

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 025**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783	(2010.01)	C12N 5/074	(2010.01)
A61K 35/17	(2015.01)		
A61P 31/12	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 37/02	(2006.01)		
A61P 37/08	(2006.01)		
C12N 5/095	(2010.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
C07K 14/725	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2015 PCT/JP2015/070623**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16010154**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2015 E 15822874 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3170896**

54 Título: **Método de producción de citoblastos pluripotentes que tienen un gen receptor de linfocitos T específico de antígenos**

30 Prioridad:

18.07.2014 US 201462026336 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2020

73 Titular/es:

**KAWAMOTO, HIROSHI (100.0%)
85-1 Shimogamo Matsunoki-cho Sakyo-ku
Kyoto-shi, Kyoto 606-0816, JP**

72 Inventor/es:

**MASUDA, KYOKO;
MAEDA, TAKUYA y
KATSURA, YOSHIMOTO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 793 025 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de producción de citoblastos pluripotentes que tienen un gen receptor de linfocitos T específico de antígenos

5 Campo de la invención

La presente solicitud se refiere a la inmunoterapia basada en células. Específicamente, un método para preparar células que se va a usar para la inmunoterapia basada en células introduciendo genes que codifican un receptor de linfocitos T específico de un antígeno deseado en citoblastos pluripotentes inducidos.

10

Antecedentes de la técnica

Cada linfocito T expresa un receptor de linfocitos T (TCR) con diferente especificidad. Cuando se desarrolla una enfermedad infecciosa, un linfocito T que tiene una especificidad adecuada proliferará para dar una población de linfocitos T (clones) que combatirá el patógeno. Esta es la idea básica de la inmunidad adquirida. Si es posible amplificar artificialmente un linfocito T con una especificidad deseada, los linfocitos T amplificados se pueden usar para la inmunoterapia adoptiva. La amplificación de un linfocito T dado se denomina "clonación". De hecho, se ha llevado a cabo clínicamente el trasplante autólogo de linfocitos T específicos de antígeno preparados mediante la amplificación de linfocitos T específicos de antígenos obtenidos del paciente. Sin embargo, casi todas las terapias de trasplante con linfocitos autólogos no utilizan una población de células purificadas hasta la medida de células "clonadas". Además, el subcultivo *in vitro* repetido de las células pueden dar lugar a la pérdida de la función de destruir las células cancerosas.

15

20

25

Se ha propuesto un método para proporcionar linfocitos T que son capaces de proliferar infinitamente inmortalizando las células. Una célula se puede inmortalizar y hacer proliferar para dar una población de células clonadas. Los procedimientos para inmortalizar una célula pueden incluir la fusión de la célula con una célula cancerosa, así como el cultivo a largo plazo de las células con TCR estimulantes en presencia de citoquinas. Sin embargo, el autotrasplante obtenido de esta manera de linfocitos T inmortalizados puede ser peligroso porque las células son células cancerosas. Además, los procedimientos de clonación podrían disminuir la función celular.

30

El documento US2009/0217403 A1 describe un método para generar linfocitos T que comprende un TCR capaz de unirse específicamente a un antígeno de interés, comprendiendo el método proporcionar un hemocitoblasto o una célula precursora de un linfocito T con una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos parte de un gen redispuesto que codifica una cadena de TCR y que permite la diferenciación del hemocitoblasto o célula precursora y la generación de al menos un linfocito T derivado del hemocitoblasto o célula precursora. Las inmunoterapias basadas en células en las que se trasplantan linfocitos T propuestas hasta ahora se explican resumidas a continuación.

35

A. Clonación de linfocitos T que utiliza la técnica de reprogramación

40

Se han propuesto métodos en los que los citoblastos que transportan genes que codifican un TCR específico de antígeno se expanden clonalmente usando la técnica de reprogramación. Se espera que este método disminuya los problemas en el trasplante autólogo de linfocitos T. Específicamente, se generaron citoblastos pluripotentes a partir de linfocitos T por medio de trasplante nuclear o la técnica de establecer células iPS. Se han presentado solicitudes de patente que se dirigen a este concepto (documentos WO2008/038579 y WO2011/096482). El documento US2013/0078226 A1 se refiere a un método para producir linfocitos T humanos induciendo células iPS a partir de linfocitos T humanos y diferenciando las células iPS en linfocitos T. Se han publicado artículos sobre dichos métodos en 2010 y 2013:

45

1) Watarai H, A Rybouchkin, N Hongo, Y Nagata, S Sakata, E Sekine, N Dashtsoodol, T Tashiro, S-I Fujii, K Shimizu, K Mori, K. Masuda, H Kawamoto, H Koseki, y M Taniguchi. Generation of functional NKT cells *in vitro* from embryonic stem cells bearing rearranged invariant V α 14-J α 18 TCR α gene. Blood.115:230-237.2010.

50

2) Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S-I, Koseki H, Kawamoto H. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPS cells derived from mature CD8+ T cells. Cell Stem Cell. 12: 31-36. 2013.

55

3) Nishimura T et al.Cell Stem Cell.12: 114-226. 2013.

En dichos métodos, las células ES o células iPS se establecieron a partir de linfocitos T de pacientes, Los linfocitos T se reprodujeron a partir de dichas células ES o iPS y, a continuación, los linfocitos T regenerados se trasplantaron al paciente (trasplante autólogo). Sin embargo, los métodos tienen al menos tres problemas que se muestran a continuación: A1) las células iPS deben establecerse a partir de cada paciente y, por tanto, resulta imposible la preparación previa para la terapia aplicable a diversas personas; A2) las células iPS se establecen para cada paciente y, por tanto, la calidad y la seguridad de las iPS obtenidas puede variar cada vez; y A3) los linfocitos T diferenciados a partir de las células T-iPS pueden volverse cancerosos.

60

65

B. Terapia de linfocitos T en la que se usan linfocitos T donde se han introducido genes que codifican un TCR

Se han realizado en diversos lugares (Morgan R.A. et al. Science. 314:126.2006) ensayos clínicos de terapias génicas donde los genes que codifican un receptor de linfocitos T específico de antígenos (TCR) se aíslan y los genes se transfectan a linfocitos T normales obtenidos del paciente que se va a tratar, a continuación, los linfocitos T transfectados se trasplantan al paciente (trasplante autólogo). Los linfocitos T se obtienen como agregados de diversos clones. De acuerdo con este método, la expresión del TCR originalmente presente en los linfocitos T normales se suprime mediante, por ejemplo, el ARNip (Okamoto S et al, Cancer Res 69:9003, 2009). Por tanto, los linfocitos T obtenidos que expresan solo el TCR específico se someten al trasplante autólogo. Por ejemplo, se han aislado genes que codifican un receptor de linfocitos T específico de un antígeno WT1. Se ha llevado a cabo una terapia génica usando los genes TCR para tratar cánceres que expresan WT1.

