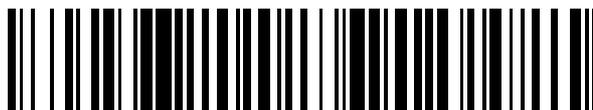


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 411**

51 Int. Cl.:

C12N 5/078 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2009 E 09800871 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2313496**

54 Título: **Células anucleadas diferenciadas y método para preparar las mismas**

30 Prioridad:

21.07.2008 US 82410 P

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

22.12.2014

73 Titular/es:

**TAIGA BIOTECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
12635 East Montview Boulevard
Aurora, CO 80045-7336, US**

72 Inventor/es:

**REFAELI, YOSEF y
TURNER, BRIAN CURTIS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 525 411 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

Células anucleadas diferenciadas y método para preparar las mismas

Antecedentes de la invención

5 Las células anucleadas incluyen, pero no se limitan a, eritrocitos y trombocitos. Los eritrocitos y trombocitos se derivan de la diferenciación de células madre hematopoyéticas.

Sumario de la invención

10 En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un método de preparación de una pluralidad de células anucleadas que comprende: cultivar células madre inmortalizadas condicionalmente en presencia de al menos una citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada; en el que las células madre inmortalizadas condicionalmente se generan mediante: (a) transfección de una pluralidad de células madre con un primer vector que comprende: una secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula de MYC; (b) transfección de las células madre con un segundo vector retroviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para Bcl-2, Bcl-X, o una combinación de los mismos; y (c) cultivo de las células madre con IL-3, IL-6, factor de células madre, trombopoyetina, ligando de Flt3, o una combinación de los mismos; y en el que la actividad de la molécula de Myc se ha suprimido antes de la diferenciación. En algunas realizaciones, la citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada es IL-3, EPO, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la molécula de MYC es c-Myc, 1-Myc, n-Myc, s-Myc, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el primer vector comprende además el dominio de unión a hormonas del receptor de estrógenos humano. En algunas realizaciones, el método comprende además inducir la traslocación de la molécula de Myc a un núcleo. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la pluralidad de células madre con: estradiol (E2), 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), o ambos. En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son el virus de células madre murinas (MSCV), o un derivado del mismo. En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son MSCV-(IRES)-GFP, o un derivado del mismo. En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son MSCV-(IRES)-GFP, y comprende además el elemento regulador de ARN del virus de la hepatitis B de la marmota (WRE).

30 En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un método de producción de una pluralidad de células anucleadas, que comprende: cultivar células madre inmortalizadas condicionalmente en presencia de al menos una citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada; en el que las células madre inmortalizadas condicionalmente se generan mediante: (a) puesta en contacto de una pluralidad de células madre con un primer péptido sintetizado de manera exógena que comprende: una molécula de MYC que se trasloca a un núcleo; (b) puesta en contacto de las células madre con un segundo péptido sintetizado de manera exógena que comprende: Bcl-2, BCL-X, o una combinación de los mismos; y (c) cultivo de las células madre con IL-3, IL-6, factor de células madre, trombopoyetina, ligando de Flt3, o una combinación de los mismos; y en el que el primer péptido se elimina del contacto con las células madre inmortalizadas condicionalmente antes de la diferenciación. En algunas realizaciones, el primer péptido comprende además el dominio de unión a hormonas del receptor de estrógenos humano. En algunas realizaciones, el primer péptido, el segundo péptido, o tanto el primer péptido como el segundo péptido comprenden una secuencia transportadora. En algunas realizaciones, la primera proteína, la segunda proteína, o tanto la primera proteína como la segunda proteína comprenden una secuencia TAT. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la pluralidad de células madre con: estradiol (E2), 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), o ambos.

45 En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un método de preparación de una pluralidad de células anucleadas, que comprende: (a) transfectar una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula de MYC; (b) transfectar la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con un segundo vector gamma-retroviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para Bcl-2, Bcl-X, o una combinación de los mismos; (c) cultivar la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con IL-3, IL-6, factor de células madre, trombopoyetina, ligando de Flt3, o una combinación de los mismos; (d) suprimir la actividad de la molécula de Myc; y (e) cultivar las células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) en presencia de al menos una citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada. En algunas realizaciones, la citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada es IL-3, EPO, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la molécula de MYC es c-Myc, 1-Myc, n-Myc, s-Myc, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el primer vector comprende además el dominio de unión a hormonas del receptor de estrógenos humano. En algunas realizaciones, el método comprende además inducir la traslocación de la molécula de Myc a un núcleo. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con: estradiol (E2), 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), o ambos. En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son el virus de células madre murinas (MSCV), o un derivado del mismo. En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son MSCV-(IRES)-GFP, o un derivado del mismo.

En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son MSCV-(IRES)-GFP, y comprenden además el elemento regulador de ARN del virus de la hepatitis B de la marmota (WRE).

5 En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un método de producción de una pluralidad de células anucleadas (por ejemplo, células madre hematopoyéticas), que comprende: (a) poner en contacto una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con: (i) un primer péptido sintetizado de manera exógena que comprende: una molécula de MYC que se trasloca a un núcleo; y (ii) un segundo péptido sintetizado de manera exógena que comprende: Bcl-2, BCL-X, o una combinación de los mismos; (b) cultivar la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con IL-3, IL-6, factor de células madre, trombopoyetina, ligando de Flt3, o una combinación de los mismos; (c) eliminar el primer péptido; y (d) cultivar las células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) en presencia de al menos una citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada. En algunas realizaciones, el primer péptido comprende además el dominio de unión a hormonas del receptor de estrógenos humano. En algunas realizaciones, el primer péptido, el segundo péptido, o tanto el primer péptido como el segundo péptido comprenden una secuencia transportadora. En algunas realizaciones, la primera proteína, la segunda proteína, o tanto la primera proteína como la segunda proteína comprenden una secuencia TAT. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con: estradiol (E2), 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), o ambos.

20 En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un trombocito preparado según un método dado a conocer en el presente documento.

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un eritrocito preparado según un método dado a conocer en el presente documento.

25 En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un método de tratamiento de un trastorno caracterizado por una deficiencia de células anucleadas, que comprende: administrar una célula anucleada preparada según un método dado a conocer en el presente documento. En algunas realizaciones, el trastorno es una anemia (por ejemplo, anemia aplásica, anemia perniciosa, anemia por deficiencia de hierro, anemia de células falciformes, esferocitosis, anemia hemolítica), enfermedad de Gaucher, hemólisis, neutropenia, trombocitopenia, granulocitopenia, hemofilia, linfoma Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma crónico de células B, linfoma de Burkitt, linfoma de tipo folicular, linfoma difuso de células B grandes, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda de células pre-B, leucemia linfocítica aguda de células pre-T, leucemia promielocítica aguda, leucemia que no responde al tratamiento, o combinaciones de los mismos. En determinados casos, el trastorno caracterizado por una deficiencia en células anucleadas resulta (parcial o completamente) de quimioterapia. En algunas realizaciones, una célula anucleada producida mediante un método dado a conocer en el presente documento se administra conjuntamente con quimioterapia.

35 **Breve descripción de los dibujos**

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención mediante la referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención y los dibujos adjuntos de los cuales:

40 La figura 1 ilustra un enfoque para la generación de una línea de células madre hematopoyéticas cttf. La figura 1A muestra una representación esquemática de constructos retrovirales usados para transducir células HSC murinas primarias con Myc-ER y Bcl-2. La figura 1B muestra análisis de FACS de HSC obtenidas de donantes tratados con 5-fluorouracilo tras la transducción. La figura 1C muestra la cinética de leucemogénesis en ratones con trasplante de las HSC transducidas. La figura 1D muestra análisis de FACS de células madre hematopoyéticas cttf poco tiempo tras la recuperación a partir de la médula ósea de ratones leucémicos. La figura 1E muestra análisis de FACS de una línea de células madre hematopoyéticas cttf que se ha establecido. La figura 1F muestra análisis de FACS de marcadores de célula madre en células madre hematopoyéticas normales, sin manipular, a partir de la médula ósea de ratones C57/BL6.

50 La figura 2 ilustra el análisis de la capacidad de clonación de líneas de células madre hematopoyéticas cttf mediante amplificación por PCR de inserciones retrovirales.

La figura 3 ilustra características de células inmunitarias maduras que surgen tras el trasplante de células madre hematopoyéticas cttf. La figura 3A muestra la frecuencia de células derivadas de células madre hematopoyéticas cttf en tejidos linfáticos tras el trasplante. La figura 3B muestra detección de células de linaje mieloide GFP+ en la médula ósea. La figura 3C muestra el análisis de linfocitos maduros en el bazo. La figura 3D muestra el análisis de linfocitos maduros en ratones receptores de trasplante tras el segundo pase en serie de células madre hematopoyéticas cttf.

La figura 4 ilustra un rescate a largo plazo de irradiación mortal mediante células madre hematopoyéticas cttf.

La figura 5 ilustra la diferenciación de células madre hematopoyéticas cttf en progenitores eritroides que expresan Ter-119 *in vitro*.

La figura 6 ilustra una vista de la reconstitución de eritrocitos *in vivo* tras irradiación mortal mediante trasplante de células madre hematopoyéticas cttf.

- 5 La figura 7 ilustra una vista de la reconstitución de eritrocitos *in vivo* tras irradiación mortal mediante trasplante de células madre hematopoyéticas cttf

La figura 8 ilustra una vista de la reconstitución de eritrocitos *in vivo* tras irradiación mortal mediante trasplante de células madre hematopoyéticas cttf.

Descripción detallada de la invención

- 10 En el presente documento se dan a conocer métodos para preparar una pluralidad de células anucleadas, las células anucleadas resultantes y métodos para almacenar y usar tales células anucleadas. En particular, tales células anucleadas se producen *ex vivo* a partir de células madre que están modificadas con genes y/o proteínas apropiados (colectivamente, una célula madre modificada por ingeniería). Tales células madre modificadas por ingeniería son células madre nucleadas y además están inmortalizadas condicionalmente. Tales células madre
15 nucleadas, modificadas por ingeniería proporcionan células anucleadas provocando que las células pierdan la inmortalización condicional y se diferencien según sea apropiado.

- En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un método de preparación de una pluralidad de células anucleadas que comprende: cultivar células madre inmortalizadas condicionalmente en presencia de al menos una citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada; en el que las células
20 madre inmortalizadas condicionalmente se generan mediante: (a) transfección de una pluralidad de células madre con un primer vector que comprende: una secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula de MYC; (b) transfección de las células madre con un segundo vector retroviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para Bcl-2, Bcl-X, o una combinación de los mismos; y (c) cultivo de las células madre con IL-3, IL-6, factor de células madre, trombopoyetina, ligando de Flt3, o una combinación de los mismos; y en el que la actividad
25 de la molécula de Myc se ha suprimido antes de la diferenciación. En algunas realizaciones, la citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada es IL-3, EPO, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la molécula de MYC es c-Myc, 1-Myc, n-Myc, s-Myc, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el primer vector comprende además el dominio de unión a hormonas del receptor de estrógenos humano. En algunas realizaciones, el método comprende además inducir la traslocación de la molécula de Myc a un núcleo. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la pluralidad de células madre con: estradiol (E2), 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), o ambos. En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son el virus de células madre murinas (MSCV), o un derivado del mismo. En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son MSCV-(IRES)-GFP, o un derivado del mismo. En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son MSCV-(IRES)-GFP, y comprenden además el elemento regulador de ARN del virus de la hepatitis B de la marmota (WRE).
30
35

- En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un método de producción de una pluralidad de células anucleadas, que comprende: cultivar células madre inmortalizadas condicionalmente en presencia de al menos una citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada; en el que las células
40 madre inmortalizadas condicionalmente se generan mediante: (a) puesta en contacto de una pluralidad de células madre con un primer péptido sintetizado de manera exógena que comprende: una molécula de MYC que se trasloca a un núcleo; (b) puesta en contacto de las células madre con un segundo péptido sintetizado de manera exógena que comprende: Bcl-2, BCL-X, o una combinación de los mismos; y (c) cultivo de las células madre con IL-3, IL-6, factor de células madre, trombopoyetina, ligando de Flt3, o una combinación de los mismos; y en el que el primer péptido se elimina del contacto con las células madre inmortalizadas condicionalmente antes de la diferenciación. En algunas realizaciones, el primer péptido comprende además el dominio de unión a hormonas del receptor de estrógenos humano. En algunas realizaciones, el primer péptido, el segundo péptido, o tanto el primer péptido como el segundo péptido comprenden una secuencia transportadora. En algunas realizaciones, la primera proteína, la segunda proteína, o tanto la primera proteína como la segunda proteína comprenden una secuencia TAT. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la pluralidad de células madre con: estradiol (E2), 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), o ambos.
45
50

- En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un método de preparación de una pluralidad de células anucleadas, que comprende: (a) transfectar una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con un primer vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula de MYC; (b) transfectar la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con un segundo vector gamma-retroviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para Bcl-2, Bcl-X, o una combinación de los mismos; (c) cultivar la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con IL-3, IL-6, factor de células madre, trombopoyetina, ligando de Flt3, o una combinación de los mismos; (d) suprimir la actividad de la molécula de Myc; y (c) cultivar las células madre
55

5 inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) en presencia de al menos una citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada. En algunas realizaciones, la citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada es IL-3, EPO, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la molécula de MYC es c-Myc, 1-Myc, n-Myc, s-Myc, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el primer vector comprende además el dominio de unión a hormonas del receptor de estrógenos humano. En algunas realizaciones, el método comprende además inducir la traslocación de la molécula de Myc a un núcleo. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con: estradiol (E2), 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), o ambos. En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son el virus de células madre murinas (MSCV), o un derivado del mismo. En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son MSCV-(IRES)-GFP, o un derivado del mismo. En algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son MSCV-(IRES)-GFP, y comprenden además el elemento regulador de ARN del virus de la hepatitis B de la marmota (WRE).

15 En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un método de producción de una pluralidad de células anucleadas (por ejemplo, células madre hematopoyéticas), que comprende: (a) poner en contacto una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con: (i) un primer péptido sintetizado de manera exógena que comprende: una molécula de MYC que se trasloca a un núcleo; y (ii) un segundo péptido sintetizado de manera exógena que comprende: Bcl-2, BCL-X, o una combinación de los mismos; 20 (b) cultivar la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con IL-3, IL-6, factor de células madre, trombopoyetina, ligando de Flt3, o una combinación de los mismos; (c) eliminar el primer péptido; y (d) cultivar las células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) en presencia de al menos una citocina que dirige la diferenciación hacia una célula anucleada. En algunas realizaciones, el primer péptido comprende además el dominio de unión a hormonas del receptor de estrógenos humano. En algunas realizaciones, el primer péptido, el segundo péptido, o tanto el primer péptido como el segundo péptido comprenden una secuencia transportadora. En algunas realizaciones, la primera proteína, la segunda proteína, o tanto la primera proteína como la segunda proteína comprenden una secuencia TAT. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con: estradiol (E2), 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), o ambos.

30 En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un trombocito preparado según un método dado a conocer en el presente documento.

En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un eritrocito preparado según un método dado a conocer en el presente documento.

35 En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un método de tratamiento de un trastorno caracterizado por una deficiencia de células anucleadas, que comprende: administrar una célula anucleada preparada según un método dado a conocer en el presente documento.

En determinadas realizaciones en el presente documento se proporciona un método para producir una pluralidad de células diferenciadas. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método para producir una pluralidad de células anucleadas, que comprende:

40 (a). proporcionar una célula madre inmortalizada; y

(b). inducir la diferenciación de la células madre inmortalizadas para dar la célula de un tipo seleccionado.

Definiciones generales

45 Cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento que se usa en la práctica de o en las pruebas de las realizaciones descritas en el presente documento se considera que son parte de la presente descripción.

50 Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una", "uno" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto diste claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un ácido nucleico" incluye uno o más ácidos nucleicos, y/o composiciones del tipo descrito en el presente documento que resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras leer esta descripción etc. Cualquier referencia a "o" en el presente documento pretende abarcar "y/o" a menos que se indique lo contrario.

55 Tal como se usa en el presente documento, "células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas)" se refiere al término tal como se entiende generalmente en la técnica. Por ejemplo, células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas), independientemente de su procedencia, son células que pueden dividirse y renovarse ellas mismas durante periodos largos, no están especializadas (no diferenciadas) y presentan la capacidad de dar lugar a (diferenciarse en) tipos de células especializadas (es decir, son células progenitoras o precursoras de una variedad de tipos de células especializadas, diferentes). En determinados casos en el presente documento, "células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas)" descritas en el presente documento se refieren a células madre a

largo plazo (por ejemplo, células madre hematopoyéticas).

