

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 780**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008 E 12152269 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 2455099**

54 Título: **Método para la producción de proteína TAT-HOXB4H recombinante para su utilización como estimulante de la hematopoyesis in vivo**

30 Prioridad:

04.03.2008 US 42097

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

26.04.2016

73 Titular/es:

**TAIWAN ADVANCE BIO-PHARM INC. (100.0%)
12F. No.25, Lane 169, Kan-Ning Street, Hsi-Chi
Taipei, TW**

72 Inventor/es:

**WU, KOU-JUEY y
HUANG, CHI-HUNG**

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen

Observaciones :

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

ES 2 567 780 T3

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

Descripción

Método para la producción de proteína TAT-HOXB4H recombinante para su utilización como estimulante de la hematopoyesis *in vivo*.

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un método nuevo y no obvio de producción de la proteína de fusión TAT-HOXB4 etiquetada con histidina C-terminal (TAT-HOXB4H) que contiene al menos 6 residuos de histidina en el C-terminal. El método de producción proporciona beneficios inesperados de aumento de la estabilidad y de rendimiento, lo que permite el éxito de la administración *in vivo* de esta proteína.

Antecedentes de la Invención

El creciente interés en la medicina regenerativa ha impulsado la búsqueda de células madre de órganos específicos o de células de auto-renovación. La población mejor estudiada de células de auto-renovación son las células madre hematopoyéticas (CMH), que son opciones innovadoras para el tratamiento de enfermedades que van desde el cáncer a enfermedades metabólicas o inmunodeficiencias.

El proceso de formación de células sanguíneas mediante el cual las células sanguíneas rojas y blancas son reemplazadas a través de la división de las CMH ubicadas en la médula ósea se denomina hematopoyesis. Las CMH tienen las propiedades clave de ser capaces de auto-renovarse y diferenciarse en células maduras de linajes linfoides y mieloides. Sin embargo, los mecanismos genéticos responsables del control de los resultados de la auto-renovación y la diferenciación de las divisiones de las CMH siguen siendo en gran parte desconocidos.

En la actualidad, el trasplante de células madre hematopoyéticas humanas de médula ósea, sangre periférica movilizada y sangre de cordón umbilical (SCU) de adultos se ha utilizado clínicamente para tratar cánceres hematopoyéticos (leucemias y linfomas) y para ayudar al sistema inmunitario a recuperarse de altas dosis de quimioterapia de cánceres no hematopoyéticos. Sin embargo, el trasplante eficiente requiere una cantidad sustancial de CMH de diferentes fuentes y puede requerir una expansión de las CMH.

Las CMH se pueden originar a partir de médula ósea, sangre periférica y SCU. La extracción de células de médula ósea requiere cirugía y un procedimiento doloroso, y por lo tanto se convierte en un enfoque menos favorable. La utilización de células de sangre periférica es también un problema, debido a la dificultad de obtener las CMH cualificadas de pacientes comprometidos con la hematopoyesis que sufren la enfermedad o la quimioterapia. La SCU es relativamente más fácil de obtener y la calidad de las CMH es mucho más alta, sin embargo, el número de células madre hematopoyéticas obtenidas a partir de este planteamiento es aún limitado. El número de células de cada extracción resulta suficiente para un niño, pero puede ser insuficiente para un adulto. Para superar este problema potencial, resulta realmente necesario un nuevo enfoque que facilite la proliferación de CMH *in vitro* modulando el proceso de auto-renovación de las células madre para el trasplante de CMH.

Se ha indicado que los factores de transcripción desempeñan un papel crítico en la regulación de la expresión génica y en la diferenciación de las células madre (Orkin, S. H. *Nature Reviews Genetics* 1, 57-64, 2000). El factor de transcripción cambia diversos procesos celulares mediante la unión a genes objetivo específicos, y esta regulación también depende de su concentración celular. Previamente se descubrió que un grupo de factores de transcripción llamado homeobox de unión a ADN (HOX) juega un papel importante en la embriogénesis. Recientemente, también ha descubierto que la familia HOX está involucrada en el desarrollo de las CMH (Buske, C. et al., *J. Hematol.* 71, 301-308, 2000). La regulación de la auto-renovación de las CMH por el factor de transcripción HOX fue estudiada por el Dr. Guy Sauvageau de la Universidad de Montreal. El grupo de Sauvageau mostró que el gen homeobox HOXB4 es fundamental en la regulación de la auto-renovación de las CMH debido a su capacidad para mantener la población de CMH en la médula ósea. Los genes HOX expresados en las células de la sangre se observaron por primera vez en líneas de células humanas y de ratón. Algunos tipos de genes HOX se expresan de forma ubicua en diferentes tipos de células, mientras que otros se expresan específicamente en cierto tipo de células o ciertos momentos determinados durante el desarrollo. Por ejemplo, ocho miembros de clúster HOXB humano se expresan en la etapa temprana del desarrollo de eritrocitos. Sin embargo, los genes HOXB como HOXB4 y HOXB7 también se expresan en células T y células B. El grupo de Sauvageau confirmó que nueve genes HOXA, ocho genes HOXB y cuatro genes HOXC se expresan en las células de médula ósea CD34⁺. Entre estas células de médula ósea CD34⁺, HOXB2, HOXB9 y HOXA10 son los más enriquecidos en células progenitoras de eritrocitos. Sin embargo, no se han expresado genes HOX en células CD34⁻. Recientemente se ha demostrado que el gen homeobox B4 humano (HOXB4) amplía de forma efectiva las CMH en una forma de proteína recombinante o retroviral. Las proteínas TAT-HOXB4 recombinantes se utilizaron para expandir las células madre a escala de laboratorio sin el riesgo de inserción retroviral o de co-cultivo con células estromales de la médula ósea

(Ver Krosi, J. et al., Nature Medicine 9, 1428-1432, 2003). Por lo tanto, la proteína HOXB4 se utiliza regularmente como un estimulante para promover la expansión *in vitro* de CMH (Figura 1).