En el método B, los linfocitos T usados para la terapia también se preparan a partir de linfocitos T del paciente que se va a tratar. Este método tiene los siguientes tres problemas. B1) Existe riesgo de que los linfocitos T del paciente se vuelvan cancerosos, ya que esto es una terapia génica; B2) La expresión de los genes endógenos que codifican el TCR original en los linfocitos T que se van a trasplantar puede no estar suprimida perfectamente y, por tanto, existe riesgo de reacción imprevista; B3) Los linfocitos T deben prepararse a partir de cada paciente y, por tanto, resulta imposible la preparación previa para la terapia aplicable a diversas personas

C. Infusión de linfocitos donantes

El trasplante de médula ósea para una neoplasia maligna hematológica tal como leucemia tiene también un aspecto como inmunoterapia basada en células. Es decir, se espera que los linfocitos T contenidos en células de médula ósea trasplantada del donante ataquen las células de leucemia del receptor. Se ha conocido también la infusión de linfocitos de un donante, en la que los linfocitos T del donante se infunden por separado tras el trasplante de médula ósea para potenciar el efecto. Recientemente, se ha propuesto un nuevo método en el que se infunden linfocitos T específicos de un antígeno dado expandidos clonalmente (Chapuis et al. Sci Transl Med. 5:174ra27.2013).

En este método, los linfocitos T que se van a infundir se derivan de un donante. Sin embargo, el sistema hematopoyético del receptor, tras recibir el trasplante de médula ósea, se ha convertido en el mismo que el del donante. Por consiguiente, se considera que la infusión de linfocitos T tras el trasplante de médula ósea es una clase de trasplante autólogo. Este método requiere el trasplante de médula ósea y el paciente debe recibir inmunosupresores durante toda su vida.

D. Uso de linfocitos del cordón umbilical para tratar a otra persona

Los pacientes que recibieron un trasplante de sangre del cordón umbilical desarrollan algunas veces una enfermedad infecciosa vírica debido a la disminución de la capacidad de inmunización. Para tratar a dichos pacientes, se ha propuesto la infusión de LTC específicos de virus contenidos en la sangre de cordón umbilical procedentes de una persona diferente a la persona de la que se obtuvo el cordón umbilical original (Blood. 116:5045.2010). Se ha presentado una solicitud de patente sobre una idea de trasplantar LTC de un donante que tiene HLA coincidentes con los HLA del paciente en cierta extensión, pero no completamente (documento WO2011/021503). Sin embargo, los linfocitos T en la sangre de cordón umbilical son agregados de clones, es decir un agregado de las células que contienen numerosos TCR diferentes. Por lo tanto, no se puede evitar perfectamente un riesgo de ejercer la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD).

Como se ha analizado anteriormente, se ha propuesto una variedad de inmunoterapias basadas en células usando linfocitos T. Todas las terapias excepto D son el trasplante de células autólogas o se consideran como un trasplante autólogo. El trasplante de linfocitos T heterólogos es contrario al conocimiento técnico general común. En el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas tales como leucemia, por ejemplo, se realiza el trasplante de médula ósea con, generalmente, hemocitoblastos. Para evitar el rechazo de la médula ósea del donante por el receptor, se usa médula ósea de un donante que tiene HLA coincidentes con los HLA del receptor. Sin embargo, las secuencias de aminoácidos de varias proteínas diferentes de los HLA no coinciden entre dos personas y los linfocitos T del donante pueden reconocer estos emparejamientos erróneos como dianas para el ataque. Como resultado, una parte de los linfocitos T del donante trasplantados ataca el cuerpo del receptor, es decir, podría ejercerse la reacción de injerto contra hospedador, y poner al receptor en riesgo de muerte (Ito et al Lancet, 331: 413, 1988).

Está en curso un proyecto para crear un banco de células iPS muy versátil con donantes que tengan haplotipos HLA que se encuentren frecuentemente en personas japonesa con homocigosis. (CURANOSKI. Nature vol.488.139.2012). Sin embargo, en el trasplante de linfocitos T, incluso si el donante tiene HLA que coinciden completamente con los HLA del receptor, sigue existiendo riesgo de reacción de injerto contra hospedador. Además, cuando los HLA no coinciden, se espera una reacción de injerto contra hospedador más grave. Por consiguiente, este proyecto de depósito de iPS ha sido inaplicable para la inmunoterapia basada en células que utiliza linfocitos T.

65 Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

- [Bibliografía de patentes 1] documento WO2008/038579
- [Bibliografía de patentes 2] documento WO2011/096482
- 5 [Bibliografía de patentes 3] documento WO2011/021503
- [Bibliografía de patentes 4] documento US2009/0217403 A1
- [Bibliografía de patentes 5] documento US2013/0078226 A1

Documentos no de patente

- 10 [Bibliografía no de patentes 1] Watarai et al. Blood.115:230-237. 2010.
- [Bibliografía no de patentes 2] Vizcardo et al. Cell Stem Cell.12:31-36.2013.
- [Bibliografía no de patentes 3] Nishimura T et al. Cell Stem Cell.12:114-226.2013.
- [Bibliografía no de patentes 4] Morgan R.A. et al.Science. 314:126.2006
- 15 [Bibliografía no de patentes 5] Okamoto S et al. Cancer Res. 69:9003.2009
- [Bibliografía no de patentes 6] Chapius et al., Sci Transl Med. 5:174ra27.2013
- [Bibliografía no de patentes 7] Blood.116: 5045.2010
- [Bibliografía no de patentes 8] Ito et al. Lancet.331:413. 1988
- [Bibliografía no de patentes 9] CYRANOSKI. Nature. vol.488. 139,2012
- 20 [Bibliografía no de patentes 10] Takahashi y Yamanaka.Cell. 126:663-673.2006
- [Bibliografía no de patentes 11] Takahashi et al. Cell. 131: 861-872.2007
- [Bibliografía no de patentes 12] Grskovic et al. Nat.Rev.Drug. Dscov. 10.915-929(2011)
- [Bibliografía no de patentes 13] Morgan R.A. et al, Science, 314:126.2006
- [Bibliografía no de patentes 14] Timmermans et al.Journal of Immunology. 182: 6879-6888.2009
- 25 [Bibliografía no de patentes 15] Blood. 111:1318.2008
- [Bibliografía no de patentes 16] Nature Immunology.11: 585.2010

Sumario de la invención

30 Un objeto de la presente solicitud es proporcionar una inmunoterapia basada en células que sea más eficaz y más segura que las inmunoterapias convencionales. La presente invención se define en las reivindicaciones.

De acuerdo con la presente solicitud, un método de inmunoterapia basado en células que comprende inducir precursores de linfocitos T o linfocitos T maduros a partir de citoblastos pluripotentes que transportan genes que codifican un TCR específico de un antígeno deseado, y administrar alogénicamente los precursores de linfocitos T o los linfocitos T maduros obtenidos a un paciente que tiene HLA coincidentes con los HLA del donante a partir del cual se establecieron los citoblastos pluripotentes en una extensión predeterminada.

40 En el método de la presente solicitud, se pueden obtener citoblastos pluripotentes que transportan genes que codifican un receptor de linfocitos T específico de un antígeno deseado introduciendo genes que codifican receptores específicos de linfocitos T en los citoblastos pluripotentes.

Los linfocitos T usados en la inmunoterapia basada en células son una población de linfocitos T expandida clonalmente y, por tanto, todas las células en la población transportan un único TCR. Por consiguiente, la posibilidad de producir una reacción de injerto contra hospedador es significativamente baja y las células se pueden usar no solo para el trasplante autólogo sino también para el trasplante alogénico. La técnica no podría esperar el método proporcionado en el presente documento a la vista de lo habitualmente establecido de que "el trasplante alogénico de los linfocitos T es una absoluta contraindicación".

