

REIVINDICACIONES

Se reivindica:

1. Un hidrogel tridimensional (3D) que comprende:
 - a. Un primer polímero biocompatible que es un polímero polisacárido;
 - b. Al menos un segundo polímero biocompatible; y
 - c. Al menos una molécula de señalización inmovilizada directa o indirectamente en el primer y/o segundo polímero,
 - d. En el que el primer y el segundo polímero biocompatible están reticulados.
2. El hidrogel de la reivindicación 1, en el que la molécula de señalización es una que promueve la expansión y diferenciación de células madre progenitoras hematopoyéticas (HSPC), células madre hematopoyéticas (HSC) y/o células progenitoras hematopoyéticas hacia células T progenitoras y precursoras y/o células T maduras.
3. El hidrogel de la reivindicación 2, en el que la molécula de señalización es un ligando Notch y/o un ligando receptor de integrina o de adhesión celular.
4. El hidrogel de la reivindicación 3, en el que el ligando Notch se selecciona de uno o más de: DLL1, DLL3, DLL4, JAG1 y JAG2 o de DLL1 o DLL4, o una forma humana recombinante de cualquiera de los anteriores.
5. El hidrogel de la reivindicación 4, en el que el ligando Notch es DLL4 o una forma humana recombinante del mismo.
6. El hidrogel de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ligando Notch está inmovilizado directa o indirectamente en el primer polímero biocompatible.
7. El hidrogel de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la molécula de señalización está presente en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 microgramos por mL de hidrogel.
8. El hidrogel de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el primer polímero biocompatible 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.

- 9.** El hidrogel de la reivindicación 8, en el que el primer polímero biocompatible se seleccionada 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.
- 10.** El hidrogel de la reivindicación 9, en el que el primer polímero biocompatible es ácido hialurónico o sales o ésteres del mismo, tal como hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de magnesio e hialuronato de calcio.
- 11.** El hidrogel de la reivindicación 10, en el que el primer polímero tiene entre aproximadamente 150 y 300 kDa.
- 12.** El hidrogel de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que uno de los 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.
- 13.** El hidrogel de la reivindicación 12, en el que uno de los al menos un segundo polímero biocompatible actúa como (i) reticulante y (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.
- 14.** El hidrogel de la reivindicación 12, en el que 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.
- 15.** El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho al menos un segundo polímero biocompatible es un PEG, una gelatina o una combinación de los mismos.
- 16.** El hidrogel de la reivindicación 15, en el que dicho al menos un segundo polímero biocompatible es una gelatina, tal como una gelatina de 60 kDa.
- 17.** El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el hidrogel 3D se encuentra en estado líquido o estado de gel; y el hidrogel 3D forma una

matriz 3D reticulada, tal como al gelificarse.

- 18.** El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, sembrado con células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC), células madre hematopoyéticas (HSC) y/o células progenitoras hematopoyéticas (HPC) o combinaciones de las mismas, encapsuladas en el interior del hidrogel 3D.
- 19.** El hidrogel 3D de la reivindicación 18, en el que las células derivan de cualquier fuente de HSPC, HSC o HPC, o de células derivadas de sangre de cordón o de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), o derivadas de cualquier fuente humana, sangre de cordón umbilical humana o células madre pluripotentes inducidas humanas.
- 20.** El hidrogel 3D de la reivindicación 19, en el que dicho al menos un segundo polímero biocompatible es tanto un reticulante como un estabilizador de hidrogel y/o una molécula de adhesión celular, y/o es 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, tal como gelatina.
- 21.** El hidrogel 3D de la reivindicación 20, en el que dicho al menos un segundo polímero biocompatible comprende además al menos un segundo polímero biocompatible que es un polímero sintético, tal como PEG u otro polímero que sea inerte a la degradación por enzimas celulares.
- 22.** El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que el primer polímero biocompatible, el segundo polímero biocompatible y la molécula de señalización están conectados mediante química clic.
- 23.** El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que 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) o ProG.
- 24.** El hidrogel 3D de la reivindicación 22 o 23, en el que 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.
- 25.** Un hidrogel 3D que comprende:
 - a. Un primer polímero biocompatible que es un polímero polisacárido;
 - b. Al menos un segundo polímero biocompatible; y