5 Evidencias recientes indicaron que mediante la adición de una etiqueta de secuencia de la proteína TAT en el N-terminal de HOXB4, se puede administrar HOXB4 exógeno a la célula. Esta secuencia TAT dirige el transporte de HOXB4 desde el lado extracelular al lado intracelular. Al entrar en el citosol, HOXB4 puede replegarse en su conformación nativa mediante la chaperona HSP90. TAT-HOXB4 es capaz de promover la proliferación de CMH entre 2 y 6 veces más (Amsellem, S. et al, Nature Medicine 9, 1423-1427, 2003; Krosi, J. et al, Nature Medicine 9, 1428-1432, 2003). Sin embargo, el rendimiento de la proteína TAT-HOXB4 recombinante a partir de *E. coli* mediante el uso del procedimiento de purificación regular es demasiado bajo.

10 En un esfuerzo por aumentar el rendimiento de la proteína TAT-HOXB4 recombinante, se desarrolló un método de fabricación de una proteína TAT-HOXB4H con seis residuos de histidina adicionales etiquetados en el C-terminal, lo que dio como resultado un rendimiento 3-4 veces superior en comparación con el de la proteína original después de la purificación. La proteína recombinante resultante (TAT-HOXB4H) contiene 6 residuos de histidina en el C-terminal. Este método se describe en detalle en la solicitud de PCT n° PCT/CN2006/000646.

15 Se demostró que la proteína TAT-HOXB4H recombinante se puede utilizar para expandir las células de sangre periférica humana o las células madre de SCU y las células madre expandidas todavía poseen su pluripotencia. Además, se detectaron las células madre tratadas con la proteína TAT-HOXB4H recombinante incorporadas en la médula ósea de leucocitos humanos y de ratones con inmunodeficiencia combinada diabética severa y no obesos (NOD-SCID) en las células blancas de la sangre periférica, lo que indica la reconstitución inmunológica y la hematopoyesis en los ratones.

20 Sin embargo, las proteínas TAT-HOXB4H recombinantes no han sido nunca utilizadas anteriormente como un estimulador de la hematopoyesis *in vivo*, específicamente, para mejorar la reconstitución hematopoyética, la expansión, la repoblación de la médula ósea y para aumentar el número de células madre en circulación periférica, sobre todo después de la quimioterapia o la radiación. Krosi et al. (2003) y Amsellem et al. (2003) no fueron capaces de obtener grandes cantidades de proteína HOXB4 altamente estable para ser utilizada en estudios clínicos para expandir las CMH. En la presente invención, la cantidad total de proteína TAT-HOXB4H obtenida después de la purificación oscila generalmente entre 6 y 10 mg a partir de un cultivo de 1 litro, mientras que la cantidad total de proteína TAT-HOXB4 obtenida después de la purificación de un cultivo de 1 litro utilizando métodos de la técnica anterior generalmente oscila entre 1 y 2 mg. El plásmido pTAT-HA-HOXB4 utilizado para expresar la proteína TAT-HOXB4 utilizando los métodos de la técnica anterior fue un obsequio del Dr. Guy Sauvageau, de la Universidad de Montreal, Canadá. El método de purificación de la proteína TAT-HOXB4H utilizando la presente invención indica claramente el aumento de rendimiento de la proteína necesario para la administración *in vivo*. Krosi et al. (2003) también informaron de que la mayor parte de su proteína TAT-HOXB4 se perdió después de 4 h de incubación en medio con suero. La presente invención muestra una estabilidad significativamente mayor de la proteína TAT-HOXB4H incluso después de 4 semanas, lo cual es un factor clave para el uso de la proteína TAT-HOXB4 en estudios clínicos.

25 Sauvageau et al. (en Genes & Development 9: 1753-1765, 1995) describen el papel de HOXB4 en la proliferación y/o en la diferenciación de las células madre hematopoyéticas. En el artículo mencionado, los estudios de trasplante en serie revelaron la capacidad de las células de médula ósea transducidas con HOXB4 para regenerar el compartimento de células madre hematopoyéticas más primitivas, lo que proporcionó unos números 50 veces superiores de células madre hematopoyéticas totipotenciales trasplantables en recipientes primarios y secundarios en comparación con las células de control.

30 US 2002/086383 A1 (Savageau et al.) describe un método para mejorar la expansión de una población de células madre hematopoyéticas (CMH) administrando una secuencia de aminoácidos que tiene la actividad de un péptido codificado por una secuencia de nucleótida de HOXB4. La secuencia de aminoácido puede consistir en un péptido de HOXB4 como por ejemplo la proteína HOXB4 completa. La solicitud de patente solamente muestra la expansión *in vitro* de CMH administrando la proteína AT-HOXB4 a las células.

35 Krosi et al. (en Nature Medicine 9(11): 1428-1432, 2003) muestra la expansión *in vitro* de células madre hematopoyéticas (CMH) utilizando la proteína TAT-HOXB4, y el trasplante de CMH expandidas para restaurar la hematopoyesis normal en los pacientes. Los resultados mostraron que las poblaciones de CMH expandidas con TAT-HOXB4 retienen su potencial normal *in vivo* para la diferenciación y para la repoblación a largo plazo.