“Largo plazo”, cuando se usa en relación con células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas), se refiere a la capacidad de las células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) para renovarse ellas mismas dividiéndose para dar el mismo tipo de célula no especializada durante periodos largos (por ejemplo, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 9 meses, 12 meses, 2 años, 3 años) dependiendo del tipo específico de célula madre. En determinados casos, las células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se identifican por la presencia de los siguientes marcadores de superficie celular: c-kit⁺, Sca-1⁺, CD34^{low/-}, CD38⁺ y/o Thy1^{+/low}. En algunos casos, las células madre humanas (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se identifican por la presencia de los siguientes marcadores: CD34⁺, CD38^{low/-}, c-kit^{low} y/o Thy1⁺. En determinados casos, las células madre tanto humanas como murinas (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) carecen de marcadores de linaje celular, tales como CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, Ter-119 y/o Gr-1.

Un “agente de inmortalización” tal como se usa en el presente documento se refiere a un agente que induce, promueve o permite viabilidad celular, supervivencia celular y/o proliferación celular. Un “agente de inmortalización” se refiere a cualquier agente adecuado que induce, promueve o permite viabilidad celular, supervivencia celular y/o proliferación celular. El término abarca todos los compuestos químicos que inducen viabilidad celular, supervivencia celular y/o proliferación celular, tales como moléculas orgánicas e inorgánicas, incluyendo ADN, ARN, polipéptidos, hidratos de carbono, lípidos y moléculas orgánicas pequeñas.

Un “agente activado condicionalmente que induce inmortalidad” se refiere a un agente que induce viabilidad celular, supervivencia celular y/o proliferación celular, cuya función se induce o inicia según sea necesario. Por ejemplo, en el caso de polipéptidos, la activación condicional se produce mediante la activación, por ejemplo, expresión, transcripción o traducción de un gen que codifica para el polipéptido. En otros casos, la función de un polipéptido activado condicionalmente se induce añadiendo un ligando a un receptor en el polipéptido, por ejemplo, exponiendo un polipéptido que comprende ER a estrógenos o un polipéptido que comprende GR a mifepristona.

El término “oncopéptido” y “oncoproteína” se utilizan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un polímero de residuos de aminoácido, fragmentos o análogos del mismo que se codifican mediante oncogenes o protooncogenes. En determinados casos, los oncopéptidos inducen viabilidad celular, supervivencia celular y/o proliferación celular. La descripción de determinadas realizaciones en el presente documento se refiere a “oncopéptidos”. Debe entenderse que en algunas realizaciones, tales descripciones incluyen una descripción del uso de cualquier polipéptido que induce viabilidad, supervivencia y/o proliferación de células madre.

“Un inhibidor de un antagonista endógeno de un agente de inmortalización” se refiere a un agente que induce inmortalidad celular reduciendo, disminuyendo o impidiendo la actividad, la concentración o la expresión de un agente endógeno que antagoniza un agente de inmortalización. Por ejemplo, determinados represores de la transcripción endógenos suprimen la expresión de polipéptidos que funcionan induciendo viabilidad celular, supervivencia celular y/o proliferación celular. Un ejemplo específico es la familia MAD de represores de la transcripción, por ejemplo, MAD-1, que antagoniza la familia Myc de oncogenes. Por tanto, un inhibidor de un represor de la transcripción endógeno, por ejemplo, MAD-1, funciona induciendo inmortalidad celular mediante reduciendo, disminuyendo o impidiendo la actividad, la concentración o el nivel del represor de la transcripción.

En otras realizaciones, por ejemplo, un inductor de inmortalidad celular es una cinasa dependiente de ciclina. Los inhibidores de cinasa dependiente de ciclina endógenos, por ejemplo, p16, p19, p21 y p27, funcionan antagonizando la estimulación de inmortalidad celular por las cinasas dependientes de ciclina. Por tanto, en algunas realizaciones, “un inhibidor de un antagonista endógeno de un inductor de inmortalidad celular” es un agente que reduce, disminuye o impide la actividad, la concentración o el nivel de los inhibidores cinasa dependiente de ciclina en relación con una célula madre silvestre del mismo tipo.

De manera similar, un “inhibidor de polipéptidos pro-apoptóticos” funciona induciendo inmortalidad celular reduciendo, disminuyendo o impidiendo la actividad, la concentración o el nivel de polipéptidos, por ejemplo, polipéptidos endógenos, que son pro-apoptóticos. Los “inhibidores de polipéptidos pro-apoptóticos” reducen, disminuyen o impiden la actividad, la concentración o el nivel de polipéptidos pro-apoptóticos mediante cualquier medio adecuado, incluyendo inhibir la expresión, transcripción o traducción de los polipéptidos, o actuar directamente sobre los polipéptidos, por ejemplo, uniéndose a los polipéptidos, desnaturalizando los polipéptidos, ocupando el sitio activo de los polipéptidos o bloqueando la interacción de los polipéptidos con sus dianas.

En determinadas realizaciones, los homólogos, análogos o fragmentos de polipéptidos que inducen inmortalidad descritos en el presente documento incluyen una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos del 40% al 100%, por ejemplo, idéntica en al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o cualquier otro porcentaje desde aproximadamente el 40% hasta aproximadamente el 100% al polipéptido que induce inmortalidad.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “Myc”, “cMyc”, “proteína Myc” y “polipéptido Myc” se usan de manera intercambiable y se refieren en determinados casos al número de registro de NCBI, NP002458.2,

homólogos, análogos o fragmentos funcionales del mismo. En algunas realizaciones, los sinónimos de Myc incluyen, pero no se limitan a c-Myc, v-Myc, proteína protooncogénica Myc y factor de transcripción p64. En algunas realizaciones, un polipéptido Myc comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos del 40% al 100%, por ejemplo, idéntica en al menos el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o cualquier otro porcentaje desde aproximadamente el 40% hasta aproximadamente el 100% a la secuencia de número de registro de NCBI, NP002458.2. En algunas realizaciones, un polipéptido Myc comprende una secuencia de polipéptido de 40 aminoácidos o más de longitud que es idéntica en al menos del 50% al 100%, por ejemplo, idéntica en al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o cualquier otro porcentaje desde aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 100% a la secuencia de número de registro de NCBI, NP002458.2. En algunas realizaciones, un polipéptido Myc comprende una secuencia de polipéptido de 40 aminoácidos o más de longitud que es idéntica en al menos del 50% al 100%, por ejemplo, idéntica en al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o cualquier otro porcentaje desde aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 100% a la secuencia de número de registro de NCBI, NP002458.2 en el que el polipéptido Myc induce viabilidad celular, inmortalidad celular, crecimiento celular y/o proliferación celular.

Para determinar el porcentaje de homología de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, se introducen huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Entonces pueden compararse los residuos de aminoácido o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de homología entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En algunas realizaciones, las dos secuencias tienen la misma longitud.

Para determinar el porcentaje de homología entre dos secuencias, se usa el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc Natl Acad Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc Natl Acad Sci. USA 90:5873-5877. Un algoritmo de este tipo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Se realizan búsquedas de nucleótido mediante BLAST con el programa NBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico descritas o dadas a conocer en el presente documento. Se realizan búsquedas de proteína mediante BLAST con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra= 3. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, se utiliza Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase el sitio web de National Center for Biotechnology Information para más detalles (en la web en ncbi.nlm.nih.gov). Las proteínas adecuadas para su uso en los métodos descritos en el presente documento también incluyen proteínas que tienen entre 1 y 15 cambios de aminoácido, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido, en comparación con la secuencia de aminoácidos de cualquier proteína descrita en el presente documento. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos alterada es idéntica en al menos al 75%, por ejemplo, idéntica en el 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% a la secuencia de aminoácidos de cualquier inhibidor de proteína descrito en el presente documento. Tales proteínas de secuencia variante son adecuadas para los métodos descritos en el presente documento siempre que la secuencia de aminoácidos alterada mantenga suficiente actividad biológica para ser funcional en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento. En determinados casos, se utilizan sustituciones de aminoácido conservativas. Las sustituciones conservativas ilustrativas entre aminoácidos están dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparagina, y (6) lisina, arginina e histidina. La mesa BLOSUM62 es una matriz de sustituciones de aminoácidos derivada de aproximadamente 2.000 alineaciones múltiples locales de segmentos de la secuencia de proteína, que representa regiones altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff *et al.* (1992), Proc. Natl Acad. Sci. USA, 89:10915-10919). Se usan las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 para definir sustituciones de aminoácido conservativas que, en algunas realizaciones, se introducen en las secuencias de aminoácidos descritas o dadas a conocer en el presente documento. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácido basándose únicamente en las propiedades químicas (tal como se mencionó anteriormente), la expresión "sustitución de aminoácido conservativa" preferiblemente se refiere a una sustitución representada por un valor de BLOSUM62 de más de -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácido es conservativa si la sustitución está caracterizada por un valor de BLOSUM62 de 0, 1, 2 ó 3. Según este sistema, las sustituciones de aminoácido conservativas preferidas están caracterizadas por un valor de BLOSUM62 de al menos 1 (por ejemplo, 1, 2 ó 3), mientras que las sustituciones de aminoácido conservativas más preferidas están caracterizadas por un valor de BLOSUM62 de al menos 2 (por ejemplo, 2 ó 3).

Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" se refiere a un ácido nucleico que está modificado por ingeniería mediante la combinación o inserción de uno o más ácidos nucleicos, combinando de ese

modo secuencias que normalmente se producirían juntas en la naturaleza. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden inductores o potenciadores. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden sitios de enzimas de restricción. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos codifican para polipéptidos. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden mutaciones.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” se refiere a un polipéptido que se produce a partir de un ácido nucleico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “polipéptido Myc” comprende un polipéptido Myc que se produce a partir de un ácido nucleico.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “transgén” se refiere a la integración de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido en el ADN genómico de un animal, bacteria, virus o célula.

Tal como se usa en el presente documento, el término “TRE” se refiere a un elemento de respuesta a tetraciclina.

15 Tal como se usa en el presente documento, “sobreexpresión”, se refiere a un nivel de expresión superior en comparación con el nivel de expresión endógeno de una proteína o un polipéptido idéntico dentro de la misma célula. En determinados casos, “sobreexpresión” se refiere a expresión de un polipéptido. En algunas realizaciones, un nivel de expresión superior comprende del 2% al 200% superior. En algunas realizaciones, un nivel de expresión superior comprende de 2 veces a 1000 veces superior. En algunas realizaciones, un nivel de expresión superior comprende de 2 veces a 10.000 veces superior. En algunas realizaciones, un nivel de expresión superior comprende de expresión detectable en comparación con un nivel de expresión anterior indetectable. En algunas realizaciones, “sobreexpresión” se refiere a cualquier nivel de expresión detectable de una proteína o un polipéptido exógeno.

20 Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácido que se producen de manera natural así como a polímeros de aminoácido en los que uno o más residuos de aminoácido es un aminoácido que no se produce de manera natural, por ejemplo, un análogo de aminoácido. Tal como se usa en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácido de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en las que los residuos de aminoácido están unidos mediante enlaces peptídicos covalentes.

I. Células inmortalizadas

Células madre

30 Las células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) que van a inmortalizarse o inmortalizarse condicionalmente se obtienen de cualquier fuente adecuada. En determinadas realizaciones, las células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) utilizadas son de un animal, por ejemplo, un ser humano, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pollo, mono, rata, ratón, o similares. En algunas realizaciones, una célula madre se obtiene de la médula ósea, sangre periférica, cordón umbilical o tejido fetal de un individuo o se consigue de una fuente que obtuvo una célula madre de la médula ósea, sangre periférica, cordón umbilical o tejido fetal de un individuo.

35 En determinadas realizaciones, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se recogen de un cordón umbilical o una placenta de ser humano. Otra fuente de una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) son los tejidos productores de sangre en desarrollo de animales fetales. En los seres humanos, se encuentra la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) en la sangre circulante de un feto humano aproximadamente hacia las 12 a 18 semanas. En algunas realizaciones, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se obtienen de cualquier fuente, por ejemplo, la médula ósea, cordón umbilical, sangre periférica o tejido fetal de sangre, de donantes de tipo A+, A-, B+, B-, O+, O-, AB+ y AB-. En algunas realizaciones, una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se obtienen anestesiando al donante de células madre, pinchando la cresta ilíaca superior posterior con una aguja y realizando aspiración de las células de la médula ósea con una jeringa.

40 Etapas adicionales implicadas en el procesamiento de las células de médula restantes comprende la recogida de células mediante centrifugación, resuspensión de células en medio de cultivo o un tampón adecuado para el procesamiento posterior. En algunas realizaciones, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se recogen a partir de sangre circulante. En algunas realizaciones, se induce a una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) en la médula ósea a migrar desde la médula a la sangre circulante en mayores números inyectando al donante de células madre una citocina, tal como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

45 En determinados aspectos descritos en el presente documento, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se obtienen de grupos sanguíneos o complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o fuentes de apareamiento de antígeno leucocitario humano (HLA) diferentes. En algunas realizaciones, la extracción a partir de sangre periférica comprende la inyección de factor estimulante de granulocitos (G-CSF) algunos días

antes de la recogida de células. En algunas realizaciones, obtener una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) comprende extraer una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) a partir de la médula ósea que comprende la inyección de 5-fluorouracilo (5-FU) con el fin de enriquecer una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) induciendo la proliferación de estas células.

Opcionalmente, se utiliza cualquier método de identificación adecuado para identificar una célula madre obtenida de un donante. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la identificación de una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) comprende usar marcadores de superficie celular asociados con una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) o específicamente asociados con células del sistema terminalmente diferenciadas. En una realización, los marcadores incluyen uno o más de c-kit, Sca-1, CD34, CD38, Thy1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD43, CD45, CD59, CD90, CD105, CD133, ABCG2, NK1.1, B220, Ter-119, Flk-2, CD34, CD38, Thy1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, Ter-119 y Gr-1 con perlas magnéticas. En otra realización, los marcadores incluyen uno o más de CD 150, CD244 o CD46.

Una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) obtenidas de un donante se separan de otras células de cualquier manera adecuada tal como, a modo de ejemplo no limitativo, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o clasificación celular activada por campo magnético (MACS).

En un ejemplo no limitativo, se incuban células de médula ósea murinas con anticuerpos que reconocen moléculas de la superficie celular tales como una o más de c-kit, Sca-1, CD34, CD38, Thy1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD43, CD45, CD59, CD90, CD105, CD133, ABCG2, NK1.1, B220, Ter-119, Flk-2, CD34, CD38, Thy1, con materiales fluorescentes. Las células que son c-kit⁺, Sca-1⁺, CD34^{low/-}, CD38⁺, Thy1^{+/low} se separan del resto de la muestra en virtud de los tipos de anticuerpos fluorescentes asociados con las células. Estas células se proporcionan como células madre a largo plazo murinas (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) para su uso en métodos adicionales tal como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, se usan conjuntos de marcadores diferentes para separar las células madre a largo plazo murinas (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) de células de médula ósea, sangre de cordón umbilical, tejido fetal y sangre periférica.

En otro ejemplo no limitativo, se incuban células de sangre periférica humanas con anticuerpos que reconocen c-kit, Sca-1, CD34, CD38, Thy1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD43, CD45, CD59, CD90, CD105, CD133, ABCG2, NK1.1, B220, Ter-119, Flk-2, CD34, CD38, Thy1, con materiales fluorescentes conocidos en la técnica. Las células que son CD34⁺, CD38^{low/-}, c-kit^{low}, Thy1⁺ se separan del resto de la muestra en virtud de los tipos de anticuerpos fluorescentes asociados con las células. Estas células se proporcionan como células madre a largo plazo humanas (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) para su uso en métodos adicionales dados a conocer en el presente documento.

Aún en otro ejemplo no limitativo, se marcan células obtenidas de un sujeto con el mismo conjunto de anticuerpos conjugados con las perlas magnéticas (anticuerpos contra uno o más de CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, Ter-119 o Gr-1) y anticuerpos frente a CD150, CD244 y/o CD48 conjugados fluorescentes. Tras retirar las células capturadas por los anticuerpos conjugados con las perlas magnéticas de la muestra, se analiza la muestra mediante FACS y se retienen células CD150+, CD244- y CD48- como células madre a largo plazo (por ejemplo, células madre hematopoyéticas).

En algunas realizaciones, una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre o inmortalizadas) utilizadas en cualquier método descrito en el presente documento comprenden uno o más de los marcadores: c-kit⁺, Sca-1⁺, CD34^{low/-}, CD38⁺, Ethyl^{+/low}, CD34⁺, CD38^{low/-}, c-kit^{+/low} y/o Thy1⁺. En algunas realizaciones, las células madre (por ejemplo, células madre o inmortalizadas) utilizadas en cualquier método descrito en el presente documento carecen de uno o más de los marcadores: CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, Ter-119 y/o Gr-1. En determinadas realizaciones, las células madre (por ejemplo, células madre o inmortalizadas) utilizadas en cualquier método descrito en el presente documento son de un tipo A+, A-, B+, B-, O+, O-, AB+ o AB-.

