativo por citometría de flujo de la producción de citocinas en HSPC derivadas de PSC que fueron cultivadas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG durante 3 semanas, estimuladas en placas recubiertas con DLL4+VCAM1 con activador CD3/CD28 e IL-15 durante 3 semanas y luego estimuladas con PMA e ionomicina durante 6 horas, con brefeldina A añadida durante las últimas 5 horas. Como se muestra en la Figura 16, una gran proporción de las células T maduras estimuladas produce IFN- γ , y una proporción moderada produce IL-2 y TNF- α .

[0227] En general, estos hallazgos demuestran que las HSPC derivadas de PSC encapsuladas en el hidrogel HA-ProG-DLL4-PEG son capaces de una diferenciación eficiente no solo en células Pro-T sino también en células T CD8(+) maduras y funcionales.

EQUIVALENTES Y ALCANCE

[0228] Los contenidos de todas las referencias citadas (incluyendo referencias bibliográficas, patentes o solicitudes de patente de EE.UU. o extranjeras, y sitios web) que se citan a lo largo de esta solicitud

quedan por medio del presente expresamente incorporados por referencia como si estuvieran escritos en su totalidad en el presente documento para cualquier fin, así como las referencias citadas en las mismas. En caso de que surja alguna inconsistencia, prevalecerá el material literalmente divulgado en el presente documento.

[0229] Debe tenerse en cuenta que las secciones Sumario y Resumen y los Ejemplos pueden establecer una o más realizaciones a modo de ejemplo (pero no todas) de la presente divulgación contempladas por el(los) inventor(es) y, por lo tanto, no tienen la intención de limitar la presente divulgación. La memoria descriptiva anterior no es restrictiva. Muchas variaciones y equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la técnica al revisar esta memoria descriptiva. Por ejemplo, ciertos aspectos de la composición de hidrogel y otras condiciones de cultivo o la selección de células pueden alterarse sin apartarse de los conceptos inventivos descritos en el presente documento. En particular, el inventor contempla que pueden realizarse diversas sustituciones, alteraciones, variaciones y modificaciones en diversos aspectos del hidrogel, los métodos y los usos sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones. Por ello, no se pretende que el alcance de la presente invención incluya dichas variaciones y equivalentes.

REFERENCIAS

- [0230]** Agarwalla, P., Ogunnaike, E. A., Ahn, S., Froehlich, K. A., Jansson, A., Ligler, F. S., Dotti, G., & Brudno, Y. (2022). Bioinstructive implantable scaffolds for rapid in vivo manufacture and release of CAR-T cells. *Nature Biotechnology*, 40(8), 1250–1258. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01245-x>
- [0231]** An, S., Choi, S., Min, S., & Cho, S.-W. (2021). Hyaluronic acid-based biomimetic hydrogels for tissue engineering and medical applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering: BBE*, 26(4), 503–516. <https://doi.org/10.1007/s12257-020-0343-8>
- [0232]** Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 5517–5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
- [0233]** Asnaghi, M. A., Barthlott, T., Gullotta, F., Strusi, V., Amovilli, A., Hafen, K., Srivastava, G., Oertle, P., Toni, R., Wendt, D., Hollander, G. A., & Martin, I. (2021). Thymus extracellular matrix-derived scaffolds support graft-resident thymopoiesis and long-term in vitro culture of adult thymic epithelial cells. *Advanced Functional Materials*, 31(20). <https://doi.org/10.1002/adfm.202010747>
- [0234]** Brajša, K. (2016). Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Periodicum Biologorum*, 118(1), 59–65. <https://doi.org/10.18054/pb.2016.118.1.3940>
- [0235]** Cappell, K. M., & Kochenderfer, J. N. (2023). Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 20(6), 359–371. <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00754-1>
- [0236]** Castagnaro, S., Chrisam, M., Cescon, M., Braghetta, P., Grumati, P., & Bonaldo, P. (2018). Extracellular collagen VI has prosurvival and autophagy instructive properties in mouse fibroblasts. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01129>
- [0237]** Chin, M. H. W., Norman, M. D. A., Gentleman, E., Coppens, M.-O., & Day, R. M. (2020). A hydrogel-integrated culture device to interrogate T cell activation with physicochemical cues. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(42), 47355–47367. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c16478>
- [0238]** Choi, Gyeyoung, Shin, G., & Bae, S. (2022). Price and prejudice? The value of chimeric antigen

receptor (CAR) T-cell therapy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(19), 12366. <https://doi.org/10.3390/ijerph191912366>