40 La patente EP 1889916A describe la purificación y la producción de la proteína TAT-HOXB4H recombinante utilizando columnas HisTrap, columnas MonoSP y columnas Sephadex PD-10.

Rozema et al. (en J. Amer.Chem. Soc. 117(8): 2373-2374, 1995) describen la utilización de un detergente y de ciclodextrina (como chaperonas artificiales) para el repliegue de proteínas. Rozema et al. también describen la fase de eliminar los compuestos hidrófobos pasando a través de un filtro de 0.22 µm para eliminar agregados de proteína grandes, y una concentración con un filtro de corte de 10 000 MW para eliminar detergente y CD.

Resumen de la Invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas, y se basa en el método de producción nuevo y no obvio de la proteína TAT-HOXB4H con un alto rendimiento y estabilidad, y en el hallazgo de que la proteína TAT-HOXB4H recombinante, cuando se administra a un sujeto en necesidad de la misma, aumenta el número de CMH, tanto en la médula ósea como en la sangre periférica *in vivo*.

Un aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica para su administración *in vivo* con el fin de mejorar la movilización de las CMH de la médula ósea a la sangre periférica a un sujeto en necesidad de las mismas. La composición farmacéutica de la invención incluye una cantidad efectiva de una proteína TAT-HOXB4H que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 4 producida por métodos que comprenden las fases de: (a) proporcionar una célula huésped que comprende un vector que codifica la proteína; (b) expresar la proteína en la célula huésped; (c) recoger una solución impura de la proteína expresada; (d) purificar la proteína de la solución mediante: (i) aplicar la solución a una columna HisTrap (ii) lavar la columna HisTrap ; (iii) eluir la proteína parcialmente purificada de la columna HisTrap con el fin de formar una solución de proteína parcialmente purificada; (iv) aplicar la solución de proteína parcialmente purificada a una columna MonoSP; (v) lavar la columna MonoSP; (vi) eluir la proteína purificada de la columna MonoSP en forma desnaturalizada; (e) replegar la proteína desnaturalizada eluida utilizando compuestos hidrófobos mediante (i) la combinación de la proteína desnaturalizada eluida y una solución de compuestos hidrófobos para formar una solución de proteínas y compuestos hidrófobos; (ii) la desalación de la solución de proteínas y compuestos hidrófobos para obtener una proteína desalada y la solución de compuesto hidrófobo; (iii) la eliminación de los compuestos hidrófobos de la solución de proteína desalada mediante ultrafiltración mediante un tubo de filtro centrífugo o un célula de agitación; y (f) el almacenamiento de la proteína purificada en medio IMDM o en medio DMEM. La proteína producida de este modo es capaz de incrementar el número absoluto de CMH en la médula ósea del sujeto, y mejorar de esta manera la movilización de CMH a la sangre periférica del sujeto.

La composición farmacéutica de la invención se puede utilizar para mejorar el tiempo de recuperación después del trasplante de CMH mediante la administración a un paciente que haya sufrido un trasplante autólogo de CMH.

La composición farmacéutica de la invención se puede utilizar como un sustituto de G-CSF para la movilización de las CMH a la sangre periférica mediante la administración a un paciente insensible al factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

La composición farmacéutica de la invención se puede utilizar para permitir que se recoja una cantidad suficiente de CMH para el trasplante en un procedimiento mucho menos invasivo desde la sangre periférica en lugar de la médula ósea de dicho donante, mediante la administración a un donante de CMH.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica para su utilización para mejorar el tiempo de recuperación de un paciente que ha sido sometido a trasplante de CMH, a radiación o a quimioterapia mediante la administración *in vivo*, en que dicha composición comprende una proteína TAT-HOXB4H que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:4, en que la proteína TAT-HOXB4H es producida mediante un método que comprende las fases de: (a) proporcionar una célula huésped que comprende un vector que codifica la proteína; (b) expresar la proteína en la célula huésped; (c) recoger una solución impura de la proteína expresada; (d) purificar la proteína de la solución mediante: (i) aplicar la solución a una columna HisTrap (ii) lavar la columna HisTrap; (iii) eluir la proteína parcialmente purificada de la columna HisTrap para formar una solución de proteína parcialmente purificada; (iv) aplicar la solución de proteína parcialmente purificada a una columna MonoSP; (v) lavar la columna MonoSP; (vi) eluir la proteína purificada de la columna MonoSP en forma desnaturalizada; (e) replegar la proteína desnaturalizada eluida utilizando compuestos hidrófobos mediante (i) la combinación de la proteína desnaturalizada eluida y una solución de compuestos hidrófobos para formar una solución de proteínas y compuestos hidrófobos; (ii) la desalación de la solución de proteínas y compuestos hidrófobos para obtener una proteína desalada y la solución de compuesto hidrófobo; (iii) la eliminación de los compuestos hidrófobos de la solución de proteína desalada mediante ultrafiltración; y (f) almacenar la proteína purificada en medio IMDM o en medio DMEM.

Breve Descripción de las Figuras

Los aspectos y ventajas anteriores de esta invención pueden resultar evidentes a partir de la siguiente descripción detallada con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

5

La Figura 1 muestra una representación esquemática de la movilización de CMH desde las células CD34⁺ a la sangre periférica (PB) mediante expansión *in vivo*.