50 [Efecto de la invención]

De acuerdo con la presente solicitud, los inventores pudieron resolver inesperadamente los problemas anteriormente reconocidos en cierta extensión. Están disponibles las siguientes ventajas:

- 55 1) No hay necesidad de preparar linfocitos T para el trasplante de cada paciente. Por lo tanto, se puede llevar a cabo previamente la preparación de la inmunoterapia basada en células.
- 2) La seguridad y calidad de las células que se van a trasplantar puede verificarse antes del tratamiento.
- 3) Incluso en un aloinjerto entre el paciente y el donante con HLA coincidentes, algunos antígenos menores no coinciden y, por tanto, las células trasplantadas son eventualmente rechazadas por la reacción inmunitaria del
- 60 paciente. Se puede llevar a cabo un tratamiento seguro con significativamente menos riesgo de canceración de las células trasplantadas.

Además, a la vista del hecho de que los linfocitos T para trasplante de la presente solicitud se pueden obtener por un método que tiene una etapa de introducir genes que codifican un receptor de linfocitos T (TCR) específico de un antígeno deseado en los citoblastos pluripotentes, se esperan también las siguientes ventajas:

- 1) Introduciendo genes que codifican un TCR cuya eficacia y seguridad se han confirmado previamente, se puede garantizar la calidad de los linfocitos T para el trasplante;
- 2) Se puede identificar el sitio de inserción del gen TCR y se puede confirmar de antemano una clonación segura. A continuación, se puede evitar el problema de la carcinogénesis de las células trasplantadas.
- 3) Tras la rediferenciación de los citoblastos pluripotentes en la que los genes que codificaban TCR se introdujeron en linfocitos T, los TCR introducidos se expresarán antes del TCR de los citoblastos pluripotentes originales (TCR endógeno) y, por tanto, las cadenas de TCR endógenas no se redispondrán y no se puede producir una reacción imprevista.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el vector pTA2 usado en el Ejemplo 1.

La Figura 2 muestra el vector lentivírico usado en el Ejemplo 1.

La Figura 3 muestra que los linfocitos T maduros que transportaban WT1-TCR que se introdujeron en las células iPS para dar las células TCR-iPS se regeneraron a partir de las células TCR-iPS en el Ejemplo 1.

La Figura 4 muestra que las células iPS en las que se introdujeron los genes que codificaban un TCR específico de WT1 restringido para HLA-A0201 se obtuvieron en el Ejemplo 2.

La Figura 5 muestra que un clon de las células iPS en las que se introdujeron los genes que codificaban un TCR específico de WT1 restringido para HLA-A0201 se obtuvieron en el Ejemplo 2.

La Figura 6 muestra que los genes que codifican un TCR específico de WT1 se introdujeron debidamente en las células iPS del Ejemplo 3.

La Figura 7 muestra que los genes que codifican un TCR específico de WT1 se introdujeron debidamente en las células iPS del Ejemplo 4.

25 Descripción detallada de realizaciones preferidas

En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "citoblastos pluripotentes" se refieren a citoblastos que tienen pluripotencia, es decir, capacidad de diferenciarse en muchos tipos de células del cuerpo, y capacidad de autopropagación. Los ejemplos de citoblastos pluripotentes pueden incluir embriocitoblastos (células ES), embriocitoblastos de transferencia nuclear (células ntES), citoblastos de líneas germinales (células GS), células germinales embrionarias (células EG), citoblastos pluripotentes inducidos (células iPS), fibroblastos cultivados y células pluripotentes derivadas de citoblastos mieloides (células Muse). Para crear un banco de células para la inmunoterapia basada en células a partir de donantes humanos que tienen HLA específicos, se utilizan células iPS. En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las células iPS obtenidas introduciendo un TCR se denominan células "TCR-iPS"

Las células iPS pueden ser las establecidas a partir de cualesquiera células somáticas.

Se han conocido en la técnica los procedimientos para inducir células iPS a partir de una célula somática. Se pueden establecer células iPS introduciendo los factores de Yamanaka en una célula somática. (Takahashi y Yamanaka. Cell. 126:663-673.2006, Takahashi et al. Cell. 131:861-872.2007 y Grskovic et al. Nat.Rev.Drug Discov.10:915-929.2011). Los factores de reprogramación usados para inducir células iPS no están limitados a los factores de Yamanaka y se puede emplear cualquiera de los factores o procedimientos de reprogramación que se han conocido en la técnica.

Se han conocido en la técnica los genes que codifican diversos receptores de linfocitos T específicos de antígenos usados clínicamente en la terapia de linfocitos T descritos en Antecedentes de la técnica "B" y se ha confirmado que son seguros. Por ejemplo, se han conocido genes que codifican un TRC específico de un antígeno WT1. Los genes que codifican un TCR pueden ser aquellos conocidos en la técnica así como los genes TCR que se van a identificar a partir de ahora. También se pueden aislar los genes que codifican un TCR a partir de linfocitos T con la especificidad antigénica deseada o inducirse a partir de un paciente que padece cáncer o una enfermedad infecciosa. De acuerdo con el método de la presente solicitud, se puede identificar el sitio en el cual se introducen los genes y se puede verificar antes del uso la seguridad del clon que se va a usar para la terapia. Por lo tanto, se puede evitar el riesgo de carcinogénesis.

En el método de la presente solicitud, se pueden introducir genes TCR en células iPS. El procedimiento para introducir genes TCR en las células iPS puede ser cualquiera de los conocidos en la técnica y puede llevarse a cabo según lo enseñado por Morgan R.A. et al. Science. 314:126.2006. En particular, un vector adecuado que transporta los genes TCR se puede introducir en las células iPS. Por ejemplo, se pueden introducir los genes TCR en un vector tal como un virus, vectores de plásmidos y cromosomas artificiales; o por medio de lipofección, liposoma o microinyección. Los ejemplos de vectores víricos incluyen vectores de retrovirus, vectores de lentivirus, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados y vectores del virus Sendai. Los ejemplos de vectores de cromosomas artificiales incluyen el cromosoma artificial humano (HAC), el cromosoma artificial de levadura (YAC), y el cromosoma artificial bacteriano (BAC y PAC). Los ejemplos de plásmidos que se pueden usar incluyen los plásmidos de células de mamíferos. El vector puede contener secuencia(s) reguladora(s) tal como un promotor, potenciador, secuencia de unión a ribosoma, un terminador y/o un sitio de poliadenilación para permitir la expresión

de los genes TCR. Si se desea, el vector puede contener también un marcador de selección tal como un gen de resistencia a un fármaco (por ejemplo, un gen de resistencia a la kanamicina, un gen de resistencia a la ampicilina o un gen de resistencia a la puromicina), el gen de la timidina quinasa o el gen de la toxina difteria; y un indicador tal como la proteína fluorescente verde (GFP), β -glucuronidasa (GUS) o FLAG.

5 Como se ha descrito anteriormente, cuando se introducen los genes que codifican un TCR en células iPS utilizando un vector, los genes TCR se introducen en un sitio del genoma diferente al sitio que codifica el TCR endógeno. Como alternativa, el locus del TCR en el genoma puede estar sustituido por los genes que codifican el TCR deseado. Para introducir los genes que codifican un TCR con un vector, las células iPS pueden ser,
10 preferentemente, las inducidas a partir de una célula somática diferente a un linfocito T. Como alternativa, las células iPS establecidas a partir de un linfocito T son preferibles cuando se introducen los genes TCR por medio de "sustitución". Por ejemplo, los genes TCR α y TCR β ya redispuestos pueden sustituirse por los genes TCR α y TCR β deseados por medio de la edición del genoma. Las ventajas de este procedimiento pueden incluir 1) la sincronización y el nivel de expresión del TCR introducido se pueden ajustar para que sean similares al TCR endógeno y, por tanto, se pueden generar linfocitos T de alta calidad, y 2) se puede introducir un TCR sin producir
15 daños en el genoma.