[0239] Delplace, V., Nickerson, P. E. B., Ortin-Martinez, A., Baker, A. E. G., Wallace, V. A., & Shoichet, M. S. (2020). Nonswelling, ultralow content inverse electron-demand Diels–Alder hyaluronan hydrogels with tunable gelation time: Synthesis and in vitro evaluation. *Advanced Functional Materials*, 30(14). <https://doi.org/10.1002/adfm.201903978>

[0240] Dodda, J. M., Deshmukh, K., & Bezuidenhout, D. (2023) *Multicomponent Hydrogels: Smart Materials for Biomedical Applications*. Biomaterials Science Series, Royal Society of Chemistry (ISBN 978-1-83767-005-5, 978-1-83767-006-2), <http://dx.doi.org/10.1039/9781837670055>

[0241] Edgar, J. M., Michaels, Y. S., & Zandstra, P. W. (2022). Multi-objective optimization reveals time- and dose-dependent inflammatory cytokine-mediated regulation of human stem cell derived T-cell development. *Npj Regenerative Medicine*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41536-022-00210-1>

[0242] Fontoura, J. C., Viezzer, C., dos Santos, F. G., Ligabue, R. A., Weinlich, R., Puga, R. D., Antonow, D., Severino, P., & Bonorino, C. (2020). Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 107(110264), 110264. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110264>

[0243] Gendron, S., Couture, J., & Aoudjit, F. (2003). Integrin $\alpha 2 \beta 1$ inhibits Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes by protein phosphatase 2A-dependent activation of the MAPK/ERK pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48633–48643. <https://doi.org/10.1074/jbc.m305169200>

[0244] Goncharova, V., Seroby, N., Iizuka, S., Schraufstatter, I., de Ridder, A., Povaliy, T., Wacker, V., Itano, N., Kimata, K., Orlovskaja, I. A., Yamaguchi, Y., & Khaldoyanidi, S. (2012). Hyaluronan expressed by the hematopoietic microenvironment is required for bone marrow hematopoiesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(30), 25419–25433. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.376699>

[0245] Gopinathan, J., & Noh, I. (2018). Click chemistry-based injectable hydrogels and bioprinting inks for tissue engineering applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15(5), 531–546. <https://doi.org/10.1007/s13770-018-0152-8>

[0246] Gschweng, E., De Oliveira, S., & Kohn, D. B. (2014). Hematopoietic stem cells for cancer

immunotherapy. *Immunological Reviews*, 257(1), 237–249. <https://doi.org/10.1111/imr.12128>

[0247] Han, K., Bai, Q., Wu, W., Sun, N., Cui, N., & Lu, T. (2021). Gelatin-based adhesive hydrogel with self-healing, hemostasis, and electrical conductivity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 2142–2151. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.147>

[0248] Hansell, C. F., Espeel, P., Stamenović, M. M., Barker, I. A., Dove, A. P., Du Prez, F. E., & O'Reilly, R. K. (2011). Additive-free clicking for polymer functionalization and coupling by tetrazine–norbornene chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 133(35), 13828–13831. <https://doi.org/10.1021/ja203957h>

[0249] Hu, Q., Li, H., Archibong, E., Chen, Q., Ruan, H., Ahn, S., Dukhovlinova, E., Kang, Y., Wen, D., Dotti, G., & Gu, Z. (2021). Inhibition of post-surgery tumour recurrence via a hydrogel releasing CAR-T cells and anti-PDL1-conjugated platelets. *Nature Biomedical Engineering*, 5(9), 1038–1047. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00712-1>

[0250] Iriguchi, S., Yasui, Y., Kawai, et al. (2021). A clinically applicable and scalable method to regenerate T-cells from iPSCs for off-the-shelf T-cell immunotherapy. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20658-3>

[0251] Koshy, S. T., Desai, R. M., Joly, P., Li, J., Bagrodia, R. K., Lewin, S. A., Joshi, N. S., & Mooney, D. J. (2016). Click-crosslinked injectable gelatin hydrogels. *Advanced Healthcare Materials*, 5(5), 541–547. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500757>

[0252] [0208] Kratzer, D., Ludwig-Husemann, A., Junges, K., Geckle, U. & Lee-Thedieck, C. (2019) Nanostructured Bifunctional Hydrogels as Potential Instructing Platform for Hematopoietic Stem Cell Differentiation. *Frontiers in Materials*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmats.2018.00081>

[0253] Kretschmer, M., Mamistvalov, R., Sprinzak, D., Vollmar, A. M., & Zahler, S. (2023). Matrix stiffness regulates Notch signaling activity in endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 136(2). <https://doi.org/10.1242/jcs.260442>

[0254] Lee, Y., Balikov, D., Lee, J., Lee, S., Lee, S., Lee, J., Park, K., & Sung, H.-J. (2017). In situ forming gelatin hydrogels-directed angiogenic differentiation and activity of patient-derived human mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1705.