En algunas realizaciones, proporcionar una célula madre inmortalizada incluye proporcionar al menos una célula madre o inmortalizada. En determinadas realizaciones, proporcionar al menos una célula madre inmortalizada incluye proporcionar una pluralidad de células madre o inmortalizadas (por ejemplo, células madre hematopoyéticas). En algunas realizaciones, proporcionar una célula madre inmortalizada comprende producir una célula madre o inmortalizada. En realizaciones específicas, proporcionar una célula madre inmortalizada comprende producir una pluralidad de células madre o inmortalizadas (por ejemplo, células madre hematopoyéticas). En otras

realizaciones, la/las célula(s) madre o inmortalizada(s) se proporcionan consiguiéndolas de cualquier fuente.

Inmortalización

5 En determinadas realizaciones, las células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se mantienen continuamente en condiciones adecuadas durante un periodo de tiempo adecuado, para establecer de manera satisfactoria una línea de células madre inmortalizadas o inmortalizadas condicionalmente.

10 En determinadas realizaciones, inducir la proliferación de una célula madre inmortalizada condicionalmente según cualquier método descrito en el presente documento incluye inducir la inmortalización de la célula madre inmortalizada condicionalmente y de ese modo provocar que las células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) proliferen. En algunas realizaciones, inducir la proliferación comprende inducir la expresión de un agente que induce inmortalidad. En determinadas realizaciones, la expresión de un agente que induce inmortalidad se induce en una célula inmortalizada condicionalmente que comprende un transgén que codifica para el agente que induce inmortalidad, en el que el transgén que codifica para el agente de inmortalización es uno o más TRE.

15 En determinadas realizaciones, una célula madre inmortalizada es, a modo de ejemplo no limitativo, una célula madre hematopoyética inmortalizada, una célula madre mesenquimatososa inmortalizada, una célula madre neuronal inmortalizada, una célula madre epitelial inmortalizada, una célula madre intestinal inmortalizada, una célula madre progenitora de miocitos cardiacos inmortalizada, una célula madre cutánea inmortalizada, una célula madre folicular inmortalizada, una célula madre del músculo esquelético inmortalizada, una célula madre precursora de osteoblastos, una célula madre hepática inmortalizada, una célula madre embrionaria inmortalizada o similares. En realizaciones específicas, la célula madre inmortalizada es una célula madre hematopoyética inmortalizada.

25 En algunas realizaciones, la célula madre inmortalizada se produce poniendo en contacto una célula madre inmortalizada condicionalmente con un agente que induce inmortalidad. En algunas realizaciones, la inmortalización de la célula madre inmortalizada condicionalmente evita la incapacidad de una célula madre normal o silvestre del mismo linaje para sobrevivir, proliferar y/o diferenciarse *ex vivo* tras un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, más de 6 horas, 12 horas, 24 horas, 3 días, 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 3 meses, etc.). En determinadas realizaciones, los agentes de inmortalización se activan condicionalmente.

30 En algunas realizaciones, el agente de inmortalización es un oncopéptido que induce inmortalidad. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, oncopéptidos adecuados que inducen inmortalidad son: factores de crecimiento y/o mitógenos, tirosina cinasas receptoras, particularmente tirosina cinasas receptoras constitutivamente activas, tirosina cinasas citoplasmáticas, serina/treonina cinasas citoplasmáticas y sus subunidades reguladoras, GTPasas reguladoras, factores de transcripción, transcriptasas inversas de telomerasa y/o factores que activan otros oncopéptidos. En algunas realizaciones, la célula madre inmortalizada se ha modificado para expresar o expresar condicionalmente el oncopéptido. Además, en algunas realizaciones, la función o expresión del oncopéptido se activa condicionalmente.

35 En algunas realizaciones, el agente de inmortalización inhibe un antagonista endógeno de un inductor de inmortalidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad comprende un inhibidor de un represor transcripcional que antagoniza la expresión de un gen que induce inmortalidad. En determinadas realizaciones, el represor transcripcional antagoniza un oncopéptido, por ejemplo, Myc.

40 En algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad es un polipéptido que inhibe la apoptosis, por ejemplo, un polipéptido anti-apoptótico. En algunas realizaciones, la célula madre inmortalizada expresa y/o expresa condicionalmente un polipéptido que inhibe la apoptosis, por ejemplo, la célula comprende un transgén que expresa o que expresa condicionalmente un polipéptido que inhibe la apoptosis. En algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad es un agente que inhibe polipéptidos pro-apoptóticos, por ejemplo, polipéptidos pro-apoptóticos endógenos.

45 En algunas realizaciones, se genera una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente poniendo en contacto una célula madre con un agente que induce inmortalidad, (por ejemplo, un oncopéptido o un transgén que expresa o sobreexpresa un oncopéptido). En algunas realizaciones, se genera una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente poniendo en contacto una célula madre con un agente que induce inmortalidad, (por ejemplo, un oncopéptido o un transgén que expresa o sobreexpresa un oncopéptido), en combinación con al menos otro agente seleccionado de un agente que: induce inmortalidad, (por ejemplo, otro oncopéptido y/u otro transgén que expresa o sobreexpresa un oncopéptido), un inhibidor de un antagonista endógeno de un inductor de inmortalidad celular, un polipéptido anti-apoptótico, un inhibidor de polipéptidos pro-apoptóticos, o una combinación de los mismos.

55 Se preparan células madre inmortalizadas o inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) utilizadas en un método descrito en el presente documento de cualquier manera adecuada. En algunas realizaciones, se produce una célula madre inmortalizada condicionalmente poniendo en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con un polipéptido y/o un transgén (por ejemplo, un oncogén o protooncogén)

que codifica para un polipéptido que induce inmortalidad. En determinadas realizaciones, se produce la célula madre inmortalizada condicionalmente poniendo en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con un oncopéptido (por ejemplo, Myc) y/o un transgén que codifica para un oncopéptido (por ejemplo, Myc). En algunas realizaciones en las que las células madre inmortalizadas o inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) utilizadas en un método descrito en el presente documento comprenden un transgén que codifica para un oncopéptido, cualquier método descrito en el presente documento opcionalmente comprende además la eliminación del transgén del núcleo de la célula madre o bien inmortalizada o bien inmortalizada condicionalmente antes de la diferenciación, o del núcleo de la célula de un tipo seleccionado tras la diferenciación.

La administración de un transgén que codifica para un agente que induce inmortalidad, por ejemplo, un oncopéptido, un polipéptido anti-apoptótico, un inhibidor de un polipéptido pro-apoptótico o antagonista endógeno de un inductor de inmortalidad celular, etc., en una célula madre se logra de cualquier manera adecuada. En determinados casos, un transgén que codifica para un agente que induce inmortalidad se transfecta en una célula madre usando un vector. La inserción del ácido nucleico en una célula, tal como se usa en el presente documento, comprende opcionalmente, a modo de ejemplo no limitativo, microinyección, transfección génica, transducción génica, electroporación o métodos similares. En algunos casos, un transgén que codifica para un agente que induce inmortalidad se transduce en la célula madre inmortalizada condicionalmente. En algunas realizaciones, el método de transfección o de transducción de un transgén que codifica para un agente que induce inmortalidad en una célula madre es tal como se expone en el documento U.S. 2007/0116691. La administración de un polipéptido que induce inmortalidad, por ejemplo, un oncopéptido, un polipéptido anti-apoptótico, un inhibidor de un polipéptido pro-apoptótico o antagonista endógeno de un inductor de inmortalidad celular, etc., en una célula madre se logra de cualquier manera adecuada. En algunas realizaciones, el polipéptido se introduce en la célula mediante la expresión de un transgén que codifica para el polipéptido. En determinadas realizaciones, el polipéptido es un polipéptido de fusión que comprende un dominio de transducción de polipéptido y el polipéptido se introduce en la célula madre inmortalizada condicionalmente cultivando la célula madre inmortalizada condicionalmente con el polipéptido de fusión. En algunas realizaciones, el método de introducción de un polipéptido en una célula madre es tal como se expone en el documento U.S. 2007/0116691.

En algunas realizaciones, una célula madre inmortalizada utilizada en cualquier método descrito en el presente documento comprende un agente que induce inmortalidad celular. En algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad celular comprende un transgén que expresa o sobreexpresa un polipéptido que induce inmortalidad celular. En algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad celular comprende un polipéptido que induce inmortalidad celular. En algunas realizaciones, un polipéptido que induce inmortalidad celular es un oncopéptido. Los oncopéptidos son de cualquier clase adecuada que induce inmortalidad celular. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, oncopéptidos adecuados que inducen inmortalidad celular son: factores de crecimiento y/o mitógenos (por ejemplo, factores de crecimiento derivados de PDGF tales como c-Sis); tirosina cinasas receptoras, particularmente tirosina cinasas receptoras constitutivamente activas (por ejemplo, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de factor de crecimiento derivado de trombocitos (PDGFR), receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), y HER2/neu); tirosina cinasas citoplasmáticas (por ejemplo, familia Src, familia Syk-ZAP-70 y familia BTK de tirosina cinasas); serina/treonina cinasas citoplasmáticas y sus subunidades reguladoras (por ejemplo, Raf cinasas, cinasas dependientes de ciclina, miembros de la familia Akt); GTPasas reguladoras (por ejemplo, proteína Ras); factores de transcripción (por ejemplo, Myc e HIF-1a); transcriptasas inversas de telomerasa (por ejemplo, TERT o hTERT); y/o factores que activan otros oncopéptidos (por ejemplo ciclinas, incluyendo ciclinas A, B, D y/o E, tales como ciclina D1 y D3). En determinadas realizaciones, un oncopéptido es Myc, HIF-1a, Notch-1, Akt, hTERT o una ciclina. En algunas realizaciones, un oncopéptido es un fragmento, homólogo o análogo funcional de cualquier oncopéptido que induce viabilidad celular, supervivencia celular y/o proliferación celular, por ejemplo, un fragmento, homólogo o análogo funcional de Myc, HIF-1a, Notch-1, Akt, hTERT o una ciclina.

En algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad celular inhibe un antagonista endógeno de un inductor de inmortalidad celular. Por ejemplo, el agente es un inhibidor genético o un inhibidor de molécula pequeña (tal como, un antagonista). Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad celular comprende un inhibidor de un represor transcripcional que suprime la expresión de un gen que induce inmortalidad celular. En determinadas realizaciones, el represor transcripcional antagoniza un oncopéptido que regula la expresión de un gen que induce inmortalidad celular, por ejemplo, Myc. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad celular comprende un agente que inhibe al menos un miembro de la familia MAD de represores transcripcionales, por ejemplo, MAD-1. En otras realizaciones determinadas, un agente que induce inmortalidad celular comprende un inhibidor de inhibidores de cinasa dependiente de ciclina (por ejemplo, p16, p19, p21 o p27).

Cualquier agente que inhibe un antagonista endógeno de un agente que induce inmortalidad celular en relación con una célula madre silvestre del mismo tipo es adecuado para su uso en el método dado a conocer en el presente documento. Un agente que es un inhibidor de un antagonista endógeno de un agente que induce inmortalidad celular reduce, inhibe o disminuye la actividad o el nivel del antagonista en cualquier fase o mediante cualquier mecanismo. Por ejemplo, en algunos casos, un agente de este tipo interfiere con la expresión de un agente que antagoniza la actividad de un agente que induce inmortalidad celular, por ejemplo, a nivel de traducción o a nivel de transcripción. En determinadas realizaciones, un agente que interfiere con la expresión de un agente que antagoniza la actividad de un agente que induce inmortalidad celular es un agente que puede realizar la interferencia de ARN

- (una molécula de iARN). En algunas realizaciones, se genera una molécula de iARN mediante escisión de o la unión a ARNm que codifica para un polipéptido, por ejemplo, un oncopéptido. Se genera una molécula de iARN mediante cualquier medio adecuado, incluyendo mediante ARN de interferencia pequeño (ARNip), microARN (miARN), ARN bicatenario (ARNbc) o ARN de horquilla pequeña (ARNhp). En determinadas realizaciones, un agente que interfiere con la expresión de un agente que antagoniza la actividad de un agente que induce inmortalidad celular es una molécula pequeña, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña.
- En algunas realizaciones, un agente que inhibe un antagonista endógeno de un agente que induce inmortalidad celular actúa directamente sobre el antagonista. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad celular comprende un agente que se une a e inhibe la actividad de un antagonista endógeno de un agente que induce inmortalidad celular, tal como un anticuerpo o una molécula pequeña. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente adecuado es un agente que se une a o interfiere con un antagonista de un oncopéptido, tal como anticuerpos o moléculas pequeñas que se unen a y alteran la función natural de uno o más de la familia MAD de represores transcripcionales (por ejemplo, MAD-1) o inhibidores de cinasa dependiente de ciclina (por ejemplo, p16, p19, p21 o p27).
- En algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad celular es un transgén que expresa o sobreexpresa un polipéptido anti-apoptótico. En algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad celular es un polipéptido anti-apoptótico. En algunas realizaciones, el polipéptido anti-apoptótico en una célula madre o expresado por una célula madre comprende uno o más de un dominio de homología con Bcl-2. En algunas realizaciones específicas, el polipéptido anti-apoptótico que comprende uno o más de un dominio de homología con Bcl-2 (por ejemplo, BH1, BH2, BH3 y/o BH4) es por ejemplo, Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Mcl-1, CED-9, Al, Bfl-1, Bcl-w, o similares.
- En algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad celular es un inhibidor de polipéptidos pro-apoptóticos, por ejemplo, polipéptidos pro-apoptóticos endógenos, dentro de una célula madre en relación con una célula madre silvestre del mismo tipo. En determinadas realizaciones, el polipéptido pro-apoptótico comprende uno o más de un dominio de homología con Bcl-2 (por ejemplo, BH1, BH2, BH3 y/o BH4). En realizaciones específicas, el polipéptido pro-apoptótico comprende BH3, por ejemplo, BIM, PUMA, NOXA, BAK, BAX, BIK, BAD, BID, EGL-1, y/o similares. En realizaciones específicas, el polipéptido pro-apoptótico es un polipéptido sólo BH3, por ejemplo, BIM, PUMA, NOXA, BAD, BID, EGL-1, y/o similares.
- Cualquier agente que inhibe la actividad o el nivel de polipéptido(s) pro-apoptótico(s) dentro de una célula madre en relación con una célula madre silvestre del mismo tipo es adecuado como agente que induce inmortalidad celular. En determinadas realizaciones, un agente que reduce el nivel de polipéptido(s) pro-apoptótico(s) en la célula madre inmortalizada condicionalmente es un agente que interfiere con la expresión de polipéptidos pro-apoptóticos. En algunas realizaciones, un agente que interfiere con la expresión de polipéptidos pro-apoptóticos interfiere con la expresión a nivel de traducción o a nivel de transcripción de la expresión. En determinadas realizaciones, un agente que interfiere con la expresión de un polipéptido pro-apoptótico es una molécula de iARN, (por ejemplo, una molécula que interfiere con ARN mediante escisión de, o unión a ARNm que codifica para un polipéptido pro-apoptótico, por ejemplo, ARNm que codifica para un polipéptido que comprende el dominio BH3). En algunas realizaciones, se genera una molécula de iARN mediante cualquier medio adecuado, incluyendo mediante ARNip, miARN, ARNbc y/o ARNhp. En otras realizaciones determinadas, un agente que interfiere con la expresión de un polipéptido pro-apoptótico es una molécula pequeña, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña.
- En algunas realizaciones, un agente que inhibe la actividad o el nivel de polipéptido(s) pro-apoptótico(s) dentro de una célula madre en relación con una célula madre silvestre del mismo tipo actúa directamente sobre el polipéptido pro-apoptótico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente que induce inmortalidad celular comprende un agente que se une a e inhibe la actividad de un polipéptido pro-apoptótico, tal como un anticuerpo o una molécula pequeña que se une a y altera la función natural de un polipéptido pro-apoptótico.
- En determinadas realizaciones, un agente que induce inmortalidad celular, por ejemplo, un polipéptido o un transgén que codifica para un polipéptido que induce inmortalidad, es, a modo de ejemplo no limitativo, n-Myc, c-Myc, 1-Myc, v-Myc, mTOR, ciclina D1, ciclina D3, STAT3, STAT5, AML-ETO, AKT, ICN-1, hTERT, PDK-1, MLL-ENL, cadena β del receptor IL3, β -catenina, familia Hedgehog (Shh, Ihh, Dhh), Bmi-1, c-Jun, Wnt, Bcl-2, Bcl-6, Bcl-10, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB-1, HER1), ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3/HER3, ErbB-4/HER4, familia de ligandos de EGFR; familia de receptores del factor de crecimiento similar a insulina (IGFR), proteínas de unión a IGF (IGFBP), familia de ligandos de IGFR; familia de receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), familia de ligandos de PDGFR; familia de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), familia de ligandos de FGFR, familia de receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), familia de VEGF; familia de receptores de HGF; familia de receptores de TRK; familia de receptores de efrina (EPH); familia de receptores de AXL; familia de receptores tirosina cinasa de leucocitos (LTK); familia de receptores de TIE, angiopoyetina 1,2; familia de receptores del receptor huérfano similar a tirosina cinasa receptora (ROR); familia de receptores de dominio de discoidina (DDR); familia de receptores de RET; familia de receptores de KLG; familia de receptores de RYK; familia de receptores de MuSK; receptores del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), TGF-beta.; receptores de citocina, receptores de clase I (familia de hematopoyetina) y receptores de clase II (interferón/familia IL-10), superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (TNFRSF), familia de receptores de muerte; antígenos de cáncer de testículos (CT), antígenos específicos de linaje, antígenos de