Las células TCR-IPS, que se pueden obtener introduciendo genes que codifican un TCR en células iPS, se diferencian a continuación en precursores de linfocitos T o linfocitos T maduros. El procedimiento para diferenciar
20 citoblastos pluripotentes en linfocitos T puede ser el enseñado por Timmermans et al. Journal of Immunology. 182:6879-6888.2009.

En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "precursores de linfocitos T" pueden abarcar células en cualquier etapa de desarrollo de los linfocitos T, desde células indiferenciadas que corresponden a hemocitoblastos
25 hasta células en la etapa inmediatamente anterior a que las células experimenten selección positiva/selección negativa. Los detalles de la diferenciación de los linfocitos T se explican en Blood. 111:1318.2008 y Nature Immunology. 11: 585.2010.

En los precursores de linfocitos T o linfocitos T maduros rediferenciados a partir de las células TCR-iPS, el TCR
30 introducido se expresará sin expresar el TCR endógeno. Por lo tanto, no se puede producir una reacción imprevista y se puede proporcionar una terapia segura.

En otra realización, los genes Rag1 y/o Rag2 de las células iPS pueden inactivarse génicamente para evitar completamente la redistribución del TCR endógeno. Se pueden proporcionar tratamientos más seguros empleando
35 las células así producidas. Será suficiente inactivar génicamente uno de los genes Rag1 y Rag 2. Además, el ARNip que suprime la expresión del TCR endógeno puede introducirse simultáneamente.

La inmunoterapia basada en células proporcionada por la presente solicitud se puede usar para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el antígeno al que se une específicamente el TCR introducido. Los ejemplos pueden
40 incluir cánceres, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias y enfermedades alérgicas. En el método de la presente solicitud, los linfocitos T regenerados se dispersan en un medio adecuado tal como solución salina o PBS y la dispersión se puede administrar a un paciente que tiene un determinado nivel de coincidencia del HLA con el donante de las células a partir de las cuáles se establecieron los citoblastos pluripotentes. El nivel de correspondencia entre donante y el paciente puede ser coincidencia completa. Cuando el donante es homocigótico
45 para el haplotipo HLA (denominado a partir de ahora en el presente documento "homohaplotipo HLA") y el paciente es heterocigótico para los haplotipos HLA (denominado a partir de ahora "heterohaplotipo HLA"), uno de los haplotipos HLA del paciente debe coincidir con el haplotipo HLA homocigótico del donante. Las células pueden administrarse por vía intravenosa.

50 Por ejemplo, las células iPS pueden ser las que tienen un haplotipo HLA coincidente con al menos uno de los haplotipos HLA del sujeto que se va a tratar y se seleccionan de un banco de células iPS en el que las células iPS establecidas a partir de células de donantes con un haplotipo HLA homocigótico se almacenan junto con información relativa al HLA de cada donante.

55 El número de células que se van a administrar no está limitado y puede determinarse basándose en, por ejemplo, la edad, el sexo, la altura y el peso corporal del paciente y la enfermedad y dolencias que se van a tratar. El número óptimo de células puede determinarse a través de estudios clínicos.

Los linfocitos T pueden dirigirse a varios antígenos y, por tanto, el método de esta solicitud puede aplicarse para la inmunoterapia basada en células contra diversas enfermedades que incluyen cánceres, enfermedades infecciosas,
60 enfermedades autoinmunitarias y enfermedades alérgicas. Por ejemplo, una alta proporción de tumores de órganos hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple, y linfoma maligno, así como tumores sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello de útero y cáncer de ovarios que expresa el gen WT1. Por consiguiente, cuando se produjeron células TCR-iPS introduciendo genes TCR específicos de un antígeno WT1 en células iPS y las células LTC, se
65

regeneraron a partir de las células TCR-iPS, las células LTC son eficaces para la inmunoterapia basada en células para cánceres que expresan el gen WT1.

5 En varias terapias propuestas en donde se trasplantan diversas células o tejidos, diferentes de linfocitos T, que se diferencian a partir de células iPS, se espera que las células que se van a trasplantar queden fijadas en el cuerpo del paciente durante toda su vida. En terapias regenerativas que utilizan células o tejidos regenerados a partir de la solución madre de iPS para el trasplante alogénico, los pacientes deben tomar fármacos inmunosupresores durante toda su vida. Este es un punto con desventaja en comparación con el trasplante autólogo. Por otro lado, los linfocitos T regenerados a partir de células TCR-iPS de acuerdo con la presente solicitud, los linfocitos T trasplantados
10 alogénicamente eventualmente se rechazan después de un determinado periodo. Es decir, el injerto alogénico se rechazará eventualmente basándose en las correspondencias incorrectas entre los antígenos de histocompatibilidad menor incluso en caso de coincidencia de HLA entre el donante y el receptor. En este punto, la inmunoterapia basada en células proporcionada por esta solicitud es ventajosa con respecto a otros trasplantes alogénicos de las células o tejidos regenerados a partir de células iPS.

15 Además, el presente método no requiere la preparación de las células para cada paciente. Las células TCR-iPS anteriormente preparadas que tienen la especificidad antigénica deseada, o los precursores de linfocitos T o los linfocitos T maduros regenerados a partir de las células TCR-iPS se pueden almacenar y utilizar. Por consiguiente, este método tiene ventajas no solo para acortar el periodo de la preparación de la inmunoterapia basada en células sino que también permite la verificación de la calidad de las células antes del trasplante.

20 Por ejemplo, se puede proporcionar la preparación de linfocitos T dirigidos a un antígeno canceroso. Los genes que codifican un TCR para el que se ha verificado anteriormente su eficacia y seguridad en la terapia génica del TCR para el cáncer se introducen en, por ejemplo, células iPS establecidas a partir de un donante con un haplotipo HLA homocigótico. Se puede crear un banco de células iPS con dichas células TCR-iPS. Para el tratamiento de un paciente que tiene un haplotipo HLA heterocigótico con un cáncer que expresa un antígeno que será reconocido por el TCR introducido, los linfocitos T pueden rediferenciarse a partir de células TCR-iPS seleccionadas entre el banco de células TCR-iPS y administrarse alogénicamente al paciente. Los precursores de linfocitos T o los linfocitos T pueden regenerarse previamente a partir de las células TCR-iPS y criopreservarse para proporcionar un tratamiento más rápido.

25 Los ejemplos de genes TCR que se pueden usar en el método de esta solicitud pueden incluir genes que codifican un TCR clonado específico de un antígeno WT1 a partir de las células TAK-1 por el Prof. Masaki YASUKAWA de la Ehime University (Blood.95:286.2000; Blood.118:1495.2011). Las células iPS pueden ser las obtenidas entre las almacenadas en el proyecto de almacenamiento de células iPS del Center for iPS cell Research and Application. Se puede usar una línea HPS0077 de células iPS depositada en el RIKEN BioResource Center (RIKEN BRC) como células iPS que tienen un haplotipo HLA más frecuente en Japón en homocigóticos.

40 La solicitud se explicará más detalladamente con los ejemplos que se muestran a continuación.

[Ejemplo 1]

Establecimiento de células iPS en las que se introdujo un TCR específico del antígeno WT1 restringido de tipo I

45 Las células iPS originales usadas aquí eran células LMP2-T-iPS (clon LMP2 n.º 1) preparado en el Department of Immunology, Institute for Frontier Medicinal Sciences, Kyoto University, Kioto, Japón.