10

La Figura 2 muestra la representación esquemática de la construcción y clonación de pTAT-HOXB4H en el vector pET21b modificado.

15

La Figura 3 representa la secuencia de ADN de pTAT-HOXB4H. Los 6 residuos de histidinas adicionales introducidos en los N- y C-terminales en pTAT-HOXB4H están subrayados y TAT se resalta.

20

La Figura 4 muestra la secuencia de proteína de la proteína TAT-HOXB4H.

25

La Figura 5 muestra una demostración de gel de SDS-poliacrilamida al 10% (1.5 mm) de la purificación de la proteína TAT-HOXB4H. El gel de SDS-poliacrilamida se tiñó con azul de Coomassie. Carril 1, marcadores de peso molecular (M), 0.3 µg de proteína; carril 2, lisado de células a partir de células BL21(DE3)pLysS no inducidas que expresan la proteína TAT-HOXB4H, 1 µg de proteína; carril 3, lisado de células a partir de células BL21(DE3)pLysS inducidas que expresan la proteína TAT-HOXB4H con 1 mM de IPTG, 1 µg de proteína; carril 4, TAT-HOXB4H purificada, 0.7 mg de proteína; carril 5, TAT-HOXB4 purificada (0.2 mg de proteína). El plásmido pTAT-HA-HOXB4 que se utilizó para expresar la proteína TAT-HOXB4 (carril 5) fue un obsequio del Dr. Guy Sauvageau, Universidad de Montreal, Canadá. Un volumen igual de fracciones recogido de la columna MonoSP se cargó en los carriles 4 y 5.

30

La Figura 6 muestra el análisis de gel de SDS-poliacrilamida de la estabilidad de la proteína TAT-HOXB4H purificada almacenada en PBS durante 0 horas (A) y 16 horas (B) a 4°C. M representa marcadores de peso molecular, 0 representa 0 horas de incubación a 4°C, 16 representa incubación de 16 horas a 4°C.

35

La Figura 7 muestra la estabilidad de la proteína TAT-HOXB4H almacenada a 4°C y -20°C en PBS y tampón de almacenamiento, IMDM, analizada mediante SDS-poliacrilamida al 10% seguido por tinción con Coomassie. Las flechas indican las bandas de proteína TAT-HOXB4H.

40

La Figura 8A muestra el efecto estimulador de G-CSF en el número de células madre CD34⁺ en la médula ósea de ratones analizado por un citómetro de flujo.

45

La Figura 8B muestra el efecto de PBS en el número de células madre CD34⁺ en la médula ósea de ratones analizado por un citómetro de flujo.

La Figura 8C muestra el efecto estimulador de TAT-HOXB4H en el número de células madre CD34⁺ en la médula ósea de ratones analizado por un citómetro de flujo.

50

La Figura 9A muestra el efecto estimulador de G-CSF en el número de células madre CD34⁺ en la médula ósea de mono rhesus analizado por un citómetro de flujo.

55

La Figura 9B muestra el efecto estimulador de TAT-HOXB4H junto con G-CSF en el número de células madre CD34⁺ en la médula ósea de mono rhesus analizado por un citómetro de flujo.

La Figura 9C muestra el efecto estimulador de TAT-HOXB4H en el número de células madre CD34⁺ en la médula ósea de mono rhesus analizado por un citómetro de flujo.

La Figura 9D muestra el efecto de PBS en el número de células madre CD34⁺ en la médula ósea de mono rhesus analizado por un citómetro de flujo.

60

La Figura 10 muestra el efecto de la proteína TAT-HOXB4H en la recuperación hematopoyética en ratones NOD-SCID.

65

La Figura 11 muestra el efecto de la proteína TAT-HOXB4H en la recuperación hematopoyética en ratones Balb / c después de la quimioterapia con cisplatino.

Descripción Detallada

I. La Proteína TAT-HOXB4H

5 La presente invención se refiere a un método de producción nuevo y no obvio de la proteína TAT-HOXB4H, que proporciona beneficios inesperados de aumento de la estabilidad y el rendimiento, lo que permite la administración *in vivo* de esta proteína. La proteína TAT-HOXB4H es una construcción que comprende tres elementos: TAT, HOXB4, y una etiqueta de histidina. HOXB4 es un miembro de la familia de factores de transcripción HOX y promueve la expansión de CMH. TAT permite que la fracción HOXB4 sea transportada en la célula. La etiqueta de histidina permite aumentar el rendimiento inicial a partir de fuentes de expresión recombinantes, aunque el método de producción aumenta aún más el rendimiento de la proteína. pTAT-HOXB4H se ha construido tal como se muestra en la Figura 2, y la secuencia de ADN se muestra en la Figura 3. La proteína TAT-HOXB4H recombinante se refiere a una proteína de fusión TAT-HOXB4 con seis residuos de histidinas adicionales etiquetados en el C-terminal (Figura 4).

10
15 A menos que se indique lo contrario, la secuencia de aminoácidos de una proteína (es decir, su "estructura primaria" o "secuencia primaria") se puede escribir de amino-terminal a carboxi-terminal. En los sistemas no biológicos (por ejemplo, los que utilizan síntesis en estado sólido), la estructura primaria de una proteína (que también incluye ubicaciones de enlace de disulfuro (cisteína)) puede ser determinada por el usuario.