diferenciación, alfa-actinina-4, ARTC1, productos de fusión de región de agrupamiento de puntos de rotura-Abelson (Bcr-abl), B-RAF, caspasa-5 (CASP-5), caspasa-8 (CASP-8), beta-catenina (CTNNB1), ciclo de división celular 27 (CDC27), cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4), CDKN2A, COA-1, proteína de fusión dek-can, EFTUD-2, factor de elongación 2 (ELF2), proteína de fusión del gen variante de Ets 6/gen ETS de leucemia mieloide aguda 1 (ETC6-AML1), fibronectina (FN), GPNMB, proteína de fusión de receptor de lípidos de baja densidad/GDP-L fucosa: β -D-galactosa 2- α -L-fucosiltransferasa (LDLR/FUT), HLA-A2, intercambio de arginina por isoleucina en el residuo 170 de la hélice alfa del dominio alfa 2 en el gen HLA-A2 (HLA-A*201-R170I), HLA-A11, proteína de choque térmico 70-2 mutada (HSP70-2M), KIAA0205, MART2, melanoma ubicuo mutado 1, 2, 3 (MUM-1, 2, 3), fosfatasa ácida de próstata (PAP), neo-PAP, miosina clase I, NFYC, OGT, OS-9, proteína de fusión pml-RARalfa, PRDX5, PTPRK, K-ras (KRAS2), N-ras (NRAS), HRAS, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, triosefosfato isomerasa, BAGE, BAGE-1, BAGE-2,3,4,5, GAGE-1,2,3,4,5,6,7,8, GnT-V (N-acetil-glucosaminiltransferasa V aberrante, MGAT5), HERVK-MEL, KK-LC, KM-HN-1, LAGE, LAGE-1, antígeno reconocido por CTL en melanoma (CAMEL), MAGE-A1 (MAGE-1), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-3, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, mucina 1 (MUC1), MART-1/Melan-A (MLANA), gp100, gp100/Pme117 (SILV), tirosinasa (TYR), TRP-1, HAGE, NA-88, NY-ESO-1, NY-ESO-1/LAGE-2, SAGE, Sp17, SSX-1,2,3,4, TRP2-INT2, antígeno carcinoembrionario (CEA), calicreína 4, mamaglobina-A, OA1, antígeno específico de próstata (PSA), TRP-1/gp75, TRP-2, adipofilina, proteína inducible por interferón ausente en melanoma 2 (AIM-2), BING-4, CPSF, ciclina D1, molécula de adhesión de células epiteliales (Ep-CAM), EphA3, factor de crecimiento de fibroblastos-5 (FGF-5), glicoproteína 250 (gp250), EGFR (ERBB1), HER-2/neu (ERBB2), cadena alfa 2 del receptor 13 de interleucina (IL13R α 2), receptor de IL-6, carboxil esterasa intestinal (iCE), alfa-fetoproteína (AFP), M-CSF, mdm-2, MUC1, p53 (TP53), PBF; PRAME, PSMA, RAGE-1, RNF43, RU2AS, SOX10, STEAP1, survivina (BIRC5), transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT), telomerasa, gen de tumor de Wilms (WT1), SYCP1, BRDT, SPANX, XAGE, ADAM2, PAGE-5, LIP1, CTAGE-1, CSAGE, MMA1, CAGE, BORIS, HOM-TE5-85, AF15q14, HCA661, LDHC, MORC, SGY-1, SPO11, TPX1, NYSAR-35, FTHL17, NXF2, TDRD1, TEX15, FATE, TPTE, idiotipos de inmunoglobulina, proteína de Bence-Jones, receptores de estrógenos (ER), receptores de andrógenos (AR), CD40, CD30, CD20, CD19, CD33, antígeno de cáncer 72-4 (CA 72-4), antígeno de cáncer 15-3 (CA 15-3), antígeno de cáncer 27-29 (CA 27-29), antígeno de cáncer 125 (CA 125), antígeno de cáncer 19-9 (CA 19-9), β -gonadotropina coriónica humana, antígeno de carcinoma de células escamosas, enolasa específica de neuronas, proteína de choque térmico gp96, GM2, sargramostim, CTLA-4, 707 alanina prolinea (707-AP), antígeno de adenocarcinoma reconocido por células T-4 (ART-4), péptido de antígeno carcinoembrionario-1 (CAP-1), canal de cloruro activado por calcio-2 (CLCA2), ciclofilina B (Cyp-B), tumor de células en anillo de sello humano-2 (HST-2), genes y proteínas transformantes derivados de virus de simio 40 (SV40), proteínas del virus del papiloma humano (HPV) (HPV-E6, HPV-E7, antígenos de la cápside mayoritarios o minoritarios, otros), proteínas del virus de Epstein-Barr (EBV) (proteínas de membrana latentes de EBV - LMP1, LMP2; otros), proteínas del virus de la hepatitis B o C, proteínas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), homólogos funcionales, análogos funcionales o fragmentos funcionales de los mismos. En determinadas realizaciones, los transgenes que codifican para oncopéptidos, otros transgenes de inmortalización, homólogos funcionales, análogos funcionales o fragmentos funcionales de los mismos utilizados en cualquier método descrito en el presente documento incluyen transgenes que codifican para un polipéptido que induce viabilidad, supervivencia y/o proliferación celular.

En determinadas realizaciones, un transgén que sobreexpresa condicionalmente un polipéptido que induce inmortalidad celular (por ejemplo, un oncopéptido) comprende un elemento que responde a tetraciclina o un análogo de la misma (por ejemplo, doxiciclina). En determinados casos, el transgén que codifica para cualquier polipéptido descrito en el presente documento (por ejemplo, un oncopéptido) está dirigido por tTA o rTA (por ejemplo, TRE-Myc). Como tal, en determinadas realizaciones, una célula madre inmortalizada condicionalmente descrita en el presente documento comprende un primer transgén que codifica para un polipéptido que induce inmortalidad celular, en el que el primer transgén comprende uno o más TRE y comprende además un segundo transgén que codifica para un polipéptido que activa condicionalmente el uno o más TRE (por ejemplo, tTA o rTA).

En determinadas realizaciones, una célula madre inmortalizada condicionalmente utilizada en cualquier método descrito en el presente documento comprende un transgén que expresa un polipéptido activado condicionalmente que induce inmortalidad celular (por ejemplo, un oncopéptido), en la que el polipéptido expresado por el transgén es un polipéptido de fusión. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende un receptor (por ejemplo, un receptor de estrógenos (ER)), en el que la modulación (por ejemplo, agonismo, antagonismo y/o unión con un ligando) del receptor activa las características de supervivencia y proliferación del polipéptido de fusión. Por ejemplo, en determinadas realizaciones el polipéptido activado condicionalmente es un polipéptido de fusión de un oncopéptido, tal como, a modo de ejemplo no limitativo, Myc-ER. En algunas realizaciones, se produce una célula madre inmortalizada condicionalmente poniendo en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con un polipéptido activado condicionalmente que induce inmortalidad celular (por ejemplo, un oncopéptido), por ejemplo, Myc-ER.

En algunos casos, un agente que induce inmortalidad, por ejemplo, un oncopéptido o polipéptido anti-apoptótico se expresa o sintetiza opcionalmente fuera de la célula madre inmortalizada condicionalmente y posteriormente se administra a la célula madre inmortalizada condicionalmente que va a inmortalizarse o inmortalizarse condicionalmente. En determinadas realizaciones, se produce un agente que induce inmortalidad celular que se

expresa o se sintetiza fuera de la célula madre inmortalizada condicionalmente y que se administra posteriormente a la célula madre inmortalizada condicionalmente poniendo en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con un dominio de transducción que permite que se administre el polipéptido a la célula madre inmortalizada condicionalmente. En determinadas realizaciones específicas, un agente que induce inmortalidad celular que se expresa o sintetiza fuera de la célula madre inmortalizada condicionalmente y que posteriormente se administra a la célula madre inmortalizada condicionalmente es, por ejemplo, Tat-Myc, Vpr-Myc, VP22-Myc, Tat-Bcl-2, Vpr-Bcl-2, VP22-Bcl-2, Tat-Bcl-x, Vpr-Bcl-x, VP22-Bcl-x, Tat-Bcl-XL, Vpr-Bcl-XL, VP22-Bcl-XL, Tat-Mcl-1, Vpr-Mcl-1, VP22-Mcl-1, Tat-CED-9, Vpr-CED-9, VP22-CED-9, Tat-A1, Vpr-A1, VP22-A1, Tat-Bfl-1, Vpr-Bfl-1, VP22-Bfl-1, Tat-Bcl-w, Vpr-Bcl-w y/o VP22-Bcl-w. En determinadas realizaciones, un oncopéptido que comprende un receptor, por ejemplo, ER o GR, también comprende además un dominio de transducción que permite que el polipéptido se administre a la célula madre inmortalizada condicionalmente, por ejemplo, Tat-Myc, Vpr-Myc, Tat-Myc-ER, Vpr-Myc-ER, VP22-Myc-ER, Tat-Myc-GR, Vpr-Myc-GR y/o VP22-Myc-GR.

En determinados casos, la célula madre inmortalizada condicionalmente que comprende un agente que induce inmortalidad celular que comprende un dominio de transducción se prepara cultivando una célula madre con el polipéptido que comprende el dominio de transducción. En realizaciones específicas, una célula madre inmortalizada condicionalmente se prepara cultivando una célula madre con (1) Tat-Myc, Vpr-Myc, Tat-Myc-ER, Vpr-Myc-ER, VP22-Myc-ER, Tat-Myc-GR, Vpr-Myc-GR o VP22-Myc-GR; y (2) Tat-Bcl-2, Vpr-Bcl-2, VP22-Bcl-2, Tat-Bcl-x, Vpr-Bcl-x, VP22-Bcl-x, Tat-Bcl-XL, Vpr-Bcl-XL, VP22-Bcl-XL, Tat-Mcl-1, Vpr-Mcl-1, VP22-Mcl-1, Tat-CED-9, Vpr-CED-9, VP22-CED-9, Tat-A1, Vpr-A1, VP22-A1, Tat-Bfl-1, Vpr-Bfl-1, VP22-Bfl-1, Tat-Bcl-w, Vpr-Bcl-w o VP22-Bcl-w. En algunas realizaciones, el polipéptido que comprende un dominio de transducción y se codifica por un protooncogén es, por ejemplo, Tat-Myc, Vpr-Myc, Tat-Myc-ER, Vpr-Myc-ER, VP22-Myc-ER, Tat-Myc-GR, Vpr-Myc-GR o VP22-Myc-GR. En determinadas realizaciones, las células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) son las expuestas o preparadas mediante un método expuesto en el documento U.S. 2007/0116691.

En algunas realizaciones, se genera una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente poniendo en contacto una célula madre con un agente que induce inmortalidad, (por ejemplo, un oncopéptido o un transgén que expresa o sobreexpresa un oncopéptido). En algunas realizaciones, se genera una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente poniendo en contacto una célula madre con un agente que induce inmortalidad, (por ejemplo, un oncopéptido o un transgén que expresa o sobreexpresa un oncopéptido), en combinación con al menos otro agente seleccionado de un agente que: induce inmortalidad, (por ejemplo, otro oncopéptido, y/u otro transgén que expresa o sobreexpresa un oncopéptido), un inhibidor de un antagonista endógeno de un inductor de inmortalidad celular, un polipéptido anti-apoptótico, un inhibidor de polipéptidos pro-apoptóticos o una combinación de los mismos.

Se preparan células madre inmortalizadas o inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) utilizadas en un método descrito en el presente documento de cualquier manera adecuada. En algunas realizaciones, se produce una célula madre inmortalizada condicionalmente poniendo en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con un polipéptido y/o un transgén (por ejemplo, un oncogén o protooncogén) que codifica para un polipéptido que induce inmortalidad. En determinadas realizaciones, se produce la célula madre inmortalizada condicionalmente poniendo en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con un oncopéptido (por ejemplo, Myc) y/o un transgén que codifica para un oncopéptido (por ejemplo, Myc). En algunas realizaciones en las que las células madre inmortalizadas o inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) utilizadas en un método descrito en el presente documento comprenden un transgén que codifica para un oncopéptido, cualquier método descrito en el presente documento opcionalmente comprende además la eliminación del transgén del núcleo de la célula madre o bien inmortalizada o bien inmortalizada condicionalmente antes de la diferenciación, o del núcleo de la célula de un tipo seleccionado tras la diferenciación.

En determinadas realizaciones, las células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) utilizadas en un método dado a conocer en el presente documento comprenden un oncopéptido o un transgén que expresa un oncopéptido en combinación con al menos otro agente que induce inmortalidad celular. Los ejemplos específicos de tales combinaciones incluyen un oncopéptido o un transgén que expresa un oncopéptido (por ejemplo, Myc, Myc-ER, Tat-Myc, Vpr-Myc, Tat-Myc-ER, Vpr-Myc-ER, VP22-Myc-ER, Myc-GR, Tat-Myc-GR, Vpr-Myc-GR, VP22-Myc-GR, ciclina D1, ciclina D3 y/o HIF-1a) con un inhibidor de un antagonista endógeno de un agente que induce inmortalidad celular (por ejemplo, un inhibidor de un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (por ejemplo, p16, p19, p21 o p27) y/o un inhibidor de un represor transcripcional que suprime la expresión de un gen que induce inmortalidad celular (por ejemplo, un miembro de la familia MAD de represores transcripcionales (por ejemplo, MAD-1)).

En otras realizaciones, las combinaciones de agentes que inducen inmortalidad incluyen un oncopéptido o un transgén que expresa un oncopéptido (por ejemplo, Myc, Myc-ER, Tat-Myc, Vpr-Myc, Tat-Myc-ER, Vpr-Myc-ER, VP22-Myc-ER, Myc-GR, Tat-Myc-GR, Vpr-Myc-GR, VP22-Myc-GR, ciclina D1, ciclina D3 y/o HIF-1a) con un polipéptido anti-apoptótico que comprende uno o más de un dominio de homología con Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Mcl-1, CED-9, A1, Bfl-1, Bcl-w o similares); y/o un inhibidor de un polipéptido pro-apoptótico (por ejemplo, BIM, PUMA, NOXA, BAK, BAX, BIK, BAD, BID, EGL-1). En determinadas realizaciones, combinaciones específicas de agentes que inducen inmortalidad en células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas)

utilizadas en un método dado a conocer en el presente documento son: un polipéptido Myc y un polipéptido Bcl-2; un polipéptido Myc y un inhibidor de un polipéptido pro-apoptótico, por ejemplo, BIM. En determinadas realizaciones, el inhibidor comprende ácidos nucleicos, aminoácidos o es una molécula orgánica pequeña.

5 En algunas otras realizaciones, las células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) utilizadas en un método dado a conocer en el presente documento comprenden una combinación de un inhibidor de un antagonista endógeno de un inductor de immortalización de célula madre con al menos otro agente que induce la immortalización de células madre, por ejemplo, otro inhibidor de un antagonista endógeno de un inductor de la immortalización de células madre, y/o un oncopéptido, y/o un polipéptido anti-apoptótico, y/o un inhibidor de polipéptidos pro-apoptóticos. Los ejemplos no limitativos específicos de tales combinaciones incluyen un inhibidor de MAD-1 con un polipéptido Bcl-2 y un inhibidor de MAD-1 con un inhibidor de un polipéptido pro-apoptótico, por ejemplo, BIM.