- c. Al menos una molécula de señalización inmovilizada directa o indirectamente en el primer y/o el segundo polímero;

En el que el primero 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; y

en el que opcionalmente el hidrogel 3D es sembrado con al menos una célula, y en el que opcionalmente dicha al menos una célula se selecciona del grupo que consiste en células madre hematopoyéticas (HSC), células progenitoras hematopoyéticas (HPC) o cualquier combinación de las mismas (es decir, HSPC), la cual queda encapsulada en el interior del hidrogel 3D.

26. El hidrogel 3D de la reivindicación 25, en el que la molécula de señalización es una proteína de fusión Fc, comprendiendo además el hidrogel 3D:

- a. Un agente de unión a proteína de fusión Fc,
- b. 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.

27. El hidrogel 3D de la reivindicación 25 o 26, para uso en la expansión y diferenciación de dicha al menos una célula hacia células T progenitoras y precursoras y células T maduras.

28. El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en el que los componentes del hidrogel 3D se seleccionan para imitar la estructura 3D de la matriz extracelular (MEC) del timo.

29. El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que una proporción de los componentes del hidrogel 3D puede seleccionarse para imitar un microentorno del timo.

30. El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 29, en el que dicha al menos una célula es una HSPC derivada de sangre de cordón (SC) o una HSPC derivada de células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

31. El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 30, en el que el hidrogel

3D se utiliza para promover el desarrollo del linaje de células T a partir de dicha al menos una célula sembrada.

- 32.** El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 31, en el que la molécula de señalización es un ligando Notch, tal como DLL4 o DLL1, o un ligando integrina, tal como VCAM1.
- 33.** El hidrogel 3D de la reivindicación 32, en el que el ligando Notch es DLL4.
- 34.** El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 33, en el que la química clic es una química de conjugación norborneno-tetrazina.
- 35.** El hidrogel 3D de la reivindicación 34, en el que la tetrazina es metiltetrazina.
- 36.** El hidrogel 3D de la reivindicación 34 o 35, en el que 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.
- 37.** El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 36, en el que el primer polímero biocompatible es un polímero polisacárido seleccionado del grupo que consiste en polisacáridos sintéticos o naturales tales como alginato, quitosano, celulosa o ácido hialurónico (HA) o sales o ésteres de cualquiera de los anteriores.
- 38.** El hidrogel 3D de la reivindicación 37, en el que el polímero polisacárido es ácido hialurónico o una sal o éster del mismo.
- 39.** El hidrogel 3D de la reivindicación 38, en el que el ácido hialurónico o sal del mismo tiene entre 150 y 300 kDa.
- 40.** El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 39, en el que el agente de unión a proteína de fusión Fc es Proteína A (ProA) o Proteína G (ProG).
- 41.** El hidrogel 3D de la reivindicación 40, en el que la proteína de fusión Fc es Proteína G (ProG).
- 42.** El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en el que 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.
- 43.** El hidrogel de la reivindicación 42, en el que dicho 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 un polímero que tiene un sitio de unión al receptor de integrina, tal como RGD.