50 El TCR específico de WT1 restringido para HLA-A2402 usado aquí se obtuvo de un clon B10, que se clonó en el Laboratory of immunology and hematopoiesis, Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita-shi, Osaka, Japón (Anticancer Research. 32(12):5201-5209.2012). El TCR reconoce el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) en la manera restringida para HLA-A2402.

1) clonación de genes TCR específicos de WT1 mediante amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE)

55 Un clon de LTC específico de WT1 o un clon de LTC inducido a partir de células WT1-T-iPS se amplificó y se obtuvieron los ARN de las células. Se obtuvo el ADNc de longitud completa usando el kit de amplificación del ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) y se usó como molde. Los genes TCR se amplificaron usando un cebador dirigido al extremo 3' de la cadena TCR α : CACAGGCTGTCTTACAATCTTGCGATC (SEQ ID NO: 1) o al extremo 3' de la cadena TCR β : CTCCAATTCCAGGGCTGCCTTCA (SEQ ID NO: 2) o
60 TGACCTGGGATGGTTTTGGAGCTA (SEQ ID NO: 3) para obtener un ADNc WT1-TCR bicatenario. El ADNc bicatenario así obtenido se insertó en el vector pTA2 (TOYOBO, véase la Figura 1) y se introdujo en una línea de células. Se evaluaron las propiedades que incluían la especificidad del WT1 TCR usando las células transfectadas.

2) Preparación de vector lentivírico que incorpora WT1-TCR

65 Se obtuvo el vector CS-UbC-RfA-IRES2-Venus (Figura 2) del Subteam for Manipulation of Cell Fate, RIKEN

BioResource Center, Tsukuba, Ibaraki, Japón. Se incorporó el gen WT-TCR al vector con el sistema Gateway para proporcionar CS-UbC-RfA-IRES2-Venus/WT1-TCR.

3) Preparación del sobrenadante del lentivirus en el que se introdujo WT1-TCR

5 CS-UbC-RfA-IRES2-Venus/WT1-TCR se introdujo en las células de empaquetamiento LentiX-293T con XtreamGENE9 (Roche). El medio se intercambié al siguiente día y en el día 2, se recogió el sobrenadante del cultivo y se usó como sobrenadante lentivírico.

10 4) Establecimiento de células T-iPS transducidas con WT1-TCR

Se trataron células LMP2-T-iPS con TrypLE Select (Life Technologies) para proporcionar una suspensión celular completamente individual. Se centrifugó la suspensión y el aglomerado se dispersó mediante el sobrenadante lentivírico y, a continuación, la suspensión obtenida se centrifugó a 3000 rpm a 32 °C durante una hora para que el lentivirus infecte y, a continuación, se introdujo WT1-TCR en las células LMP2-T-iPS.

15 Tras la infección, las células se suspendieron en medio de células iPS y se sembraron sobre las células alimentadoras. Las células LMP2-T-iPS en las que se introdujo WT1-TCR (células WT1-TCR/IMP2-T-iPS) se seleccionaron fluoroscópicamente sobre la base de la expresión de la proteína Venus incluida en el vector.

20 C. Repicado de colonias de células WT1-TCR/IMP2-T-iPS a partir del cultivo

1. Dos semanas después de la introducción de los factores de Yamanaka, las colonias de células iPS se observaron visualmente.
2. Las colonias se repicaron mecánicamente con una punta de pipeta de 200 µl.
3. Algunos clones se establecieron individualmente.

3) Inducción de linfocitos T a partir de células iPS.

30 Los medios usados son los siguientes:

[Tabla 1]

Medio A: para el mantenimiento de las células OP9 del estroma		
contenido	cantidad añadida	concentración final
medio α MEM	500 ml	
FCS	125 ml	20 %
solución de penicilina-estreptomicina*	6,25 ml	1 %
Total	631,25 ml	
*Mezcla de Penicilina (10.000 U/ml) y Estreptomicina (10.000 µg/ml). Las concentraciones finales fueron 100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente.		

[Tabla 2]

Medio B: para inducir la diferenciación de linfocitos T		
contenido	cantidad añadida	concentración final
medio αMEM	500 ml	
FCS	125 ml	20 %
solución de penicilina-estreptomicina*	5 ml	1 %
hrIL-7 (solución madre: 10 µg/ ml)	315 µl	5 ng/ml
hrFIT-3L (solución madre: 10 µg/ml)	315 µl	5 ng/ml
hrSCF (solución madre: 10 µg/ml)	630 µl	10 ng/ml
Total	631,26 ml	
*Mezcla de Penicilina (10.000 U/ml) y Estreptomicina (10.000 µg/ml). Las concentraciones finales fueron 100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente.		

35

[Tabla 3]

Medio C: para inducción a partir de linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros		
contenido	cantidad añadida	concentración final
medio α MEM	500 ml	
FCS	125 ml	20 %
solución de penicilina-estreptomicina*	5 ml	1 %
hrlL-7 (solución madre: 10 μ g/ ml)	315 μ l	5 ng/ml
Total	630,315 ml	

*Mezcla de Penicilina (1, U/ml) y Estreptomicina (10.000 μ g/ml). Las concentraciones finales fueron 100 U/ml y 100 μ g/ml, respectivamente.

A. Preparación de células OP9

- 5 Se añadieron seis mililitros (6 ml) de solución de gelatina al 0,1 % en PBS a una placa de 10 cm (Falcon) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se retiró la solución de gelatina y se añadieron a la placa 10 ml de medio A. Se obtuvieron células OP9 del estroma a partir de un cultivo confluyente y se sembraron en la placa. Cuatro días después, se añadieron 10 ml de medio A a la placa (la cantidad final fue de 20 ml).

10 B. Inducción de células precursoras hematopoyéticas a partir de células iPS

El medio para cultivo de células OP9 del estroma que se va a usar para el cultivo simultáneo se aspiró y se sustituyó con medio A reciente. El medio en la placa de cultivo de células IPS humanas se aspiró también y se añadieron 10 ml de medio A reciente. La masa de células iPS se cortó con un rodillo de paso EZ. La masa de células iPS cortada se suspendió usando una micropipeta pipetman con una punta de 200 μ l. El número de grupos de células iPS se contó visualmente y se sembraron aproximadamente 600 grupos de células iPS sobre las células OP 9. Se usaron tres o más placas por clon de células iPS humanas y, cuando se subcultivaron, las células de todas las placas combinaron en una sola placa y a continuación se redistribuyeron entre el mismo número de placas para reducir la disparidad entre las placas.

20 Día 1: (se sustituyó el medio)

Se confirmó que la masa de células iPS se adhería la placa y comenzaba a diferenciarse. El medio de cultivo celular se sustituyó con 20 ml de medio A nuevo.

25 Día 5: (se sustituyó la mitad del medio)

Se sustituyó la mitad del medio de cultivo celular con 10 ml de medio A nuevo.

30 Día 9: (se sustituyó la mitad del medio)

Se sustituyó la mitad del medio de cultivo celular con 10 ml de medio A nuevo.

35 Día 13: (Las células mesodérmicas inducidas se transfirieron a partir de una capa de células OP9 sobre una capa de células OP9/DLL1)

El medio de cultivo celular se aspiró para retirarlo y la superficie de las células cultivadas se lavó con HBSS(⁺Mg⁺Ca) para lavar el medio de cultivo celular. Se añadieron 10 ml de una solución de colagenasa IV 250U en HBSS (+Mg+Ca) a la placa y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C.