20 Una "eliminación" se refiere a un cambio en una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos debido a la ausencia de uno o más residuos de aminoácidos o de nucleótidos. Los términos "inserción" o "adición" se refieren a los cambios en una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que tiene como resultado la adición de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, a una molécula o a una representación de la misma, en comparación con una secuencia de referencia, por ejemplo, la secuencia que se encuentra en la molécula de origen natural. Una "sustitución" se refiere a la sustitución de uno o más aminoácidos o nucleótidos por diferentes aminoácidos o nucleótidos, respectivamente.

30 II. Métodos para Preparar la Proteína Recombinante TAT-HOXB4H

A. Clonación y Expresión

35 Los sistemas para la clonación y para expresar proteínas en una variedad de células huésped son conocidos en la técnica. Las células adecuadas para la producción de proteínas se describen en, por ejemplo, Fernández et al. (1999) Gene Expression Systems, Academic Press, eds. En resumen, las células huésped adecuadas incluyen células de mamífero, células de insecto, células vegetales, células de levadura, o células procarióticas, por ejemplo, *E. coli*. Las células de mamíferos disponibles en la técnica para la expresión de proteínas heterólogas incluyen líneas de células linfocíticas (por ejemplo, NSO), células HEK293, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células HeLa, células de riñón de hámster neonato, células de ovocitos, y células de un transgénico animal, por ejemplo, células epiteliales mamarias. Se pueden elegir o construir los vectores adecuados para que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores, y otras secuencias. Los vectores también pueden contener una columna vertebral plásmida o viral. Para más detalles, véase Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Muchas de las técnicas establecidas que se utilizan con vectores, incluyendo la manipulación, preparación, mutagénesis, secuenciación, y transfección de ADN, se describen en Current Protocols in Molecular Biology, Segunda Edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons (1992).

40
45
50 Un aspecto adicional de la descripción proporciona un método para introducir el ácido nucleico en una célula huésped. Para las células eucariotas, las técnicas de transfección adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, con DEAE-Dextrano, electroporación, o transducción mediada por liposomas, y transducción utilizando retrovirus u otros virus, por ejemplo, vaccinia o baculovirus. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación de cloruro de calcio, electroporación, y transfección utilizando bacteriófagos. La introducción de ADN puede ir seguida de un método de selección (por ejemplo, resistencia a fármacos) para seleccionar las células que contienen el ácido nucleico.

60 B. Purificación y Repliegue

La proteína TAT-HOXB4H puede ser aislada inicialmente a partir de la célula huésped recombinante por cualquier medio apropiado conocido en la técnica. Por ejemplo, la proteína se puede extraer a partir del sobrenadante celular, si la proteína es capaz de ser secretada, o la proteína puede ser eliminada de un lisado celular.

La proteína TAT-HOXB4H se puede purificar utilizando los métodos cromatográficos, que comprenden: (a) aplicar el lisado celular o el sobrenadante celular, si la proteína está siendo secretada en la solución, a una columna HisTrap; (b) lavar la columna HisTrap con un tampón; (c) eluir la proteína parcialmente purificada de la columna HisTrap; (d) aplicar la proteína parcialmente purificada obtenida de la columna HisTrap a una columna MonoSP; (e) lavar la columna MonoSP con un tampón; (f) eluir la proteína TAT-HOXB4H purificada de la columna MonoSP.

El lisado celular o el sobrenadante celular, si la proteína es capaz de ser secretada en la solución, se puede aclarar por centrifugación a 20,000 x g durante 30 min a 4°C, con el sobrenadante ajustado a 10 mM de imidazol y cargado en las columnas de quelación HisTrap (Amersham Pharmacia). La columna se puede lavar con 8 M de urea, 20 mM de HEPES, 0.5 mM de DTT, 10 mM de NaCl, pH 8.0 y 10 mM de imidazol para eliminar las proteínas no unidas. La proteína TAT-HOXB4H purificada para ser eluida de la columna HisTrap con alta concentración de imidazol y sal.

Para una purificación adicional, se puede aplicar proteína parcialmente purificada obtenida de la columna HisTrap a la columna MonoSP (Amersham Pharmacia). La columna se puede lavar con 4 M de urea, 20 mM de HEPES, 50 mM de NaCl, pH 6.5 para eliminar las proteínas no unidas. La proteína TAT-HOXB4H enlazada se puede eluir con un alto contenido de sal. La proteína TAT-HOXB4H purificada obtenida a partir de este procedimiento de purificación se encuentra en forma desnaturalizada.

Además, la proteína TAT-HOXB4H desnaturalizada eluida de la columna MonoSP puede replegarse utilizando compuestos hidrófobos mediante (i) la combinación de la proteína desnaturalizada eluida y una solución de compuestos hidrófobos para formar una solución de proteínas y compuestos hidrófobos; (ii) la desalación de la solución de proteínas y compuestos hidrófobos para obtener una proteína desalada y la solución de compuesto hidrófobo; y (iii) la eliminación de los compuestos hidrófobos de la solución de proteína desalada mediante ultrafiltración.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "compuestos hidrófobos" se refiere a cualquiera de los compuestos hidrófobos capaces de proteger la proteína deseada a partir de la formación de agregados insolubles durante el paso de eliminación de la sal de desnaturalización. Los compuestos hidrófobos adecuados para su utilización en la presente invención se describen en Oganeyan et al., *Pharmacogenomics* (2004) 71, 22-26. Los compuestos hidrófobos adecuados incluyen, pero no se limitan a, Triton X-100, tween-20 o compuestos de polibenceno. La ultrafiltración o intercambio de tampón se pueden llevar a cabo mediante un tubo de filtro centrífugo o célula de agitación. Las condiciones para la ultrafiltración o el intercambio de tampón pueden variar, tal como es reconocido por los expertos en la técnica, dependiendo de los tipos de la proteína deseada.