10 En determinadas realizaciones también se incluyen combinaciones de agentes que inducen inmortalidad celular, en las que al menos uno de los agentes, hasta e incluyendo todos los agentes, se expresa o activa condicionalmente. Por ejemplo, tales combinaciones incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, oncopéptidos activados condicionalmente, por ejemplo, Myc-ER, Tat-Myc, Vpr-Myc, Tat-Myc-ER, Vpr-Myc-ER, VP22-Myc-ER, Myc-GR, Tat-Myc-GR, Vpr-Myc-GR y/o VP22-Myc-GR, en combinación con polipéptidos anti-apoptóticos, por ejemplo, Bcl-2, Tat-Bcl-2, Vpr-Bcl-2, VP22-Bcl-2, Tat-Bcl-x, Vpr-Bcl-x, VP22-Bcl-x, Tat-Bcl-XL, Vpr-Bcl- XL, VP22-Bcl-XL, Tat-Mcl-1, Vpr-Mcl-1, VP22-Mcl-1, Tat-CED-9, Vpr-CED-9, VP22-CED-9, Tat-A1, Vpr-A1, VP22-A1, Tat-Bfl-1, Vpr-Bfl-1, VP22-Bfl-1, Tat-Bcl-w, Vpr-Bcl-w o VP22-Bcl-w.

20 Los transgenes y polipéptidos descritos en el presente documento se administran a una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) que van a immortalizarse o immortalizarse condicionalmente de cualquier manera adecuada tal como, a modo de ejemplo no limitativo, transfección en una célula madre usando un vector, microinyección, transducción, electroporación, o métodos similares. En determinados casos, los transgenes se construyen dando lugar un vector mediante cualquier técnica adecuada incluyendo, por ejemplo, el uso de reacción en cadena de la polimerasa para aislar un gen o un fragmento de un gen o genes de un genoma, el uso de enzimas de restricción para la modificación de un gen, o un fragmento de un gen o genes aislados de un genoma, el uso de enzimas que modifican ácidos nucleicos tales como topoisomerasas, ADN ligasas, ADN nucleasas y el uso de métodos relacionados con la obtención de ARNm de una célula y la conversión de ARNm en ADNc y la clonación de ADNc en un vector adecuado para la clonación adicional.

25 En determinadas realizaciones, se usa la transducción de proteínas para introducir el/los agente(s) de immortalización en las células. Por ejemplo, para la transducción de proteínas, se han purificado las proteínas de fusión antes de la transducción. Como resultado, no es necesaria la modificación genética de la célula con el fin de immortalizar condicionalmente la célula.

30 En determinadas realizaciones, se usa transducción viral. En algunas realizaciones, se clona el gen para immortalización, tal como Myc o Bcl-2, en un vector viral en el que la expresión génica está bajo el control de diversos inductores virales, tales como inductor de timidina cinasa del virus del herpes simple o inductor de LTR (repetición terminal larga) del VIH. En realizaciones específicas, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se ponen en contacto con un vector viral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un gen de Myc, un gen de Bcl-2 o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se ponen en contacto con un vector retroviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un gen de Myc, un gen de Bcl-2, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se ponen en contacto con un vector adenoviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un gen de Myc, un gen de Bcl-2, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se ponen en contacto con un vector lentiviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un gen de Myc, un gen de Bcl-2, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, se usan métodos de transfección celular para la administración de transgén/transgenes. Por tanto, en algunas realizaciones, se clonan genes en un vector de expresión de mamífero y se administra el vector que contiene el transgén mediante agentes de transfección celular disponibles comercialmente basados, por ejemplo, en tecnologías de lípidos catiónicos. En algunas realizaciones, se usa opcionalmente un método de electroporación, que es una variación de las metodologías de transfección, para administrar vectores de expresión de mamíferos. En determinados casos, para una transfección eficaz, se linealiza el vector antes de la transfección.

35 En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento que utiliza una célula madre o immortalizada que comprende un transgén que codifica para un polipéptido que induce inmortalidad (por ejemplo, un oncopéptido) comprende además la eliminación del transgén de la célula madre antes de la diferenciación o de la célula diferenciada tras la diferenciación. En determinadas realizaciones, la eliminación del transgén se logra mediante el uso de un sistema Cre-loxP o similar. En este sistema, el transgén que codifica para el polipéptido que induce supervivencia celular, viabilidad celular y/o proliferación celular comprende un elemento de secuencia, por ejemplo, un locus loxP (5'-ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT-3'), insertado antes y después del transgén. En determinados casos, la secuencia de loxP se reconoce por una recombinasa (por ejemplo, Cre), que se utiliza opcionalmente para eliminar un transgén ubicado entre dos loxP (por ejemplo, un elemento de

secuencia que codifica para el polipéptido que induce supervivencia celular, viabilidad celular y/o proliferación celular). En una realización que usa el sistema Cre-loxP, se construye un plásmido viral en el que se flanquea un transgén de fusión (por ejemplo, Tat-Myc, Vpr-Myc, Tat-Myc-ER o Tat-MYC) por dos secuencias loxP. En determinadas realizaciones, el transgén se integra en los genomas de una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) mediante cualquier método adecuado (por ejemplo, transducción).

Diferenciación

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método para preparar una pluralidad de células de un tipo seleccionado, que comprende:

(a). proporcionar una célula madre;

10 (b). introducir un transgén que codifica para un agente que induce inmortalidad o un oncopéptido que induce inmortalidad en la célula madre para producir una célula madre inmortalizada condicionalmente; y

(c). inducir la diferenciación de la célula madre inmortalizada condicionalmente (por ejemplo, célula madre hematopoyética) para dar una célula del tipo seleccionado.

15 En determinadas realizaciones, una célula madre inmortalizada utilizada en cualquier método descrito en el presente documento es una célula madre inmortalizada condicionalmente (célula madre cttt). En algunas realizaciones, la diferenciación de una célula madre inmortalizada condicionalmente se produce en condiciones en las que no se induce la inmortalización de la célula madre inmortalizada condicionalmente. En otras realizaciones, la diferenciación de una célula madre inmortalizada condicionalmente se produce en condiciones en las que se induce la inmortalización de la célula madre inmortalizada condicionalmente.

20 En algunas realizaciones, un método dado a conocer en el presente documento comprende además poner en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con un polipéptido que induce diferenciación y/o un transgén que codifica para un polipéptido que induce diferenciación. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de exportación y un elemento de retención en la membrana plasmática. En determinadas realizaciones, cuando el polipéptido en la célula o expresado por la célula se mantiene en la membrana plasmática, el polipéptido comprende además una secuencia que facilita la retirada del polipéptido de la superficie celular. En determinadas realizaciones, la secuencia que facilita la retirada del polipéptido de la superficie celular es un sitio de escisión de proteasa. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de proteasa es el sustrato de una proteasa sérica.

25 En determinadas realizaciones, el polipéptido que induce diferenciación es una citocina. En determinadas realizaciones, la citocina es un factor de crecimiento y/o diferenciación. En determinadas realizaciones, el factor de crecimiento y/o diferenciación es EPO, THPO o G-CSF.

30 Una célula producida mediante un método descrito en el presente documento es cualquier célula que puede diferenciarse a partir de una célula madre normal o silvestre. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan métodos para preparar un eritrocito (eritrocito), una célula linfoide, un linfocito B, un linfocito T, un linfocito citolítico natural, un neutrófilo, un basófilo, un eosinófilo, un monocito, un macrófago, un trombocito, o similar a partir de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente. En realizaciones específicas, se prepara un eritrocito a partir de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente. En otras realizaciones específicas, se prepara un trombocito a partir de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente. En algunas realizaciones, una célula diferenciada preparada según cualquier método descrito en el presente documento es una célula anucleada, por ejemplo, un eritrocito.

35 Además, los tipos seleccionados de células preparadas diferenciando células madre inmortalizadas o inmortalizadas condicionalmente según cualquier método descrito en el presente documento incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, células progenitoras linfoides, linfoblastos, prolinfocitos, células T indiferenciadas, células T cooperadoras, linfocitos citolíticos naturales, células T citotóxicas, células T de memoria, células T reguladoras, células T $\gamma\delta$, células B progenitoras, células pro-B tempranas, células pro-B tardías, células pre-B grandes, células pre-B pequeñas, células B inmaduras, células B maduras, células B plasmáticas, células B de memoria, células B-1, células dendríticas linfoides, células progenitoras mieloides comunes, megacarioblastos, promegacarioblastos, megacariocitos, trombocitos, proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos, eritroblastos ortocromáticos, reticulocitos, eritrocitos, mieloblastos, promielocitos basófilos, mielocitos basófilos, metamielocitos basófilos, células en banda basófilas, basófilos, promielocitos neutrófilos, mielocitos neutrófilos, metamielocitos neutrófilos, células en banda neutrófilas, neutrófilos, promielocitos eosinófilos, mielocitos eosinófilos, metamielocitos eosinófilos, células en banda eosinófilas, eosinófilos, monoblastos, promonocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas mieloides y mastocitos. Además, en algunas realizaciones, las células madre inmortalizadas o inmortalizadas condicionalmente se diferencian en células no pertenecientes a linajes, tales como células de epitelios, hígado, pulmón, tracto gastrointestinal, cerebro, corazón, músculo esquelético y piel.

55 En algunas realizaciones, se prepara una célula ósea (osteocito), célula de cartílago (condrocito), célula grasa (adipocito), célula pulmonar, o similar a partir de una célula madre mesenquimatosa inmortalizada o inmortalizada

condicionalmente. En determinadas realizaciones, se prepara una neurona, astrocito, oligodendrocito, o similar a partir de una célula madre neuronal inmortalizada o inmortalizada condicionalmente. En algunas realizaciones, se preparan células epiteliales (por ejemplo, una célula componente del epitelio de un tejido) a partir de una célula madre epitelial inmortalizada o inmortalizada condicionalmente. En determinadas realizaciones, se preparan queratinocitos o similares a partir de una célula madre cutánea inmortalizada o inmortalizada condicionalmente. En algunas realizaciones, se prepara una célula del folículo piloso, una célula epidérmica o similar a partir de una célula madre folicular inmortalizada o inmortalizada condicionalmente.

En determinadas realizaciones, una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente se diferencia para dar un tipo seleccionado de célula de cualquier manera adecuada. En algunas realizaciones, una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente se diferencia poniendo en contacto la célula con un agente que induce diferenciación, por ejemplo, una citocina. En determinadas realizaciones, poner en contacto la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente con un agente que induce la diferenciación de la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente comprende poner en cultivo el agente (o combinación de agentes) con la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente. En determinados casos, las citocinas se reconocen por una variedad de receptores celulares sobre la superficie celular y desencadenan respuestas celulares asociadas funcionalmente con el receptor. En un aspecto, la citocina utilizada en el presente documento se refiere a cualquier clase de citocina, incluyendo, una citocina autocrina, una citocina paracrina o una citocina endocrina. Opcionalmente se utilizan agentes utilizados para inducir diferenciación (por ejemplo, una citocina) o combinaciones de agentes. En realizaciones específicas, los agentes (por ejemplo, citocinas) utilizados en la diferenciación de células madre inmortalizadas o inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, una o más de una familia de interleucinas (IL) que oscila entre IL-1 e IL-35, un interferón (IFN), un factor inhibidor de la migración de leucocitos (LMIF), un factor inhibidor de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), osteopontina, eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (THPO), factor de crecimiento transformante beta (TGF β), un factor de necrosis tumoral (TNF), factor de células madre (SCF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), beta-tromboglobulina, una quimiocina de la familia C, una quimiocina de la familia CC, una quimiocina de la familia CXC, una quimiocina de la familia CX3C, factor 4 de trombocitos, una proteína inflamatoria de macrófagos, un factor de motilidad autocrina tumoral, un factor de crecimiento de hepatocitos, una neuroleucina, un factor supresor de células T, un factor activador de células B, una ectodisplasina, una proteína una proteína ligando Fas, ligando OX40, ligando RANK, una linfotóxina, o una combinación de los mismos.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente para dar un eritrocito o un progenitor de eritrocito según cualquier método descrito en el presente documento incluye poner en contacto (por ejemplo, cultivar) la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente con EPO. En realizaciones adicionales, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente para dar un eritrocito o un progenitor de eritrocito según cualquier método descrito en el presente documento incluye poner en contacto (por ejemplo, cultivar) la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente con IL-3, IL-6, G-CSF y EPO. Además, en determinadas realizaciones, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente para dar un trombocito según cualquier método descrito en el presente documento incluye poner en contacto (por ejemplo, cultivar) la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente con THPO. En realizaciones adicionales, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente para dar un progenitor de trombocitos según cualquier método descrito en el presente documento incluye poner en contacto (por ejemplo, cultivar) la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente con IL-3, IL-6, GCSF y THPO. En algunas realizaciones, se utilizan citocinas, tales como dexametasona, β -estradiol, factor de crecimiento de insulina 1 y/o ciclosporina A, en el método de diferenciación descrito en el presente documento.

En algunos casos, antes de poner en contacto la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con un agente que induce diferenciación, se elimina un agente que induce inmortalización, por ejemplo, un oncopéptido y/o transgén que codifica para un oncopéptido y/o péptido anti-apoptótico, de la célula madre inmortalizada condicionalmente. La eliminación del agente que induce inmortalización se logra de cualquier manera adecuada, incluyendo a través de recombinasas bacterianas (por ejemplo, Cre o Flp).

En realizaciones específicas, en el presente documento se proporciona un método para producir una pluralidad de células diferenciadas, que comprende:

(d). proporcionar una célula madre;

(e). introducir un transgén que codifica para un agente que induce inmortalidad o un polipéptido que induce inmortalidad en la célula madre inmortalizada condicionalmente para producir una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente; y

(f). inducir la diferenciación de la célula madre inmortalizada para dar el tipo seleccionado de célula.

En diversas realizaciones, la célula madre inmortalizada condicionalmente es, a modo de ejemplo no limitativo, una

célula madre, una célula madre mesenquimatosa, una célula madre neuronal, una célula madre epitelial, una célula madre intestinal, una célula madre progenitora de miocitos cardiacos, una célula madre cutánea, una célula madre folicular, una célula madre del músculo esquelético, una célula madre precursora de osteoblastos, una célula madre hepática, una célula madre embrionaria o similares. En realizaciones específicas, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se obtienen de cualquier fuente adecuada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una célula madre se obtiene de la médula ósea, sangre periférica, cordón umbilical o tejido fetal de un individuo o se consigue de una fuente que obtuvo una célula madre de la médula ósea, sangre periférica, cordón umbilical o tejido fetal de un individuo. En algunas realizaciones, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se obtienen anestesiando al donante de células madre, pinchando la cresta ilíaca superior posterior con una aguja, y realizando aspiración de las células de la médula ósea con una jeringa. En algunas realizaciones, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se recogen de la sangre circulante. En algunas realizaciones, se induce a la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) en la médula ósea a migrar desde la médula a la sangre circulante en mayores números inyectando al donante de células madre una citocina, tal como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). En determinadas realizaciones, la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se recogen de una placenta o un cordón umbilical humano. En algunas realizaciones, la fuente de la pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) son los tejidos productores de sangre en desarrollo de animales fetales. En los seres humanos, se encuentran células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) en la sangre circulante de un feto humano aproximadamente hacia las 12 a 18 semanas.

Además, en algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos de preparación de progenitores o precursores de cualquiera de las células descritas en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza cualquier método descrito en el presente documento para preparar un progenitor o un precursor de un eritrocito o un trombocito. Tales progenitores o precursores incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, una célula progenitora mieloide. Las células progenitoras son células con potencial de diferenciación restringido. Se producen a partir de una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) y dan lugar a un subconjunto de células especializadas, terminalmente diferenciadas. Por ejemplo, las células progenitoras mieloides dan lugar a células de linaje mieloide y las células progenitoras linfoides dan lugar a células progenitoras linfoides, tales como células T o células B. En determinadas realizaciones, las células progenitoras se producen según cualquier método descrito en el presente documento.

En determinadas realizaciones, las células preparadas mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento se separan adicionalmente para lograr la homogeneidad del producto celular final. Los eritrocitos, por ejemplo, pasan por diversas fases de morfología y carácter diferentes durante la diferenciación. En determinadas realizaciones, con el fin de recoger una pluralidad de eritrocitos que sean sustancialmente homólogos, se emplean diversos métodos para separar los eritrocitos según su forma, tamaño, peso y/o volumen. Los diversos métodos de separación incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, centrifugación, uso de máquinas de clasificación, o filtración. En determinadas realizaciones, cuando los productos terminalmente diferenciados no son fácilmente distinguibles de las células no diferenciadas en el cultivo, los productos terminalmente diferenciados se separan por la presencia de marcador(es) asociados específicamente con la forma terminalmente diferenciada de la célula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, con el fin de aislar macrófagos terminalmente diferenciados, se trata un cultivo que contiene una mezcla de macrófagos, células madre inmortalizadas o inmortalizadas condicionalmente y otras células progenitoras con anticuerpos Gr-1 conjugados con agente fluorescente para identificar macrófagos en el cultivo. En algunas realizaciones, los macrófagos identificados se aíslan hasta obtener una población homogénea mediante el uso de equipo de FACS.