44. El hidrogel de la reivindicación 42, en el que 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.
45. El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, en el que dicho al menos un segundo polímero biocompatible es una gelatina, un PEG o una combinación de los mismos.
46. El hidrogel de la reivindicación 45, en el que dicho al menos un segundo polímero biocompatible es una gelatina.
47. El hidrogel de la reivindicación 46, en el que la gelatina tiene entre 40 y 70 kDa.
48. El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 47, en el que, en estado gelificado, la rigidez del hidrogel corresponde a la rigidez de una región del timo humano.
49. El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48, en el que la rigidez del hidrogel 3D tiene un módulo de Young de 2,5 a 3,5 kPa.
50. El hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49, para uso en la promoción de la expansión y diferenciación de dicha al menos una célula sembrada hacia un linaje de células T, en el que el hidrogel 3D con dicha al menos una célula sembrada se cultiva en un medio que promueve dicha expansión y diferenciación.
51. El hidrogel 3D para uso de la reivindicación 50, en el que:
 - a. El medio comprende un medio basal suplementado con al menos una citocina,
 - b. El medio basal es seleccionado del grupo que consiste en IMDM, RPMI, α MEM, SFEM II, StemPro34 y cualquier medio adecuado diseñado y optimizado para el cultivo de células madre humanas; y
 - c. 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.
52. El hidrogel 3D para uso de las reivindicaciones 50 o 51, en el que se forman

esferoides celulares a partir de dicha al menos una célula sembrada.

- 53.** El hidrogel 3D para uso de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 52, en el que las células del linaje de células T son recolectadas y recuperadas del hidrogel 3D utilizando enzimas y/o hidrólisis para disolver el hidrogel 3D.
- 54.** El hidrogel 3D para uso de la reivindicación 53, en el que las células del linaje de células T son células progenitoras tempranas de células T (ETP), células Pro-T, células Pre-T, células T positivas simples iniciales (ISP), células T doble positivas (DP), células T positivas simples (SP) maduras, o una combinación de las mismas.
- 55.** El hidrogel 3D para uso de la reivindicación 53, en el que las células recuperadas pueden diferenciarse adicionalmente en el interior del hidrogel 3D en condiciones de medio adecuadas o fuera del hidrogel sobre sustratos 2D.
- 56.** Un método para producir el hidrogel 3D de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55, que comprende:
- a. 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
 - b. 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.
- 57.** El método de la reivindicación 56, en el que 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.
- 58.** El método de la reivindicación 56 o 57, en el que la molécula de señalización es modificada para permitir la etapa de inmovilización de la molécula de señalización.
- 59.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 56 a 58, en el que:
- a. Se utiliza un agente de unión para inmovilizar la molécula de señalización en el interior de la matriz de hidrogel 3D; y
 - b. 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.

60. El método de la reivindicación 59, en el que:

- a. La molécula de señalización es una proteína de fusión Fc humana; y
- b. El agente de unión es una proteína que se une con alta afinidad la proteína de fusión Fc, tal como la Proteína A o Proteína G.

61. El método de cualquiera de las reivindicaciones 56 a 60, en el que el primer polímero biocompatible y dicho al menos un segundo polímero biocompatible son modificados con grupos reactivos de química clic.

62. El método de cualquiera de las reivindicaciones 56 a 61, en el que el primer polímero biocompatible es modificado con un grupo norborneno y dicho al menos un segundo polímero biocompatible es modificado con un grupo metiltetrazina.

63. El método de cualquiera de las reivindicaciones 59 a 62, en el que el agente de unión es modificado con un grupo reactivo de química clic, tal como un grupo norborneno o un grupo metiltetrazina.

64. El método de cualquiera de las reivindicaciones 56 a 63, en el que:

- a. 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;
- b. 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
- c. el hidrogel 3D pasa a estado gelificado, encapsulando así la al menos una célula sembrada.

65. Un método para el desarrollo de células T humanas *in vitro*, que comprende:

- a. Proporcionar el hidrogel funcionalizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32;
- b. Sembrar el hidrogel 3D con células seleccionadas del grupo de HSC, HPC o una combinación de las mismas (HSPC); y
- c. Cultivar las células en el interior del hidrogel 3D bajo condiciones que promueven la especificación linfoide (linfopoyesis), la diferenciación en células T progenitoras y precursoras y la maduración de células T,

generando 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, células T CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+) capaces de secretar citocinas o combinaciones de las mismas.