40 La solución de colagenasa se retiró mediante aspiración y se lavaron las células con 10 ml de PBS(-). A continuación, se añadió una solución de tripsina/EDTA al 0,05 % a la placa y la placa se incubó durante 20 minutos a 37 °C. Tras la incubación, los agregados celulares de tipo lámina se despegaron de la parte inferior de la placa y los agregados celulares se fragmentaron mecánicamente a tamaños más pequeños mediante pipeteo. Las células tratadas de esta manera se añadieron a 20 ml de medio A nuevo y se cultivaron durante más de 45 minutos a 37 °C.

50 El medio de cultivo que contenía las células en flotación se pasó a través de un tamiz de 100 μ m y se recogieron las células. A continuación se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 7 minutos a 4 °C. El aglomerado obtenido se suspendió en 10 ml de medio B. Un décimo de la suspensión se separó y se usó para el análisis FACS. La suspensión celular restante se sembró en placas nuevas que contenían células OP9/DLL1. Las suspensiones celulares obtenidas de varias placas se combinaron y las células combinadas se sembraron en el mismo número de nuevas placas.

Para dilucidar si las células precursoras hematopoyéticas estaban contenidas o no en las células obtenidas, se llevó

a cabo el análisis FACS usando anticuerpo dirigido contra CD34 y anticuerpo dirigido contra CD43. Cuando se pudo confirmar un número suficiente de células en la fracción de células CD34^{low}CD43⁺, se determinó que las células precursoras hematopoyéticas se habían inducido.

5 C. Inducción de linfocitos T a partir de células hematopoyéticas precursoras.

A continuación, las células obtenidas se sembraron sobre células OP9/DLL1. En esta etapa, no se llevó a cabo la clasificación celular de la fracción celular CD34^{low}CD43⁺. Cuando se clasificó esta fracción, la eficacia de la diferenciación de los linfocitos T se pudo reducir en comparación con el caso cuando no se lleva a cabo la clasificación debido a la disminución de las células o al daño de las células por la clasificación.

10 Durante el periodo de cultivo, se llevó a cabo el análisis FACS varias veces para confirmar las etapas de diferenciación. Se observó un número considerable de células muertas durante el periodo de cultivo. Antes del análisis FACS, las células muertas se eliminaron preferentemente usando, por ejemplo, yoduro de propidio (PI) o 7-AAD.

15 Día 16: (Se subcultivaron las células)

20 Las células poco adheridas a las células OP9/DLL1 se disociaron suavemente pipeteando varias veces. Las células se pasaron a través de un tamiz de 100 µm y se recogieron en un tubo cónico de 50 ml. El tubo se centrifugó a 1200 rpm durante 7 minutos a 4 °C. El aglomerado se dispersó en 10 ml de medio B. De esta manera, las células preparadas se sembraron sobre células OP9/DLL1.

25 Día 23: (Se subcultivaron las células) Comenzaron a aparecer colonias de células sanguíneas.

Las células poco adheridas a las células OP9/DLL1 se disociaron suavemente pipeteando varias veces. Las células se pasaron a través de un tamiz de 100 µm y se recogieron en un tubo cónico de 50 ml. El tubo se centrifugó a 1200 rpm durante 7 minutos a 4 °C. El aglomerado se dispersó en 10 ml de medio B. De esta manera, las células preparadas se sembraron sobre células OP9/DLL1.

30 Día 30: (Se subcultivaron las células)

35 Las células poco adheridas a las células OP9/DLL1 se disociaron suavemente pipeteando varias veces. Las células se pasaron a través de un tamiz de 100 µm y se recogieron en un tubo cónico de 50 ml. El tubo se centrifugó a 1200 rpm durante 7 minutos a 4 °C. El aglomerado se dispersó en 10 ml de medio B. De esta manera, las células preparadas se sembraron sobre células OP9/DLL1.

Día 37: Se subcultivaron las células

40 Las células poco adheridas a las células OP9/DLL1 se disociaron suavemente pipeteando varias veces. Las células se pasaron a través de un tamiz de 100 µm y se recogieron en un tubo cónico de 50 ml. El tubo se centrifugó a 1200 rpm durante 7 minutos a 4 °C. El aglomerado se dispersó en 10 ml de medio B. De esta manera, las células preparadas se sembraron sobre células OP9/DLL1.

45 Día 44: Se confirmaron los linfocitos TCD4⁺CD8⁺ y comenzaron a inducirse en células CD8 SP

50 Para confirmar que los linfocitos T se habían inducido correctamente, las células del Día 44 se analizaron mediante FACS con un anticuerpo dirigido contra CD4 y un anticuerpo dirigido contra CD8. Se confirmó la generación de células CD4⁺CD8⁺. A continuación, el anticuerpo dirigido contra CD3/28 y huIL-2 se añadieron a las células. Los linfocitos T que contenían las células CD4⁺CD8⁺ se sembraron sobre la capa de células OP9/DLL1 reciente en cada pocillo de una placa de 24 pocillos a una densidad de 3x10⁵ células/pocillo. Un anticuerpo dirigido contra CD3 (50 ng/ml), un anticuerpo dirigido contra CD28 (2 ng/ml) y huIL-2 (200 U/ml) se añadieron conjuntamente a cada pocillo.

55 Día 50: se observaron células CD4⁺CD8⁺

En el día 6 de la adición del anticuerpo dirigido contra CD3, se generaron células positivas para CD8 únicas maduras. Las células generadas se tiñeron con tetrámero de WT1 y anticuerpo dirigido contra CD3 (Figura 3). Se confirmó la generación de linfocitos T que expresaban el WT1-TCR introducido.

60 **[Ejemplo 2]**

Establecimiento de células iPS con un HLA homocigótico en el que se ha introducido un TCR específico de WT1 restringido de tipo I

65 Se establecieron las células iPS originales a partir de células mononucleares de sangre periférica de un donante sano en el Department of Immunology, Institute for Frontier Medicinal Sciences, Kyoto University, Kioto, Japón. El

clon de células iPS tiene un haplotipo HLA homocigótico de HLA-A*33:03; B*44:03; C*140:3; DRB1*1302.

El TCR específico de WT1 restringido para HLA-A0201 se obtuvo de Opt3E2, que se clonó en el Laboratory of immunology and hematopoiesis, Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita-shi, Osaka, Japón. El TCR reconoce el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 5).

Se llevaron a cabo la preparación del vector y la transfección del mismo a células iPS como se describe en el Ejemplo 1.

1. Se analizó una única suspensión de células de las células iPS transfectadas con los genes mediante citometría de flujo. Se confirmó que los genes que codificaban el TCR específico de WT1 restringido para HLA-A0201 se habían introducido eficazmente en las células iPS (Figura 4).

2. Las células iPS transfectadas con los genes TCR se sembraron sobre la placa y se expandieron clonalmente. La Figura 5 muestra las colonias de las células iPS tras una semana de cultivo. Las colonias de las células iPS en las que se introdujeron los genes se confirmaron como colonias positivas fluorescentes. La Figura 5 confirma que se obtuvo un clon de células iPS que codifica los genes de un TCR específico de WT1 restringido para HLA-A0201. A continuación, se repicó la colonia positiva.

[Ejemplo 3]

Establecimiento de células iPS con un HLA homocigótico en el que se ha introducido un TCR específico de WT1 restringido de tipo 11

Se establecieron las células iPS originales a partir de células mononucleares de sangre periférica de un donante sano en el Department of Immunology, Institute for Frontier Medicinal Sciences, Kyoto University, Kioto, Japón, en el mismo procedimiento en el Ejemplo 2. La línea de células iPS tiene un HLA homocigótico.