En determinadas realizaciones, las células progenitoras que no están terminalmente diferenciadas se producen mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, a los sujetos que necesitan una irrigación de sangre sostenida, en lugar de una infusión inmediata de una gran cantidad de eritrocitos, se les administran reticulocitos o proeritroblastos preparados según un método descrito en el presente documento para la producción de eritrocitos *in vivo* sostenida. En determinadas realizaciones, con el fin de facilitar la diferenciación de células madre inmortalizadas o inmortalizadas condicionalmente para dar células progenitoras en lugar de células terminalmente diferenciadas, se ajustan opcionalmente la selección de citocina, la concentración y/o el tiempo de eliminación del medio de cultivo. Mediante el ajuste de estos parámetros, por ejemplo, se dirige la diferenciación de eritrocitos hacia un estado que favorece la producción de proeritroblastos en lugar de los eritrocitos terminalmente diferenciados. En determinadas realizaciones, las células progenitoras se identifican y/o aíslan de cualquier manera adecuada. En determinadas realizaciones, el aislamiento, la identificación y/o la separación se logran, a modo de ejemplo no limitativo, mediante el uso de equipo de FACS. En algunas realizaciones, los progenitores de eritrocitos se identifican y/o se aíslan basándose en su capacidad para unirse al anticuerpo Ter-119. La figura 5 ilustra la diferenciación de células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) en progenitores eritroides que expresan Ter-119 *in vitro*.

Eritrocitos y trombocitos

Además, en el presente documento se proporcionan células diferenciadas (por ejemplo, eritrocitos, trombocitos o progenitores de los mismos) preparados según cualquier método descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método para preparar un eritrocito, que comprende:

(g). proporcionar una célula madre inmortalizada condicionalmente; y

5 (h). inducir la diferenciación de la célula madre inmortalizada condicionalmente en un eritrocito o un progenitor de eritrocito.

En realizaciones específicas, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada condicionalmente en un eritrocito o un progenitor del mismo comprende poner en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con eritropoyetina (EPO).

10 En algunas realizaciones, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente para dar un eritrocito o un progenitor de eritrocito según cualquier método descrito en el presente documento incluye poner en contacto (por ejemplo, cultivar) la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente con EPO. En realizaciones adicionales, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente para dar un eritrocito o un progenitor de eritrocito según cualquier método descrito en el presente documento incluye poner en contacto (por ejemplo, cultivar) la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente con G-CSF y EPO. En algunas realizaciones, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente para dar un eritrocito o un progenitor de eritrocito según cualquier método descrito en el presente documento incluye poner en contacto (por ejemplo, cultivar) la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente con IL-3, G-CSF y EPO. En determinadas realizaciones, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente para dar un eritrocito o un progenitor de eritrocito según cualquier método descrito en el presente documento incluye poner en contacto (por ejemplo, cultivar) la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente con IL-3, G-CSF, IL-6 y EPO. En realizaciones adicionales, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente para dar un eritrocito o un progenitor de eritrocito según cualquier método descrito en el presente documento incluye poner en contacto (por ejemplo, cultivar) la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente con IL-3, G-CSF, ciclosporina A y EPO. En realizaciones adicionales, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente para dar un eritrocito o un progenitor de eritrocito según cualquier método descrito en el presente documento incluye poner en contacto (por ejemplo, cultivar) la célula madre inmortalizada o inmortalizada condicionalmente con G-CSF y EPO y uno o más de IL-3, IL-6, ciclosporina A o TNF- α .

30 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método para preparar un trombocito, que comprende:

(i). proporcionar una célula madre inmortalizada condicionalmente; e

(j). inducir la diferenciación de la célula madre inmortalizada condicionalmente en un trombocito o un trombocito progenitor.

35 En realizaciones específicas, inducir la diferenciación de una célula madre inmortalizada condicionalmente en un trombocito o un progenitor del mismo comprende poner en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con trombopoyetina (THPO).

II. Método de examen

40 En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos y kits para identificar compuestos que inducen selectivamente la diferenciación de células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) mediante:

(a). proporcionar una célula madre inmortalizada condicionalmente;

(b). poner en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con un compuesto;

45 (c). detectar o medir el efecto del compuesto sobre el estado de diferenciación de la célula madre inmortalizada condicionalmente; y

(d). opcionalmente aislar y caracterizar el compuesto que se puso en contacto con la célula madre inmortalizada en el caso de que se desconozca la identidad del compuesto cuando se pone en contacto con la célula madre inmortalizada.

50 Se usa cualquiera de las células madre inmortalizadas o inmortalizadas condicionalmente dadas a conocer en el presente documento en un método de examen para compuestos que inducen la diferenciación de las células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) en células de un tipo seleccionado.

En determinadas realizaciones, poner en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con un compuesto comprende poner en contacto la célula madre inmortalizada condicionalmente con un compuesto en

condiciones en las que la célula madre immortalizada condicionalmente no está en el estado immortalizado (es decir, se han eliminado las moléculas o factores externos que se usan para inducir condicionalmente el estado immortalizado o no se han expuesto a las células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas)). Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que la célula madre immortalizada condicionalmente se produce poniendo en contacto la célula madre immortalizada condicionalmente con un polipéptido Myc-ER o Myc-GR, la célula madre immortalizada condicionalmente se pone en contacto con el compuesto en ausencia de un ligando o modulador del receptor de estrógenos (por ejemplo, tamoxifeno o 4-hidroxitamoxifeno) o el ligando del receptor de glucocorticoides (por ejemplo, mifepristona). Por tanto, en estas realizaciones específicas, el ER o GR no se activa y el dominio Myc del polipéptido de fusión sigue siendo no funcional. En algunas realizaciones, la célula immortalizada condicionalmente comprende TRE-Myc, por ejemplo, Myc activado por tTA o rtTA, y la célula madre immortalizada condicionalmente se pone en contacto con el compuesto mientras que TRE-Myc está inactivado, por ejemplo, en ausencia de tetraciclina en el caso de Myc activado por tTA y en presencia de doxiciclina en el caso de Myc activado por rtTA.

En algunos casos, antes de poner en contacto una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) con un compuesto en el método de examen, se elimina un agente que induce immortalización, por ejemplo, un oncopéptido y/o transgén que codifica para un oncopéptido y/o péptido anti-apoptótico, de la célula madre immortalizada condicionalmente. La eliminación del agente que induce immortalización se logra de cualquier manera adecuada, incluyendo a través de recombinasas bacterianas (por ejemplo, Cre o Flp).

En determinadas realizaciones, el examen para identificar compuestos que inducen diferenciación se realiza en ausencia de EPO. En tales casos, los compuestos identificados mediante el examen inducen la diferenciación de las células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) para dar células del tipo seleccionado, por ejemplo, eritrocitos, sin la ayuda de EPO. En algunas realizaciones, cuando el examen se realiza en ausencia de EPO, se altera la expresión del receptor de EPO. Los compuestos identificados mediante el método de examen dado a conocer en el presente documento que inducen la diferenciación de una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) para dar eritrocitos en ausencia de EPO se administran terapéuticamente sin riesgo de desarrollar eritroleucemia a partir de la administración crónica de EPO.

En otras realizaciones, el examen para los compuestos que inducen la diferenciación de una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se realiza en presencia de EPO. Cuando EPO está presente, los compuestos identificados mediante el método de examen modulan (por ejemplo, aumentan o disminuyen) la actividad de EPO. Los compuestos que modulan la actividad de EPO identificados mediante el método de examen dado a conocer en el presente documento son eficaces para el tratamiento de leucemias eritroides.

En determinadas realizaciones, el examen para identificar compuestos que inducen la diferenciación se realiza en ausencia de THPO. En tales casos, los compuestos identificados en el examen inducen la diferenciación de las células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) para dar células del tipo seleccionado, por ejemplo, trombocitos, sin la ayuda de THPO. En algunas realizaciones, cuando el examen se realiza en ausencia de THPO, se altera la expresión del receptor de THPO. En otras realizaciones, el examen se realiza en presencia de THPO. Cuando THPO está presente, los compuestos identificados mediante el método de examen modulan (por ejemplo, aumentan o disminuyen) la actividad de THPO.

En determinadas realizaciones, la detección o medición del efecto del compuesto sobre el estado de diferenciación de la célula madre immortalizada condicionalmente se logra mediante cualquier método adecuado, incluyendo, a modo de ejemplo no limitativo, exámenes de ganancia de función, análisis de expresión génica y micromatriz, inmunocitoquímica, detección de anticuerpo marcado o medición de marcadores celulares, análisis de HPLC de firmas moleculares celulares, exámenes con fluoróforo de moléculas pequeñas y análisis funcionales celulares.

En determinadas realizaciones, los compuestos que entran en contacto con las células se aíslan mediante métodos adecuados conocidos por los expertos habituales en la técnica, por ejemplo, a modo de ejemplo no limitativo, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía ultrarrápida, precipitación y cristalización. En determinadas realizaciones, el compuesto se caracteriza usando métodos adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo, a modo de ejemplo no limitativo, RMN, IR, espectrometría de masas y cristalografía de rayos X.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un compuesto identificado mediante cualquier método descrito en el presente documento. El compuesto se identifica examinando compuestos individuales o mezclas de compuestos. Las células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se ponen opcionalmente en contacto con compuestos individuales o conjuntos de compuestos, por ejemplo, bibliotecas combinatorias de compuestos. Los compuestos se examinan de una manera de alto rendimiento, usando análisis colorimétrico para identificar compuestos que inducen diferenciación o que modulan la actividad de otros agentes de diferenciación.

En determinadas realizaciones, los kits para identificar compuestos adecuados para inducir la diferenciación de una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas), particularmente células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas), comprenden una pluralidad de una

pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas), particularmente células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas), en los que el kit describe el método de examen para identificar compuestos que inducen la diferenciación de una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) expuesto en el presente documento.

5 III. Métodos de tratamiento

Las células preparadas según cualquier método en el presente documento se usan opcionalmente de manera terapéutica o como fuente de células para fines de investigación.

Trastornos por deficiencia de células enucleadas

10 En el presente documento, en determinadas realizaciones, se da a conocer un método de tratamiento de un trastorno caracterizado por una deficiencia de células anucleadas, que comprende: administrar una célula anucleada preparada según un método dado a conocer en el presente documento. En algunas realizaciones, el trastorno es una anemia (por ejemplo, anemia aplásica, anemia perniciosa, anemia por deficiencia de hierro, anemia de células falciformes, esferocitosis, anemia hemolítica), enfermedad de Gaucher, hemólisis, neutropenia, trombocitopenia, granulocitopenia, hemofilia, linfoma Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma crónico de células B, linfoma de Burkitt, 15 linfoma de tipo folicular, linfoma difuso de células B grandes, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda de células pre-B, leucemia linfocítica aguda de células pre-T, leucemia promielocítica aguda, leucemia que no responde al tratamiento, o combinaciones de los mismos. En determinados casos, el trastorno caracterizado por una deficiencia en células anucleadas resulta (parcial o completamente) de quimioterapia. En algunas realizaciones, una célula anucleada producida mediante un método dado a conocer en el presente 20 documento se administra conjuntamente con quimioterapia.

En algunas realizaciones, se administran o se transfunden trombocitos, eritrocitos o progenitores de los mismos a un individuo que los necesita, por ejemplo, que padece una pérdida de sangre. En algunas realizaciones, un paciente que presenta un número bajo de un subconjunto de células mieloides se trata administrando células precursoras mieloides para compensar la deficiencia mieloide. En determinadas realizaciones, en las que se necesita una 25 transfusión inmediata, se administran grandes cantidades de eritrocitos y/o trombocitos preparados según un método descrito en el presente documento a un individuo. En algunas realizaciones, se desea la transfusión sostenida de sangre y/o trombocitos y se administran progenitores de eritrocitos y/o trombocitos al individuo.

Las células de un tipo seleccionado preparadas según cualquier método descrito en el presente documento se utilizan opcionalmente en terapia de reemplazo celular y/o en una terapia complementaria para sujetos con diversos 30 estados incluyendo, a modo de ejemplo no limitativo, anemia, neutropenia, trombocitopenia, granulocitopenia, linfoma Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma crónico de células B, linfoma de Burkitt, linfoma de tipo folicular, linfoma difuso de células B grandes, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda de células pre-B, leucemia linfocítica aguda de células pre-T, leucemia promielocítica aguda, leucemia que no responde al tratamiento, o combinaciones de los mismos.

35 *Dispositivos de administración*

Las células preparadas según cualquier método dado a conocer en el presente documento se administran opcionalmente a pacientes como vehículos de administración para polipéptidos de interés, por ejemplo, para fines 40 terapéuticos o diagnósticos. Por ejemplo, las ventajas clave de usar células preparadas mediante el método descrito en el presente documento, por ejemplo, eritrocitos y trombocitos, para la administración de proteínas incluyen la naturaleza transitoria de las células, la falta de material genético en las células anucleadas completamente maduras y la tolerancia del "propio portador" para la administración por el compartimento linfoide desde la ontogenia.

En algunas realizaciones, el polipéptido es un polipéptido terapéuticamente beneficioso. En otras realizaciones, el polipéptido es un polipéptido de diagnóstico. En determinadas realizaciones, un polipéptido no es un oncopéptido. En algunas realizaciones, un polipéptido comprende una secuencia de exportación y un elemento de retención en la 45 membrana plasmática, de manera que el polipéptido en la célula o expresado por la célula se mantiene en la membrana plasmática. En algunas realizaciones no limitativas, el elemento de retención en la membrana plasmática es una proteína unida a GPI, CD8 o CD16. En determinadas realizaciones, cuando el polipéptido en la célula o expresado por la célula se mantiene en la membrana plasmática, el polipéptido comprende además una secuencia que facilita la retirada del polipéptido de la superficie celular, tal como un sitio de escisión de proteasa. En algunas 50 realizaciones, el sitio de escisión de proteasa es el sustrato de una proteasa sérica, por ejemplo, una proteasa sérica humana. Las células producidas de esta manera se usan para administrar péptidos específicos a un paciente introduciéndolas en la sangre periférica de un paciente, donde las proteasas séricas se escindirán y liberarán el péptido de la superficie celular. Las células que expresan polipéptidos seleccionados sobre la membrana plasmática, incluyendo polipéptidos escindibles que se producen de la manera dada a conocer en el presente documento son 55 vehículos para la administración de proteínas terapéuticas. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, cuando se usan eritrocitos como vehículos para la administración de proteínas, las ventajas clave incluyen la naturaleza transitoria de los eritrocitos y las proteínas codificadas que administran, la falta de material genético contenido en los eritrocitos anucleados completamente maduros, el uso de un portador para la administración de proteínas que se

tolera por el compartimento linfoide desde la ontogenia y la capacidad para generar las células para la administración *in vitro*.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido es un receptor señuelo. En determinadas realizaciones, el receptor señuelo es un receptor de citocina. En algunas realizaciones, el receptor de citocina es soluble. En determinadas realizaciones, el receptor señuelo es IL3R-Fc, IL6R-Fc, TNF- α -Fc, IFN- α -Fc o BAFFR-Fc.

En otras realizaciones, un polipéptido es una toxina. En determinadas realizaciones, la toxina es ricina o toxina diftérica.

En algunas realizaciones, un polipéptido es un inhibidor de la angiogénesis.

En otras realizaciones, un polipéptido es un factor proangiogénico.

10 Todavía en otras realizaciones, un polipéptido es un factor linfangiogénico.

En realizaciones adicionales, un polipéptido es un péptido vasodilatador.

En otras realizaciones, un polipéptido es un antígeno.

Todavía en otras realizaciones, un polipéptido es una proteasa. En determinadas realizaciones, la proteasa es específica para tejidos fibróticos en masas embolíticas.

15 En algunas realizaciones, un polipéptido es un receptor para un microbio, por ejemplo, un virus, una bacteria, un hongo, un protozoo o un parásito. En algunas realizaciones específicas, el receptor del microbio es un receptor microbiano modificado genéticamente que supera a los receptores endógenos en su competencia por el microbio debido a una afinidad de unión superior para el microbio.

20 En algunas realizaciones, una célula producida mediante un método dado a conocer en el presente documento es un vehículo de administración para un inhibidor polipeptídico de la angiogénesis. En otras realizaciones, un polipéptido es un factor pro-angiogénico y/o factor linfangiogénico, y tales células producidas mediante un método dado a conocer en el presente documento se administran a los pacientes para administrar los polipéptidos para el tratamiento de, por ejemplo, sabañones, vasoconstricción relacionada con cáncer o artritis reumática.

25 Todavía en otras realizaciones, un polipéptido en una célula o expresado por una célula producida mediante cualquiera de los métodos dados a conocer en el presente documento es un péptido vasodilatador. De esta manera, las células producidas mediante el método dado a conocer en el presente documento son vehículos para administrar las proteínas para el tratamiento de la constricción vascular durante el infarto cardiaco, el parto o las cefaleas migrañosas.