<https://doi.org/10.3390/ijms18081705>

[0255] Levine, B. L., Miskin, J., Wonnacott, K., & Keir, C. (2017). Global manufacturing of CAR T cell therapy. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 4, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.006>

[0256] Lins, M. P. (2022). Thymic extracellular matrix in the thymopoiesis: Just a supporting? *Biotech (Basel (Switzerland))*, 11(3), 27. <https://doi.org/10.3390/biotech11030027>

[0257] Michaels, Y. S., Edgar, J. M., Major, M. C., Castle, E. L., Zimmerman, C., Yin, T., Hagner, A., Lau, C., Hsu, H. H., Ibañez-Rios, M. I., Durland, L. J., Knapp, D. J. H. F., & Zandstra, P. W. (2022). DLL4 and VCAM1 enhance the emergence of T cell-competent hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells. *Science Advances*, 8(34). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn5522>

[0258] Mohtashami, M., Shah, D. K., Kianizad, K., Awong, G., & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2013). Induction of T-cell development by Delta-like 4-expressing fibroblasts. *International Immunology*, 25(10), 601–611. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxt027>

[0259] Moore, E. M., & West, J. L. (2019). Bioactive poly(ethylene glycol) acrylate hydrogels for regenerative engineering. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 5(2), 167–179. <https://doi.org/10.1007/s40883-018-0074-y>

[0260] Ng, E. S. et al. (2016). Differentiation of human embryonic stem cells to HOXA(+) hemogenic vasculature that resembles the aorta-gonad-mesonephros. *Nature Biotechnology*, 34, 1168–1179, <https://doi.org/10.1038/nbt.3702>

[0261] Oliveira, J. T., & Reis, R. L. (2008). Hydrogels from polysaccharide-based materials: Fundamentals and applications in regenerative medicine. In R. L. Reis, N. M. Neves, J. F. Mano, M. E. Gomes, A. P. Marques, & H. S. Azevedo (Eds.), *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications* (Elsevier) (pp. 485–514). <https://doi.org/10.1533/9781845694814.4.485>

[0262] Rizwan, M., Ling, C., Guo, C., Liu, T., Jiang, J.-X., Bear, C. E., Ogawa, S., & Shoichet, M. S. (2022). Viscoelastic Notch signaling hydrogel induces liver bile duct organoid growth and morphogenesis. *Advanced Healthcare Materials*, 11(23). <https://doi.org/10.1002/adhm.202200880>

- [0263]** Rutz, S., Mordmüller, B., Sakano, S., & Scheffold, A. (2005). Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. *European Journal of Immunology*, 35(8), 2443–2451. <https://doi.org/10.1002/eji.200526294>
- [0264]** Safaee, H., Bakooshli, M. A., Davoudi, S., Cheng, R. Y., Martowirogo, A. J., Li, E. W., Simmons, C.A., & Gilbert, P. M. (2017). Tethered jagged-1 synergizes with culture substrate stiffness to modulate notch-induced myogenic progenitor differentiation. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 10(5), 501–513. <https://doi.org/10.1007/s12195-017-0506-7>
- [0265]** Schmitt, T. M., & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity*, 17(6), 749–756. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00474-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00474-0)
- [0266]** Seet, C. S., He, C., Bethune, M. T., Li, S., Chick, B., Gschwend, E. H., Zhu, Y., Kim, K., Kohn, C.B., Baltimore, D., Crooks, G. M., & Montel-Hagen, A. (2017). Generation of mature T cells from human hematopoietic stem and progenitor cells in artificial thymic organoids. *Nature Methods*, 14(5), 521–530. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4237>
- [0267]** Shah, N. J., Mao, A. S., Shih, T.-Y., Kerr, M. D., Sharda, A., Raimondo, T. M., Weaver, J. C., Vrbanc, V. D., Deruaz, M., Tager, A. M., Mooney, D. J., & Scadden, D. T. (2019). An injectable bone marrow-like scaffold enhances T cell immunity after hematopoietic stem cell transplantation. *Nature Biotechnology*, 37(3), 293–302. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0017-2>
- [0268]** Shukla, S., Langley, M. A., Singh, J., Edgar, J. M., Mohtashami, M., Zúñiga-Pflücker, J. C., & Zandstra, P. W. (2017). Progenitor T-cell differentiation from hematopoietic stem cells using Delta-like-4 and VCAM-1. *Nature Methods*, 14(5), 531–538. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4258>
- [0269]** Stephan, S. B., Taber, A. M., Jileeva, I., Pegues, E. P., Sentman, C. L., & Stephan, M. T. (2015). Biopolymer implants enhance the efficacy of adoptive T-cell therapy. *Nature Biotechnology*, 33(1), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nbt.3104>
- [0270]** Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal*, 11(4). <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
- [0271]** Sturgeon, C. M., Ditadi, A., Awong, G., Kennedy, M. & Keller, G. (2014). Wnt signaling controls

the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 32, 554-561, <https://doi.org/10.1038/nbt.2915>