En una realización de la presente invención, el compuesto hidrófobo en la solución que contiene proteína HOXB4H desalada desnaturalizada se elimina mediante 5-10 veces de intercambio de tampón (cada uno realizado por centrifugación a 1000-2500 x g durante 10 min) con una solución que contiene concentraciones bajas a altas de grandes compuestos hidrófobos tales como beta-ciclodextrina, mediante el cual la proteína desnaturalizada HOXB4H se repliega a su forma nativa.

En una realización, la proteína TAT-HOXB4H purificada se puede almacenar en medio IMDM disponible en el mercado (HyClone) (tampón de almacenamiento 1) a 4°C o -20 °C.

En otra realización, la proteína TAT-HOXB4H purificada se puede almacenar en medio DMEM disponible en el mercado (HyClone) (tampón de almacenamiento 2) a 4°C o -20 °C.

En una realización, la etiqueta His en el C-terminal de TAT-HOXB4H se puede eliminar antes de la administración *in vivo*.

En otra realización la etiqueta His en el N-terminal de TAT-HOXB4H se puede eliminar antes de la administración *in vivo*.

En otra realización las dos etiquetas His en los N y C-terminales se pueden eliminar antes de la administración *in vivo*.

C. Preparación de una Composición Farmacéutica

TAT-HOXB4H se puede utilizar como una composición farmacéutica cuando se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede contener, además de la proteína TAT-HOXB4H y el vehículo, diversos diluyentes, rellenos, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes, y otros materiales bien conocidos en la técnica. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del/de los ingrediente(s) activo(s). Las características del vehículo pueden depender de la vía de administración.

5 Resulta especialmente ventajoso formular composiciones en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformizar la dosificación. Forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adaptadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad conteniendo una cantidad predeterminada de compuesto activo
10 requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas por y dependen directamente de las características exclusivas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de componer dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

15 Las vías habituales de administración incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral (por ejemplo, sublingual o bucal), sublingual, rectal, vaginal, e intranasal. El término parenteral tal como se utiliza en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intratecal, intrameatal, intrauretral o técnicas de infusión. La composición farmacéutica se formula para permitir que los ingredientes activos contenidos en la misma se encuentren biodisponibles
20 después de la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se pueden administrar a un paciente toman la forma de una o más unidades de dosificación, donde por ejemplo, un comprimido puede ser una sola unidad de dosificación, y un contenedor de uno o más compuestos de la invención en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación.

25 Cuando se administra oralmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína TAT-HOXB4H, el agente de unión puede ser en forma de una tableta, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener adicionalmente un vehículo sólido como por ejemplo una gelatina o un adyuvante. La tableta, cápsula y polvo contiene aproximadamente desde un 5 a un 95% de agente de unión y preferiblemente
30 aproximadamente desde un 25 a 90% de agente de unión. Los ejemplos son sacarosa, caolín, glicerina, dextrinas de almidón, alginato de sodio, carboximetilcelulosa y etilcelulosa. Pueden encontrarse presentes agentes colorantes y / o aromatizantes. Se puede emplear una cáscara de revestimiento. Cuando se administra en forma líquida, se puede añadir un vehículo líquido como por ejemplo agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal como por ejemplo aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soja o aceite de sésamo, o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener además solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido, o glicoles como por ejemplo etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica
35 contiene aproximadamente desde un 0.5 a un 90% en peso del agente de unión, y preferiblemente de aproximadamente 1 a 50% del agente de unión.

40 Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína TAT-HOXB4H se administra por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente de unión puede ser en forma de una solución acuosa libre de pirógenos, parenteralmente aceptable. La preparación de dichas soluciones de proteína parenteralmente aceptables, teniendo en cuenta el pH, la isotonicidad, la estabilidad y similares, entra dentro de los conocimientos en la técnica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea puede contener, además de agente de unión, un vehículo isotónico como por ejemplo inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, inyección de Lactato de Ringer, u otro vehículo tal como es conocido en la técnica. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener
45 estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes, u otro aditivo conocido por los expertos en la técnica.

50 En la práctica del método de tratamiento o utilización de la presente invención, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína TAT-HOXB4H a un sujeto, por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, un ser humano). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o método que resulta suficiente para mostrar un beneficio significativo del paciente, por ejemplo, mejora de los síntomas, curación, o aumento en la tasa de curación de dichas condiciones. Cuando se aplica a un
55 ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, si se administra en combinación, en serie o simultáneamente.

60 La cantidad de proteína TAT-HOXB4H en la composición farmacéutica de la presente invención puede depender de la naturaleza y la gravedad de la afección a tratar, y de la naturaleza de tratamientos anteriores que el paciente ha experimentado, y de la edad y sexo del paciente. En última instancia, el médico tratante puede decidir la cantidad de ingrediente activo con el que tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico tratante puede administrar dosis bajas de ingrediente activo y observar la respuesta del paciente. Pueden administrarse dosis más grandes de ingrediente activo hasta que se obtenga el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese punto la dosis no se incrementa más en
65 general. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas utilizadas para practicar el método de la presente invención pueden contener aproximadamente entre 1 μ g a aproximadamente 1 mg de