Los genes TCR específicos de WT1 restringidos de tipo II se obtuvieron del Clon K y el Clon 10, que se clonaron en el Laboratory of immunology and hematopoiesis, Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita-shi, Osaka, Japón. El Clon K y el Clon 10 están restringidos a HLA-DRB1*0405 y HLA-DPB1*0501, respectivamente y reconocen la secuencia peptídica WT1-332(KRYFKLSHLQMHSRKH(SEQ ID NO: 6)) (Microbiol Immunol 52: 591-600, 2008).

Se llevaron a cabo la preparación del vector y la transfección del mismo en células iPS de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1.

1. Se analizó una única suspensión de células de las células iPS transfectadas con los genes mediante citometría de flujo. En la Figura 6 se muestran los resultados. Se confirmó que los genes TCR específicos de WT1 obtenidos del Clon 10 y del Clon K se habían introducido correctamente en las células iPS.

[Ejemplo 4]

Establecimiento de células iPS con un HLA homocigótico en el que se ha introducido un TCR específico de WT1 restringido de tipo I

Se establecieron las células iPS originales a partir de células mononucleares de sangre periférica de un donante sano en el Department of Immunology, Institute for Frontier Medicinal Sciences, Kyoto University, Kioto, Japón, de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 2. La línea de células iPS tiene un HLA homocigótico.

Se clonaron los genes TCR específicos de WT1 restringidos de Tipo I a partir del Clon WT1 n.º 9 y el Clon WT1 n.º 3-3 en el Department of Immunology, Institute for Frontier Medicinal Sciences, Kyoto University, Kioto, Japón.

Se llevaron a cabo la preparación del vector y la transfección del mismo en células iPS de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1.

2. Se analizó una única suspensión de células de las células iPS transfectadas con los genes mediante citometría de flujo. En la Figura 7 se muestran los resultados. Se confirmó que los genes TCR específicos de WT1 obtenidos del Clon n.º 9 y del Clon n.º 3-3 se habían introducido correctamente en las células iPS.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KAWAMOTO, Hiroshi

<120> MÉTODO PARA PREPARAR CITOBLASTOS PLURIPOTENTES QUE TIENEN UN GEN DEL RECEPTOR DE LINFOCITOS T ESPECÍFICO DE ANTÍGENOS

<130> 672488
 <150> 62/026336
 <151> 18/07/2014
 5 <160> 6
 <170> PatentIn versión 3.5
 10 <210> 1
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de la PCR
 <400> 1
 20 cacaggctgt cttacaatct tgcagatc 28
 <210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador de la PCR
 <400> 2
 30 ctccacttcc agggctgcct tca 23
 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de la PCR
 40 <400> 3
 tgacctggga tggtttggga gcta 24
 <210> 4
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 50 1 5
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 60 1 5
 <210>6
 <211> 16
 <212> PRT

ES 2 793 025 T3

<213> Homo sapiens

<400> 6

5	Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His	Ser	Arg	Lys	His
	1				5					10					15	

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de inducir linfocitos T para una inmunoterapia basada en células, que comprende las etapas de:
- 5 (1) proporcionar citoblastos pluripotentes humanos,
(2) introducir genes que codifican un receptor de linfocitos T específico de un antígeno deseado en los citoblastos pluripotentes humanos, e
10 (3) inducir linfocitos T a partir de citoblastos pluripotentes obtenidos en la etapa (2) en donde los citoblastos pluripotentes son células iPS.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células iPS se establecieron a partir de un donante con un haplotipo HLA homocigótico que coincide con al menos uno de los haplotipos HLA del sujeto que se va a tratar.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el haplotipo HLA homocigótico del donante coincide solamente con uno de los haplotipos HLA del sujeto que se va a tratar.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la inmunoterapia es para el tratamiento de una enfermedad que implica inmunidad tal como un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria y una enfermedad alérgica.
- 20 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la inmunoterapia es para el tratamiento de un cáncer.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el cáncer es un cáncer que expresa un gen WT1.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde los genes que codifican el receptor de linfocitos T específico del antígeno deseado son genes que codifican un receptor de linfocitos T específico de un antígeno WT1.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los genes que codifican el receptor de linfocitos T específico del antígeno deseado son genes que codifican un receptor de linfocitos T específico de WT1 que reconoce un péptido CMTWVQMNL de una manera restringida para HLA-A2402.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los genes que codifican el receptor de linfocitos T específico del antígeno deseado son genes que codifican un receptor de linfocitos T específico de WT1 que reconoce un péptido RMFPNAPYL de una manera restringida para HLA-A0201.
- 40 10. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los genes que codifican el receptor de linfocitos T específico del antígeno deseado son genes que codifican un receptor de linfocitos T específico de WT1 que reconoce un péptido KRYFKLSHLQMHSRKH de una manera restringida para HLA-DRB1*0405 o HLA-DPB1*0501.

Figura 1

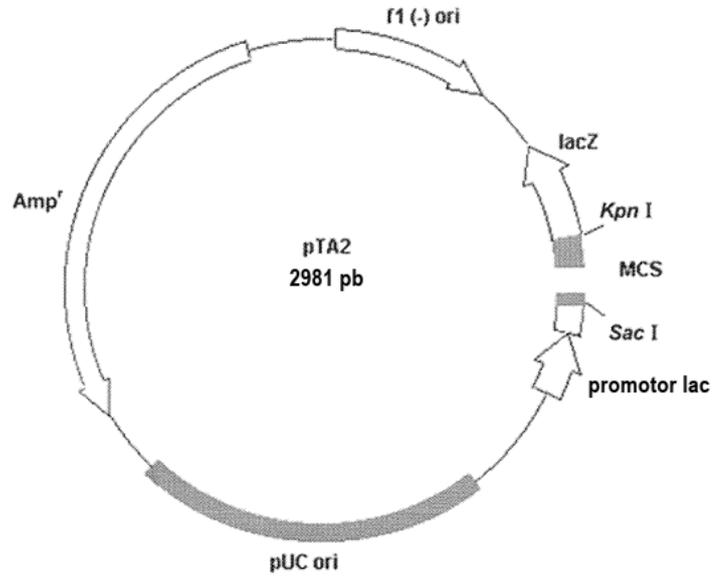
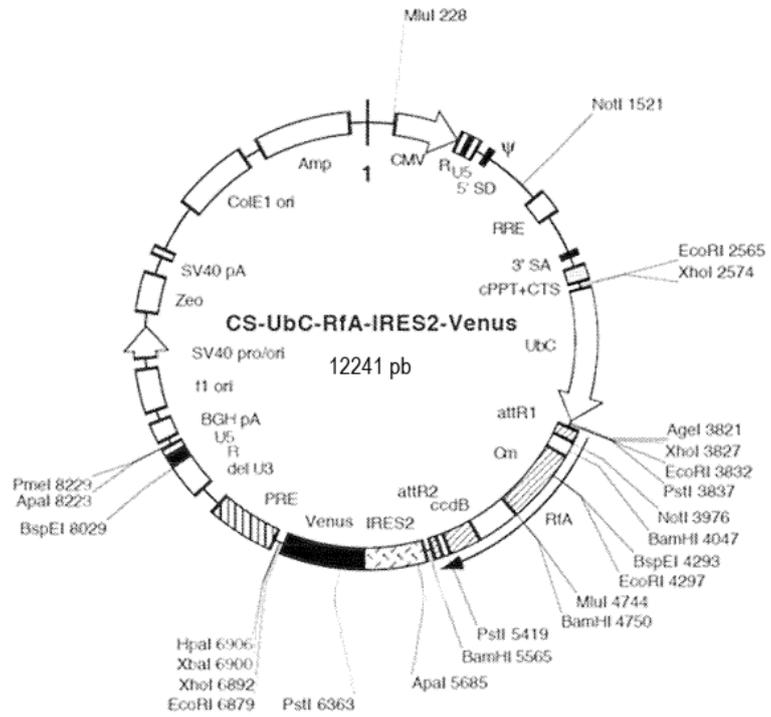