30 En otras realizaciones, un polipéptido es un antígeno. Las células producidas mediante el método dado a conocer en el presente documento que expresan un antígeno son vehículos para la administración de los antígenos para producir una respuesta inmunitaria.

En algunas realizaciones, tales células se administran a los pacientes conjuntamente con ligandos del receptor de tipo Toll (ligandos de TLR) con el fin de potenciar la inmunidad a lo largo de toda la vida.

35 Todavía en otras realizaciones, un polipéptido es una proteasa. En determinadas realizaciones, la proteasa es específica para tejidos fibróticos en masas embolíticas. En determinadas realizaciones, por ejemplo, las células producidas mediante el método dado a conocer en el presente documento que expresan proteasas específicas para tejidos fibróticos en masas embolíticas se administran a los pacientes para aliviar la formación de coágulos sanguíneos o para reducir el riesgo de embolias pulmonares.

40 En algunas realizaciones, un polipéptido es un receptor para un virus. En algunas realizaciones, las células que expresan receptores virales producidas mediante el método dado a conocer en el presente documento se administran a los pacientes para, por ejemplo, disminuir la carga viral secuestrando virus de sus células diana naturales.

45 La figura 6 ilustra la reconstitución de eritrocitos *in vivo* tras irradiación mortal mediante trasplante de células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) - vista macroscópica I. La figura 7 ilustra la reconstitución de eritrocitos *in vivo* tras irradiación mortal mediante trasplante de células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) - vista macroscópica II. La figura 8 ilustra la reconstitución de eritrocitos *in vivo* tras irradiación mortal mediante trasplante de células madre inmortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) - vista microscópica de eritrocitos anucleados.

50 IV. Biorreactores

En algunas realizaciones, la producción de células sanguíneas diferenciadas (por ejemplo, eritrocitos o trombocitos)

se logra mediante el uso de biorreactores. En determinadas realizaciones, los biorreactores son reactores de flujo o reactores discontinuos. En realizaciones específicas, los reactores de flujo son reactores de flujo continuo o reactores de flujo discontinuo. En determinadas realizaciones, la síntesis en un reactor se logra sembrando un recipiente con una población de células madre immortalizadas o immortalizadas condicionalmente. En algunas realizaciones, se induce o se permite que prolifere la población de células madre immortalizadas o immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, debido a que se promueve la supervivencia, viabilidad y/o proliferación celulares producidas por un polipéptido en la misma). Una vez que se prepara una población suficiente (por ejemplo, al menos 0,1 kg, 1 kg, 10 kg o 100 kg) de células madre immortalizadas o immortalizadas condicionalmente, las células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) se ponen en contacto con un medio de cultivo que induce la diferenciación de las células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) para dar las células deseadas, por ejemplo, según cualquier método descrito en el presente documento. En determinadas realizaciones, se recogen entonces las células diferenciadas (por ejemplo, células progenitoras y/o terminalmente diferenciadas) deseadas.

Las células madre immortalizadas o immortalizadas condicionalmente descritas en el presente documento pueden crioconservarse (por ejemplo, durante menos de aproximadamente 1 día, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 12 meses). Esta característica permite una síntesis según demanda conveniente de un tipo seleccionado de células a gran escala. En determinadas realizaciones, las células madre immortalizadas o immortalizadas condicionalmente se procesan para eliminar los genes de immortalización y entonces se crioconservan para la diferenciación futura. En alguna realización, las células madre immortalizadas o immortalizadas condicionalmente se diferencian en un progenitor, por ejemplo un megacarioblasto, y se crioconservan para la producción inmediata de trombocitos.

En determinadas realizaciones en el presente documento se proporciona un sistema de reactor, que comprende:

(k). un recipiente alimentador que comprende una pluralidad de células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas);

(l). un recipiente de reacción que comprende una pluralidad de células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) y un agente para inducir la diferenciación de las células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) en eritrocitos o trombocitos, en el que el recipiente de reacción está en comunicación con el recipiente alimentador; y

(m). un recipiente de recogida aguas abajo en comunicación con el recipiente de reacción, comprendiendo el recipiente de recogida una pluralidad de los eritrocitos o trombocitos.

En determinadas realizaciones, el recipiente alimentador comprende además un agente para inducir la proliferación de las células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas). En algunas realizaciones, el sistema comprende además un sistema de gestión de reactor que regula la comunicación entre el recipiente de reacción y el recipiente alimentador, y entre el recipiente de reacción y el reactor de recogida aguas abajo. En determinadas realizaciones, la célula madre immortalizada condicionalmente se produce poniendo en contacto la célula madre immortalizada condicionalmente con un polipéptido o gen de Myc y opcionalmente un polipéptido o gen de Bcl-2 (es decir, un transgén de Bcl-2). En algunas realizaciones, la célula madre immortalizada condicionalmente se produce poniendo en contacto la célula madre immortalizada condicionalmente con un polipéptido de fusión o gen de fusión de Myc-ER y opcionalmente con un polipéptido o gen de Bcl-2. En determinadas realizaciones, el agente para inducir la proliferación de una pluralidad de células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) es un modulador del receptor de estrógenos. En algunas realizaciones, el agente para inducir la diferenciación de las células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) para dar eritrocitos es IL-3 y EPO. En determinadas realizaciones, el agente para inducir la diferenciación de las células madre immortalizadas condicionalmente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) para dar trombocitos es IL-3 y THPO.

Ejemplos

Ejemplo 1

La figura 1A ilustra una representación esquemática de constructos retrovirales usados para transducir células HSC murinas primarias con MYC.ER y Bcl-2. Se generan variantes de la estructura principal de pMSCV para codificar los ADNc para MYC.ER o Bcl-2 humano así como un elemento IRES y un gen indicador (EGFP). Los virus resultantes generan transcritos bicistrónicos de manera que el nivel de expresión del gen indicador se correlaciona con el nivel de expresión del primer ADNc. La figura 1B ilustra análisis de citometría de flujo de HSC obtenidas de donantes tratados con 5-fluorouracilo tras la transducción con pMIG-MYC.ER y pMIG-Bcl-2. La figura 1C ilustra la cinética de leucemogénesis en ratones con trasplante de las HSC transducidas mostradas en el panel B. Se trasplantan en cohortes de ratones irradiados mortalmente 10^5 HSC que se han transducido con pMIG-MYC. ER y pMIG-Bcl-2.

Una semana tras el trasplante, se administra a los ratones inyecciones semanales de 4-OHT. La curva representa el porcentaje de ratones que sobreviven en un punto dado en el tiempo una vez que comienzan las inyecciones de 4-OHT (día 0 en el gráfico). Todos los ratones murieron de manera uniforme de una leucemia de tipo AML. Los datos mostrados en este caso proceden de un experimento representativo de 4 experimentos independientes. La figura 1D ilustra análisis de FACS de una célula madre hematopoyética cttf poco tiempo tras la recuperación a partir de la médula ósea de ratones leucémicos. En una fase temprana del método de establecer una línea de células madre hematopoyéticas inmortalizadas condicionalmente, las células expresan de manera uniforme altos niveles de GFP, expresan de manera predominante altos niveles de c-kit y Sca-1, y no expresan Flk-2, CD34 o marcadores de linaje tales como CD19, B220 (mostrado en la figura), o Thy1.2, Mac-1, Gr-1, Ter-119. La figura 1E ilustra análisis de FACS de una línea de células madre hematopoyéticas inmortalizadas condicionalmente que se ha establecido. Una vez que la línea de células madre hematopoyéticas inmortalizadas condicionalmente se expande y se crioconserva, mantiene un fenotipo de superficie estable que se representa en el panel B. Estas células expresan altos niveles de Sca-1, pero tienen niveles en superficie reducidos de c-Kit, y se mantienen negativas para Flk-2, CD34, B220, CD 19 o los otros marcadores de linaje (thy1.2, Gr-1, Mac-1, Ter-119; no mostrados). La reducción de los niveles de c-kit de la superficie parece ser un resultado de señalización continua, puesto que requieren que G-CSF mantenga su fenotipo de tipo HSC. La figura 1F ilustra análisis de FACS de marcador de célula madre en células madre hematopoyéticas normales, sin manipular, a partir de la médula ósea de ratones C57/BL6 silvestres. Se obtienen células madre de médula ósea de ratones C57/BL6 silvestres, sin manipular. Se tiñen las células con anticuerpos frente a c-kit, Sca-1, Flk-2 y CD34, con el fin de comparar los niveles de expresión de las proteínas de marcador mediante HSC normales y en las líneas de células madre hematopoyéticas cttf.

Ejemplo 2

La figura 2 ilustra el análisis de la capacidad de clonación de líneas de células madre hematopoyéticas inmortalizadas condicionalmente mediante amplificación por PCR de inserciones retrovirales. Se aisló ADN genómico de células de médula ósea normales obtenidas de ratones C57/BL6, o de dos líneas celulares parentales, o de siete líneas celulares derivadas de clones de células individuales de las líneas celulares parentales. Las inserciones retrovirales integradas se amplifican con un procedimiento de PCR anidada de dos fases. El carril 1 muestra el patrón de células C57/BL6 normales. Los carriles 2 y 3 muestran el patrón de integraciones retrovirales en líneas celulares multiclonales. Los carriles 4-10 muestran el patrón de inserciones retrovirales en líneas celulares derivadas originalmente de clones de células individuales de cualquier línea celular parental. Al igual que las líneas parentales, las poblaciones clonales pueden rescatar ratones de irradiación mortal y dan lugar a linajes hematopoyéticos.

Ejemplo 3

La figura 3 ilustra la caracterización de células inmunitarias maduras que surgen tras el trasplante de células madre hematopoyéticas cttf. La figura 3A ilustra la frecuencia de células derivadas de células madre hematopoyéticas cttf en tejidos linfoides tras el trasplante. Se irradian mortalmente cohortes de ratones C57/BL6 y se realizan trasplantes que consisten en 10^3 células madre hematopoyéticas cttf y 3×10^5 células de médula ósea completas portadoras procedentes de ratones Rag-1^{-/-}. Se realiza un seguimiento de las células que se desarrollan a partir de células madre hematopoyéticas inmortalizadas condicionalmente *in vivo* en virtud del gen indicador codificado de manera retroviral, GFP. En el panel A se representa la frecuencia de las células hematopoyéticas que expresan GFP en la médula ósea, el timo, el bazo y los ganglios linfáticos de ratones quiméricos. Estos histogramas se derivan de los órganos en un ratón a modo de ejemplo de cada uno dentro de una cohorte de cinco. La figura 3B ilustra detección de células de linaje mielóide GFP+ en la médula ósea. Se tiñeron células de médula ósea para determinar la presencia de Mac-1 y Gr-1. El panel B muestra que aunque no todas las células mieloides encontradas en la médula ósea de ratones quiméricos expresan el gen indicador codificado de manera retroviral, una parte significativa es GFP+ y por tanto se derivan de las células madre hematopoyéticas cttf. La figura 3C ilustra el análisis de linfocitos maduros en el bazo. Se analizaron bazos de ratones quiméricos mediante citometría de flujo para determinar células T y B maduras. El panel C muestra la presencia de células T TCR $\alpha\beta$ que son positivas individuales o bien para CD4 o bien CD8. Además, el panel C también muestra la detección de células B CD19+ que expresan IgM e IgD en su superficie. Aunque la frecuencia de células T maduras en el bazo es comparable con la que se encuentra en ratones C57/BL6 silvestres, sin manipular, se retrasa el desarrollo de células B. La figura 3D ilustra el análisis de linfocitos maduros en ratones receptores de trasplante tras el segundo pase en serie de células madre hematopoyéticas inmortalizadas condicionalmente. Se recogen los bazos de ratones quiméricos y se preparan suspensiones de células individuales y se usan para el análisis de FACS. Se compara la frecuencia de células T y B maduras encontradas en ratones C57/BL6 receptores y silvestres. El panel D muestra la presencia de células T TCR $\alpha\beta$ positivas individuales para CD4 o CD8 maduras en los bazos con una frecuencia similar a los ratones normales. Están presentes células B CD 19+ IgM+ y IgD+, aunque a una frecuencia inferior que en ratones normales.

Ejemplo 4

La figura 4 ilustra un rescate a largo plazo de irradiación mortal mediante células madre hematopoyéticas cttf. El trasplante de células madre hematopoyéticas inmortalizadas condicionalmente solas no confiere radioprotección pasada la crisis inducida por pérdida de eritrocitos. Curvas de supervivencia de Kaplan/Mayer para cohortes de ratones que se irradian mortalmente y a los que se les realizan trasplantes que consisten en 10^3 ó 10^5 células de dos

5 líneas de células madre hematopoyéticas inmortalizadas condicionalmente diferentes (célula madre hematopoyética inmortalizada condicionalmente o célula madre hematopoyética inmortalizada condicionalmente.2). Todas las cohortes consistían en 10 ratones y estos animales murieron de manera uniforme de anemia grave. También se representan curvas de mortalidad de dos cohortes de ratones que se irradian mortalmente a los que se les administran 3×10^5 células de médula ósea completas portadoras derivadas de ratones Rag-1^{-/-} junto con 10^3 células madre hematopoyéticas inmortalizadas condicionalmente procedentes de cualquier línea celular. Las cohortes consistían en 3-4 ratones cada una y los animales permanecieron vivos y sanos durante hasta 6 meses tras el trasplante.

10 Ejemplo 5 – Tratamiento de anemia *in vivo* mediante administración de eritrocitos producidos mediante un método dado a conocer en el presente documento

15 A dos cohortes de ratones sanos se les administra una dosis subletal de irradiación para inducir anemia. Al primer grupo de ratones anémicos se le administran eritrocitos (producidos tal como se da a conocer en el presente documento) en un portador adecuado. Al segundo grupo de ratones (los ratones control) se les administra sólo el portador adecuado. Se compara la tasa de mortalidad de los dos grupos de ratones para determinar la eficacia de la administración de eritrocitos dados a conocer en el presente documento para rescatar a los ratones de anemia.

Ejemplo 6 – Tratamiento de anemia *in vivo* en un modelo de ratón con insuficiencia renal

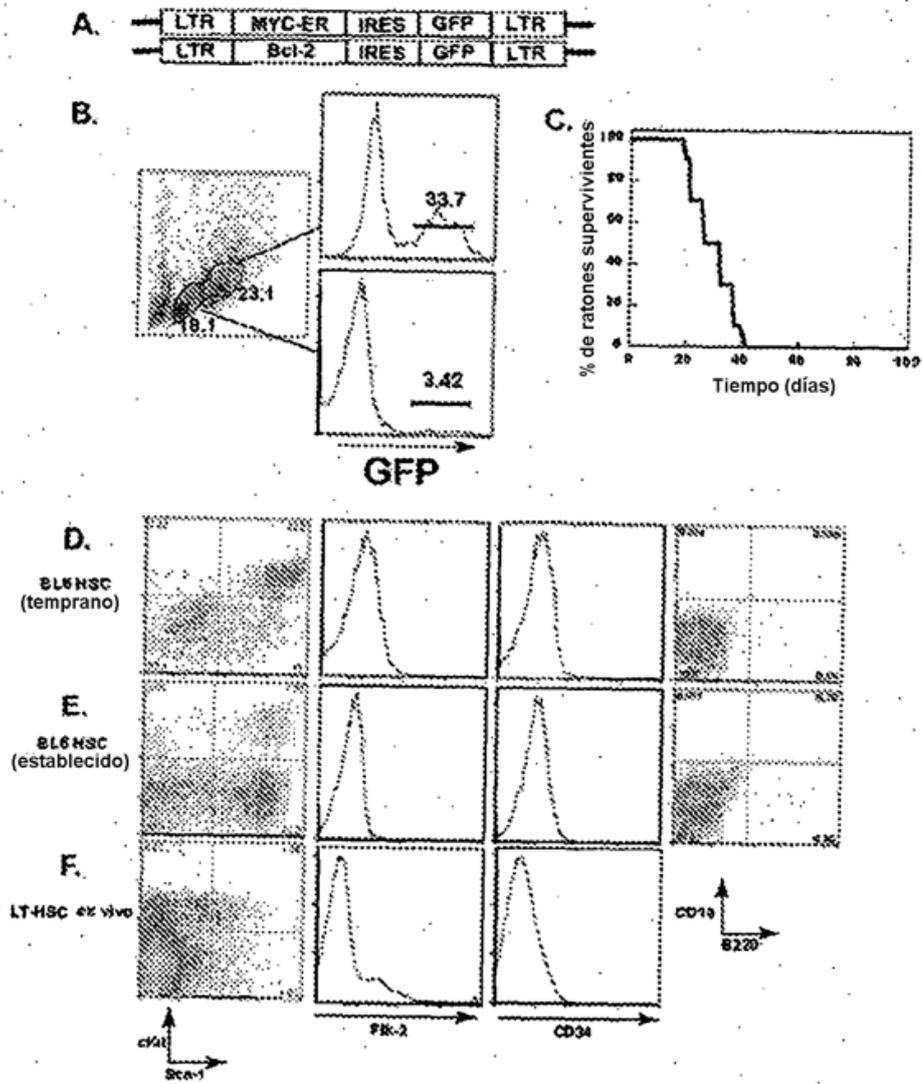
20 Se induce anemia en un modelo de ratón con insuficiencia renal, tal como se notifica en la bibliografía. Hamamori, *et al.* J. Clin. Invest. (1995), 95: 1808-1813. Brevemente, se realiza una nefrectomía de dos etapas en ratones desnudos macho de 7-8 semanas de edad. Se confirma la anemia en los ratones midiendo los niveles de hematocrito. Se compara la tasa de mortalidad de ratones que reciben administración de eritrocitos producidos mediante un método dado a conocer en el presente documento con la tasa de mortalidad de ratones que reciben el portador para las células solo con el fin de determinar la eficacia de la administración de eritrocitos dados a conocer en el presente documento para el tratamiento de anemia que resulta de insuficiencia renal.