proteína TAT-HOXB4H por kg de peso corporal. Se pueden elegir ejemplos de intervalos de dosificación que se pueden administrar a un sujeto a partir de: 1 µg / kg a 1 mg / kg, 1 µg / kg a 0.5 mg / kg, 1 µg / kg a 0.1 mg / kg, 10 µg / kg a 0.5 mg / kg, 10 µg / kg a 0.1 mg / kg, 100 µg a 0.5 mg / kg, 250 µg / kg y 0.5 mg / kg. Además, se pueden elegir ejemplos de intervalos de dosificación a partir de: 50 µg hasta 100 mg, 100 µg a 50 mg, 500 µg a 50 mg, 1 mg a 50 mg. La duración de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica de la presente invención puede variar, dependiendo de la gravedad de la enfermedad a tratar y de las condiciones y la potencial respuesta idiosincrásica de cada paciente individual. En una realización, se contempla que la duración de cada aplicación de la proteína TAT-HOXB4H puede estar en el intervalo de 12 a 24 horas de administración intravenosa continua. En otra realización, la duración de la aplicación de la proteína TAT-HOXB4H puede durar mientras continúe la radiación o la quimioterapia del paciente. La proteína TAT-HOXB4 se puede administrar en el intervalo de 10 a 100 µg / kg por vía intravenosa, dos veces al día durante 4.5 a 5 días. Un ciclo del tratamiento puede ser suficiente para expandir las CMH *in vivo*. En última instancia el médico tratante puede decidir sobre la duración apropiada de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica de la presente invención.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀ / ED₅₀. Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar en la evaluación de un intervalo de dosificación para su utilización en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos puede estar dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La dosis terapéuticamente eficaz de TAT-HOXB4H se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante en plasma que incluye el IC₅₀ (es decir, la concentración de la proteína de prueba que logra una inhibición media máxima de los síntomas) tal como se determina en cultivo celular. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Los efectos de cualquier dosificación particular se pueden monitorizar mediante un bioensayo adecuado. Los ejemplos de bioensayos adecuados incluyen, pero no se limitan a, la medición de células madre CD34⁺ en la célula mononuclear mediante el uso de anticuerpos etiquetados con sonda fluorescente (por ejemplo, FITC) para células madre CD34⁺ y midiendo el porcentaje de células LY5 en las CMH de la sangre periférica o en la médula ósea por citometría de flujo. Se espera que el polinucleótido y las proteínas de la presente invención muestren uno o más de las utilidades o actividades biológicas (incluyendo las asociadas con ensayos citados en el presente documento) que se identifican a continuación. Las utilidades o actividades descritas para las proteínas de la presente invención pueden proporcionarse mediante la administración o uso de dichas proteínas o mediante la administración o utilización de polinucleótidos que codifican dichas proteínas (tales como, por ejemplo, en terapias o vectores genéticos adecuados para la introducción de ADN).

III. Utilización *In Vivo* para Estimular la Hematopoyesis

A. Pacientes en Necesidad de Tratamiento

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden utilizar para tratar enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos autoinmunes, trastornos de inmunodeficiencia, y trastornos hematológicos. Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden utilizar para mejorar el tiempo de recuperación después del trasplante de CMH.

Las utilidades de la composición farmacéutica de la invención incluyen, pero no se limitan a, métodos para el tratamiento de paciente que sufre de o es susceptible a linfomas, leucemias, enfermedad de Hodgkin y trastornos mieloproliferativos. Además, enfermedades hereditarias causadas por la deficiencia de CMH y anemia aplásica pueden ser tratadas por la composición farmacéutica de la presente invención.

Asimismo, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser administrada a los donantes de CMH y a los pacientes insensibles a G-CSF.

En una realización de la invención, TAT-HOXB4H es el único agente activo administrado para la movilización de las CMH, y no se administra fluorouracilo (5-FU) al donante, ya sea como tratamiento previo o como un esquema de terapia de combinación.

Otras enfermedades o condiciones asociadas con un aumento de la supervivencia celular, que pueden ser tratados por la composición farmacéutica de la invención incluyen, pero no se limitan a, progresión, y / o metástasis de tumores malignos y trastornos relacionados tales como leucemia (incluyendo leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda (incluyendo mieloblástica,

promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por ejemplo, mielocítica crónica (granulocítica) crónica y leucemia linfocítica crónica)), síndrome mielodisplásico, policitemia vera, linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad de no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, y tumores sólidos incluyendo, pero no limitado a, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, vejiga carcinoma, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma.

La presente invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales y reactivos particulares que se describen a continuación. La terminología utilizada para describir formas de realización particulares no está destinada a limitar el alcance de la presente invención, que puede ser limitada sólo por las reivindicaciones adjuntas. En la presente memoria, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencia plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" es una referencia a una o más células e incluye equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la técnica.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado tal como lo entiende comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar cualquiera de los métodos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la invención, a continuación se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

Definiciones

Una "célula madre" es una célula pluripotente o multipotente con la capacidad de auto-renovarse, de permanecer indiferenciada, y de llegar a ser diferenciada. Las células madre pueden dividirse sin límite, al menos durante toda la vida del animal en el que residen de forma natural. Las células madre no están diferenciadas en los terminales, es decir, no se encuentran en el extremo de una vía de diferenciación. Cuando una célula madre se divide, cada célula hija puede o bien seguir siendo una célula madre o puede embarcarse en un proceso que conduce a la diferenciación terminal. Una célula madre "quimérica" es una célula madre con una parte de su ADN que pertenece a un organismo heterólogo.