Figura 2



Nombre del plásmido: CS-UbC-RfA-IRES2-Venus
 Tamaño del plásmido: 12.241 pb

Figura 3

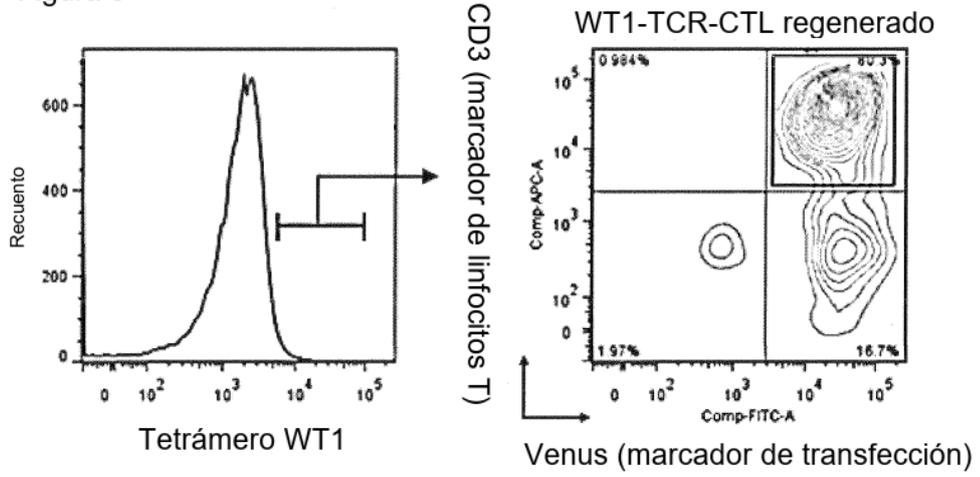


Figura 4

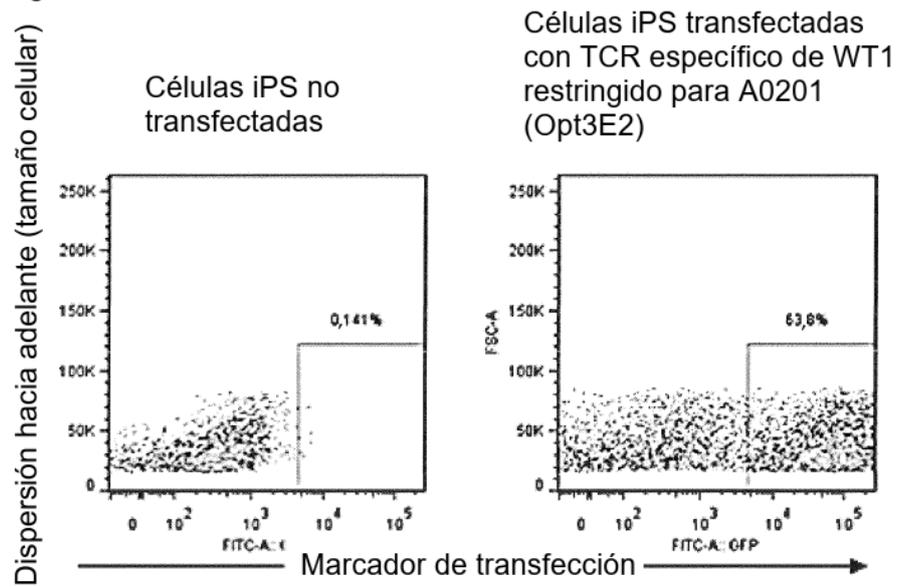


Figura 5

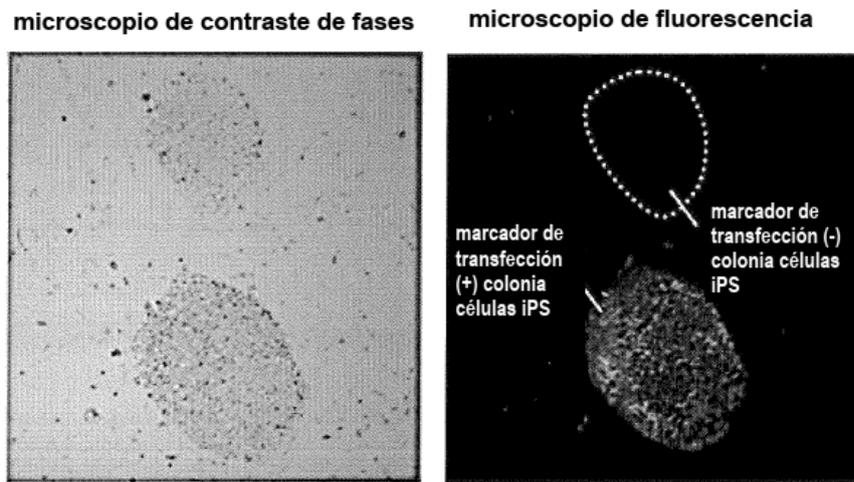


Figura 6

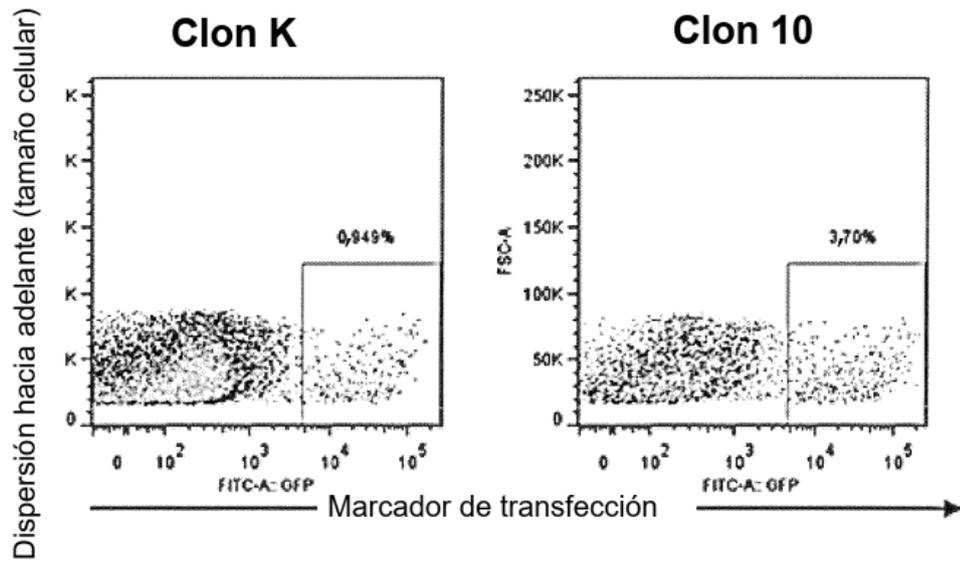


Figura 7