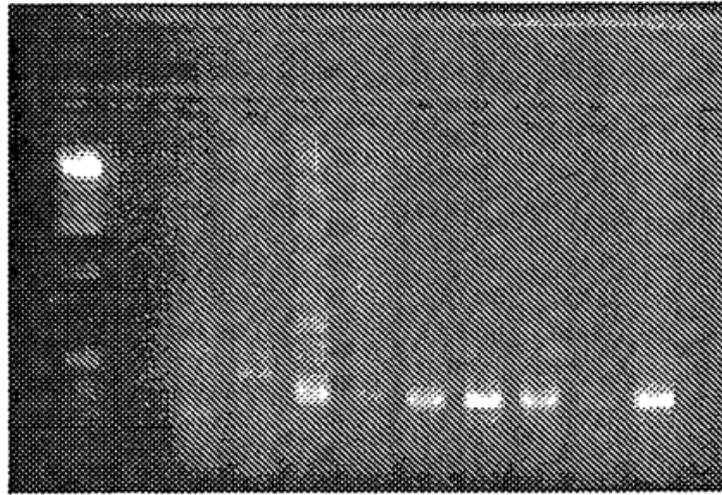
25

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de una pluralidad de células anucleadas que comprende: cultivar células madre inmortalizadas condicionalmente en presencia de un agente para inducir la diferenciación a eritrocitos; en el que el agente es IL-3 y EPO;
- 5 en el que las células madre inmortalizadas condicionalmente se generaron mediante:
 - a. transfección de una pluralidad de células madre con un primer vector que comprende: una secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula de MYC;
 - b. transfección de las células madre con un segundo vector retroviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para Bcl-2, Bcl-X, o una combinación de los mismos; y
 - 10 c. cultivo de las células madre con IL-3, IL-6, factor de células madre, trombopoyetina, ligando de Flt3, o una combinación de los mismos;
 y en el que la actividad de la molécula de MYC se ha suprimido antes de la diferenciación.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el primer vector comprende además el dominio de unión a hormonas del receptor de estrógenos humano.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además inducir la traslocación de la molécula de Myc a un núcleo.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el primer vector, el segundo vector, o tanto el primer vector como el segundo vector son el virus de células madre murinas (MSCV), o un derivado del mismo; opcionalmente MSCV-(IRES)-GFP o un derivado del mismo; opcionalmente MSCV-(IRES)-GFP que comprende además el elemento regulador de ARN del virus de la hepatitis B de la marmota (WRE).
- 20 5. Método de producción de una pluralidad de células anucleadas, que comprende: cultivar células madre inmortalizadas condicionalmente en presencia de un agente para inducir la diferenciación a eritrocitos; en el que el agente es IL-3 y EPO;
- en el que las células madre inmortalizadas condicionalmente se generaron mediante:
 - 25 a. puesta en contacto de una pluralidad de células madre con un primer péptido sintetizado de manera exógena que comprende: una molécula de MYC que se trasloca a un núcleo;
 - b. puesta en contacto de las células madre con un segundo péptido sintetizado de manera exógena que comprende: Bcl-2, BCL-X, o una combinación de los mismos; y
 - 30 c. cultivo de las células madre con IL-3, IL-6, factor de células madre, trombopoyetina, ligando de Flt3, o una combinación de los mismos;
 y en el que el primer péptido se elimina del contacto con las células madre inmortalizadas condicionalmente antes de la diferenciación.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el primer péptido, el segundo péptido, o tanto el primer péptido como el segundo péptido comprenden una secuencia transportadora.
- 35 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en el que la primera proteína, la segunda proteína, o tanto la primera proteína como la segunda proteína comprenden una secuencia TAT o una secuencia VPR.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la molécula de MYC es c-Myc, l-Myc, n-Myc, s-Myc, v-Myc o una combinación de los mismos.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además poner en contacto la pluralidad de células madre con: estradiol (E2), 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), o ambos.
- 40 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que las células madre inmortalizadas condicionalmente comprenden además uno o más polipéptidos de interés.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la molécula de MYC es MYC-ER.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en el que la molécula de MYC es TAT-MYC.
- 45 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5-12, en el que la molécula de Bcl-2 es TAT-Bcl-2.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el segundo vector retroviral comprende una

secuencia de ácido nucleico que codifica para Bcl-2.





P.M.
C57/BL6
ctlt-HSC parental n.º 1
ctlt-HSC parental n.º 2
Clon n.º 1
Clon n.º 2
Clon n.º 3
Clon n.º 4
Clon n.º 5
Clon n.º 6
Clon n.º 7

Figura 2

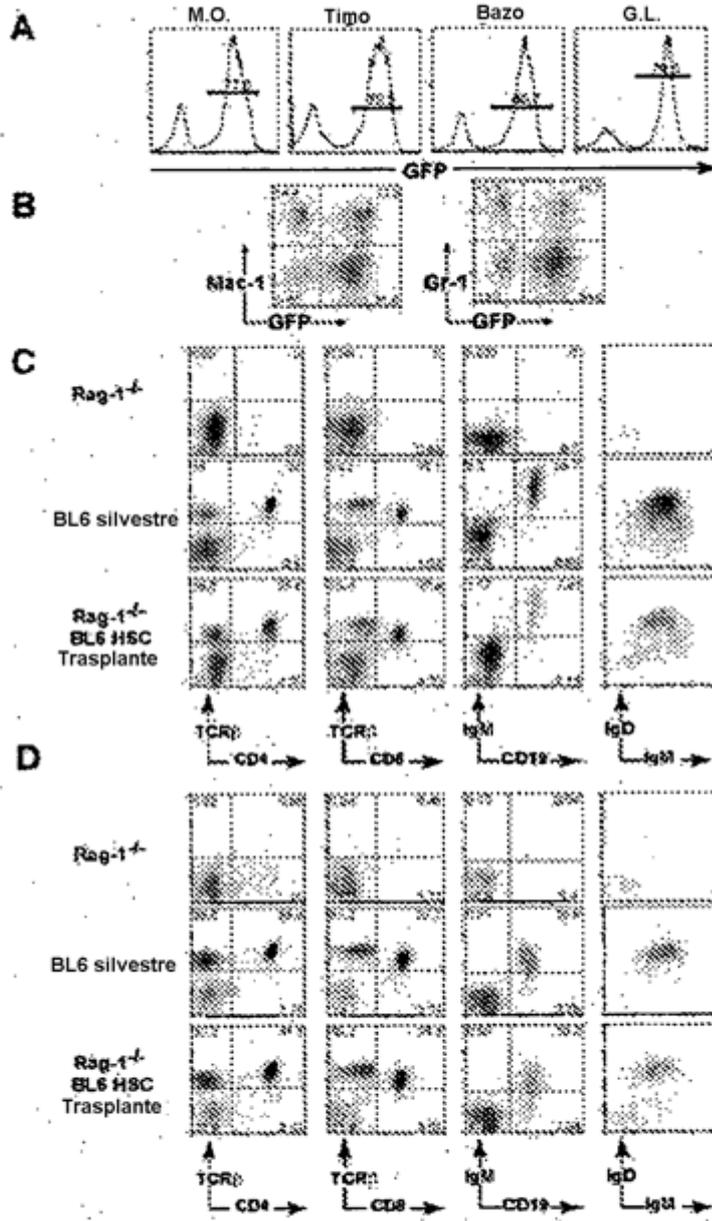


Figura 3

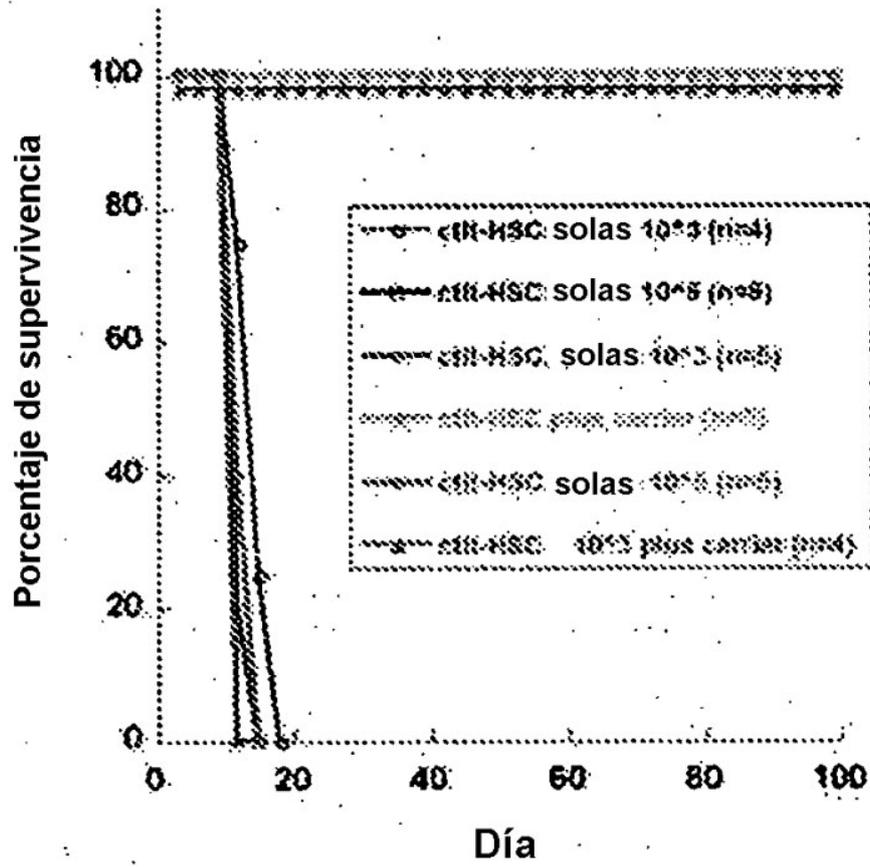


Figura 4

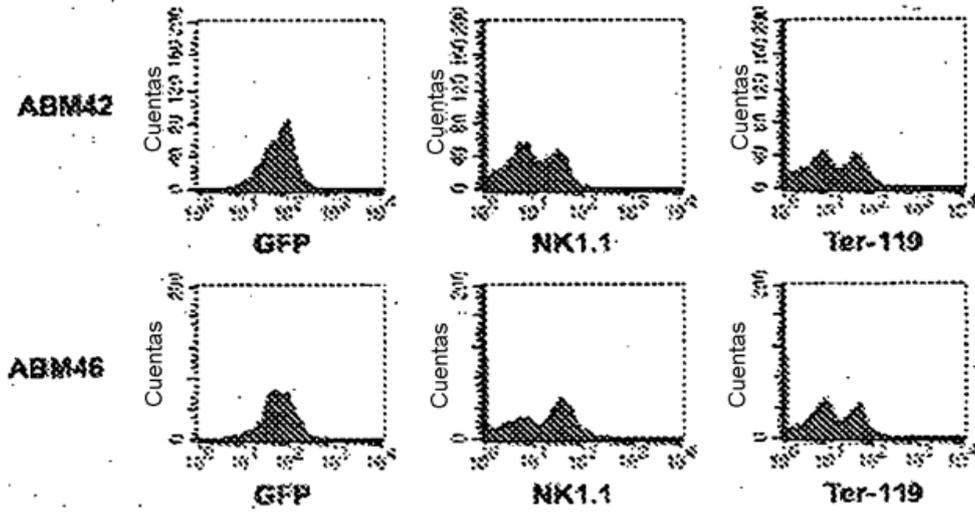
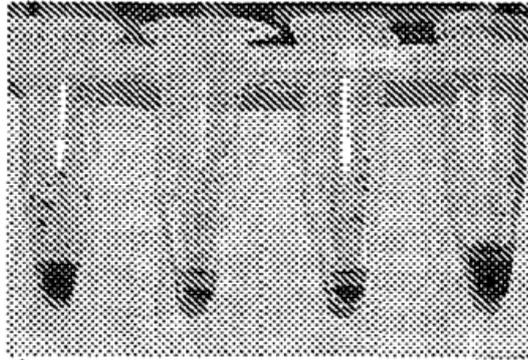


Figura 5

Glóbulos rojos de ratón presentes en la sangre periférica de ratones C57/BL6 quiméricos 6 semanas tras BMT



WT 900R A 900R B BMT

Figura 6

Glóbulos rojos de ratón presentes en la sangre periférica de ratones C57/BL6 quiméricos 6 semanas tras BMT

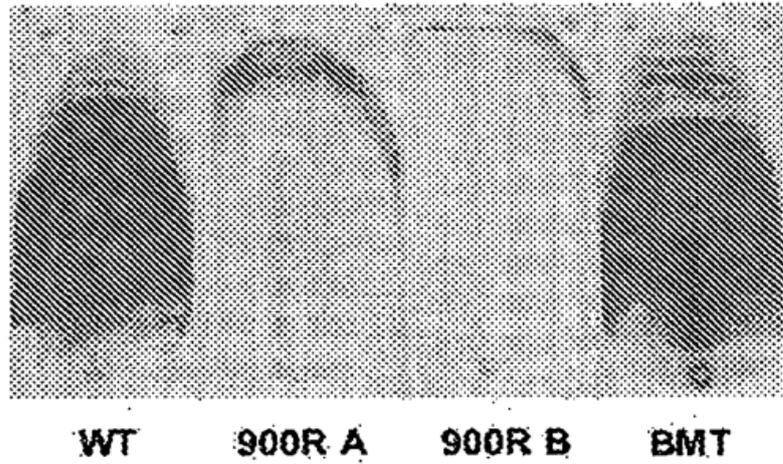


Figura 7

Glóbulos rojos de ratón presentes en la sangre periférica de ratones C57/BL6 quiméricos 6 semanas tras BMT

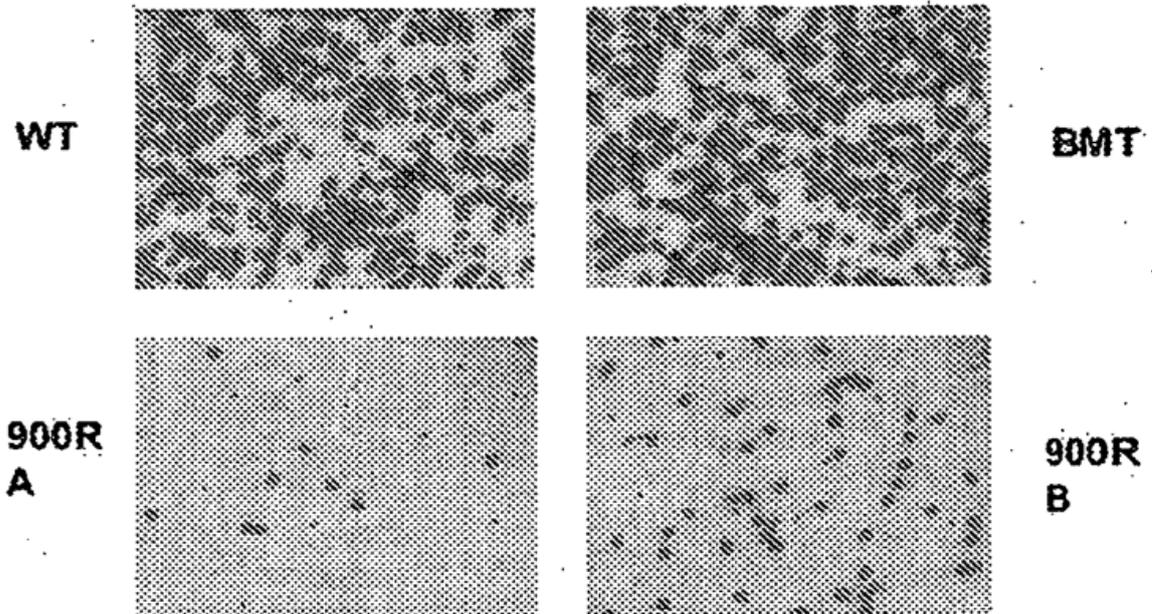


Figura 8