[0272] Sugimura, R., Jha, D., Han, A. et al. (2017). Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nature* 545, 432-438, <https://doi.org/10.1038/nature22370>

[0273] Suraiya, A. B., Hun, M. L., Truong, V. X., Forsythe, J. S., & Chidgey, A. P. (2020). Gelatin-based 3D microgels for in vitro T lineage cell generation. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(4), 2198–2208. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01610>

[0274] Tabatabaei-Zavareh, N., Le Fevre, T. A., Man, A. J. Y., Karas, E. A., Szilvassy, S. J., Thomas, T. E., Eaves, A. C., & Wognum, A. W. (2017). Stroma-free, serum-free differentiation and expansion of hematopoietic stem and progenitor cells to the T cell lineage. *The Journal of Immunology*, 198(1_Supplement), 202.9-202.9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.198.supp.202.9>

[0275] Tang, T. C. Y., Xu, N., Nordon, R., Haber, M., Micklethwaite, K., & Dolnikov, A. (2022). Donor T cells for CAR T cell therapy. *Biomarker Research*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00359-3>

[0276] Thapa, P., & Farber, D. L. (2019). The role of the thymus in the immune response. *Thoracic Surgery Clinics*, 29(2), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.12.001>

[0277] Trotman-Grant, A. C., Mohtashami, M., De Sousa Casal, J., Martinez, E. C., Lee, D., Teichman, S., Brauer, P. M., Han, J., Anderson, M. K., & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2021). DL4-μbeads induce T cell lineage differentiation from stem cells in a stromal cell-free system. *Nature Communications*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25245-8>

[0278] Uenishi, G. I. et al., (2018). NOTCH signaling specifies arterial-type definitive hemogenic endothelium from human pluripotent stem cells. *Nature Communications*, 9, 1828, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04134-7>

[0279] Ungrin, M. D., Joshi, C., Nica, A., Bauwens, C. & Zandstra, P. W. (2008). Reproducible, ultra-high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS One* 3, e1565, doi: 10.1371/journal.pone.0001565

[0280] Vallmajo-Martin, Q., Broguiere, N., Millan, C., Zenobi-Wong, M., & Ehrbar, M. (2020). PEG/HA

hybrid hydrogels for biologically and mechanically tailorable bone marrow organoids. *Advanced Functional Materials*, 30(48). <https://doi.org/10.1002/adfm.201910282>

[0281] Xue, X., Hu, Y., Wang, S., Chen, X., Jiang, Y., & Su, J. (2022). Fabrication of physical and chemical crosslinked hydrogels for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 12, 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.10.029>

[0282] Yao, M., Li, J., Zhang, J., Ma, S., Wang, L., Gao, F., & Guan, F. (2021). Dual-enzymatically cross-linked gelatin hydrogel enhances neural differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells and functional recovery in experimental murine spinal cord injury. *Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine*, 9(2), 440–452. <https://doi.org/10.1039/d0tb02033h>

[0283] Zúñiga-Pflücker, J. C. (2004). T-cell development made simple. *Nature Reviews Immunology*, 4(1), 67-72. <https://doi.org/10.1038/nri1257>

[0284] Brunton, L. L. & Knollmann, B. C. (eds.). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 14th Edition, McGraw Hill LLC (New York) (2023) (ISBN 978-1-264-25807-9)

[0285] Davis et al. *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X)

[0286] Green, M. R. & Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 1936113414)

[0287] Luttmann, W., Bratke, K., Kupper, M., & Myrtek, D. *Immunology*, 1st Edition, published by Elsevier, 2006 (ISBN 9780323281669, 9780120885442, 9780080916675)

[0288] Meyers, R. A., (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)

[0289] Murphy, K. & Weaver, C. (eds.), *Janeway's Immunobiology*, 9th Edition, published by Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2017 (ISBN 978-0-8153-4505-3, 978-0-8153-4551-0)

[0290] *Current Protocols in Immunology (CPI)* (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735,

9780471142737)

[0291] Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385)

[0292] Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005

[0293] Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542)

[0294] Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055)

[0295] The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908)

[0296] The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3)

[0297] WO 2022/241558 A1 (PCT/CA2022/050789) published November 22, 2022 (Petere Zandstra et al.)