- 66.** El método de la reivindicación 65, en el que el hidrogel 3D en estado líquido se vierte en un molde para formar un estado gelificado.
- 67.** El método de la reivindicación 65 o 66, en el que las células son sembradas en el hidrogel 3D a una densidad celular de aproximadamente 300.000 a aproximadamente 2.000.000 por 1 mL de hidrogel 3D.
- 68.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 65 a 67, en el que las células son sembradas en el hidrogel 3D cuando el hidrogel se encuentra en estado líquido.
- 69.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 65 a 68, en el que:
 - a. Las condiciones son no-xenogénicas, libres de células nodriza y libres de suero; y
 - b. Las condiciones comprenden un medio de cultivo definido.
- 70.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 65 a 69, en el que:
 - a. Las condiciones comprenden un medio basal suplementado con al menos una citocina;
 - b. El medio basal se selecciona del grupo que consiste en IMDM, RPMI, α MEM, SFEM II, StemPro34 y cualquier medio adecuado diseñado y optimizado para el cultivo de células madre humanas; y
 - c. 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.
- 71.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 65 a 70, en el que las células son células derivadas de sangre de cordón umbilical humana (SC).
- 72.** El método de la reivindicación 71, en el que el cultivo de las células derivadas de SC en el interior del hidrogel 3D comprende:
 - a. Una primera etapa de cultivo, en la que las condiciones comprenden un medio basal suplementado con un suplemento de expansión de progenitores linfoides que comprende 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 un suplemento de maduración que comprende IL7 y Flt3L, pero no SCF ni TPO, durante 3 a 10 semanas adicionales.

73. El método de la reivindicación 72, que comprende además:

- a. Disolver el hidrogel 3D tras la segunda etapa de cultivo utilizando una solución enzimática o hidrólisis; y
- b. Aislar células T CD4(+)CD8(+) DP, células T CD8(+) SP, células T CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+) o combinaciones de las mismas generadas tras la segunda etapa de cultivo.

74. El método de la reivindicación 73, en el que se aíslan células T CD4(+)CD8(+) DP tras la segunda etapa de cultivo, que comprende además:

- a. transferir las células T CD4(+)CD8(+) DP a un sustrato bidimensional (2D) recubierto con DLL4 y VCAM1; y
- b. 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 $\alpha\beta$ (+).

75. El método de cualquiera de las reivindicaciones 65 a 69, en el que las células son células derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) humanas.

76. El método de la reivindicación 75, en el que, en el que el cultivo de las células derivadas de iPSC en el interior del hidrogel 3D comprende:

- a. Una primera etapa de cultivo, en el que las condiciones comprenden un medio basal suplementado con SCF, IL7, TPO y Flt3L durante 1 a 2 semanas; y
- b. Una segunda etapa de cultivo, en la que las condiciones comprenden un medio basal suplementado con IL7 y Flt3L durante 2 a 10 semanas adicionales.

77. El método de la reivindicación 76, que comprende además:

- a. disolver el hidrogel 3D tras la segunda etapa de cultivo utilizando una solución enzimática o hidrólisis; y
- b. aislar células T CD4(+)CD8(+) DP, células T CD8(+) SP, células T CD3(+)TCR $\alpha\beta$ (+) o combinaciones de las mismas generadas tras la segunda etapa de cultivo.

- 78.** El método de la reivindicación 77, en el que se aíslan células T CD4(+)CD8(+) DP tras la segunda etapa de cultivo, que comprende, además:
- a. transferir las células T CD4(+)CD8(+) DP a un sustrato 2D recubierto con DLL4 y VCAM1; y
 - b. 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 $\alpha\beta$ (+).
- 79.** El uso de los hidrogeles de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55 y los métodos de las reivindicaciones 56 a 78 para producir células T maduras.