Una célula "hematopoyética" es una célula implicada en el proceso de la hematopoyesis, es decir, el proceso de formación de células sanguíneas maduras a partir de células precursoras. En un adulto, la hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea. En una fase más temprana del desarrollo, la hematopoyesis tiene lugar en diferentes lugares durante diferentes etapas de desarrollo; surgen células sanguíneas primitivas en el saco vitelino, y más tarde, se forman células sanguíneas en el hígado, el bazo y la médula ósea. La hematopoyesis se somete a una regulación compleja, incluyendo la regulación de hormonas, por ejemplo, la eritropoyetina; factores de crecimiento, por ejemplo, factores estimulantes de colonias; y citoquinas, por ejemplo, interleucinas.

El término "vector", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. En el presente documento, dichos vectores se denominan como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante se encuentran a menudo en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, como por ejemplo vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.

"Transformación", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, independientemente del método utilizado para la inserción: por ejemplo, transformación mediante captación directa, transfección, infección, y similares. Para los métodos particulares de transfección, véase más adelante. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un episoma, o alternativamente, puede integrarse en el genoma del huésped.

En general, el término "proteína" se refiere a cualquier polímero de dos o más aminoácidos individuales (ya sea o no de origen natural) unidos a través de enlaces peptídicos, tal como ocurre cuando el átomo de carbono carboxilo del grupo de ácido carboxílico unido al α -carbono de un aminoácido (o al resto de aminoácido) se convierte en unido covalentemente con el átomo de amino nitrógeno del grupo amino unido al α -carbono de un aminoácido adyacente. Estos vínculos de enlace peptídico, y los átomos que los contienen (es decir, los átomos de α -carbono, los átomos de carbono carboxilo (y sus átomos de sustituyente de oxígeno), y los átomos de amino nitrógeno (y sus átomos de sustituyente de hidrógeno)) forman la "columna vertebral de polipéptido" de la proteína. Además, tal como se utiliza en el presente documento, el término "proteína" se entiende que incluye los términos "polipéptido" y "péptido" (que, a veces, pueden utilizarse indistintamente en la presente memoria). Del mismo modo, en el presente documento los fragmentos de proteínas, análogos, derivados y variantes se pueden denominar "proteínas", y se les considerará como una "proteína" a menos que se indique lo contrario. El término "fragmento" de una proteína se refiere a un polipéptido que comprende menos de todos los residuos de aminoácidos de la proteína. Tal como se puede apreciar, un "fragmento" de una proteína puede ser una forma de la proteína truncada en el extremo amino, el extremo carboxi terminal, y / o internamente (como por ejemplo, por corte y empalme natural), y también puede ser variante y / o derivada. Un "dominio" de una proteína es también un fragmento, y comprende los residuos de aminoácidos de la proteína necesarios para conferir una actividad bioquímica que corresponde a la proteína de origen natural.

"Recombinante" tal como se utiliza en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico, significa un polinucleótido de origen genómico, de cADN, viral, semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación no está asociado con todo o con una parte del polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza. El término "recombinante" tal como se utiliza con respecto a una proteína o a un polipéptido significa un polipéptido producido mediante la expresión de un polinucleótido recombinante.

Una molécula "aislada", "purificada", "sustancialmente aislada" o "sustancialmente pura" (como por ejemplo un polipéptido o un polinucleótido) es una molécula que se ha manipulado para existir en una concentración mayor de la que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, una proteína sujeta es aislada, purificada, sustancialmente aislada, o sustancialmente purificada cuando al menos un 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de los materiales de la proteína no sujeta con los que está asociada en la naturaleza han sido eliminados. Tal como se utiliza en el presente documento, una molécula "aislada", "purificada", "sustancialmente aislada" o "sustancialmente purificada" incluye moléculas recombinantes.

Un "ratón con SCID" es un modelo de ratón para el síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SCID), que causa graves defectos en el desarrollo del sistema inmunológico. Estos ratones son deficientes en, o carecen completamente de, los linfocitos T y B. La mutación del SCID parece dañar la recombinación de genes del receptor de antígeno, causando una falta de linfocitos T y B funcionales. Otros tipos de células hematopoyéticas parecen desarrollarse y funcionar normalmente. Los ratones con SCID soportan fácilmente la diferenciación de linfocitos normales y pueden reconstituirse con linfocitos normales de singénico o alogénico de ratones, o con linfocitos humanos. Estos ratones también soportan el crecimiento de tumores alogénicos y xenogénicos. Por lo tanto, los ratones con SCID, que permiten el crecimiento diseminado de un cierto número de tumores humanos, en particular los trastornos hematológicos y el melanoma maligno, se pueden utilizar para investigar tumores malignos.

Los términos "sujeto", "individuo", "huésped" y "paciente" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un animal vivo, incluyendo un ser humano y un animal no humano. El sujeto puede, por ejemplo, ser un organismo que posee las células inmunes capaces de responder a la estimulación antigénica, y a la transducción de señales de estimulación e inhibición a través de la unión de receptores de superficie celular. El sujeto puede ser un mamífero, como por ejemplo un mamífero humano o no humano, por ejemplo, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, cabras, caballos, ratas y ratones. El término "sujeto" no excluye a los individuos que son completamente normales con respecto a una enfermedad, o normales en todos los aspectos.

El término "tratamiento" se refiere a una medida terapéutica o preventiva. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que tiene un trastorno médico o que en última instancia puede adquirir el trastorno, con el fin de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de, o mejorar uno o más síntomas de un trastorno o de un trastorno recurrente, o con el fin para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad del compuesto sujeto que puede provocar una respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal, o ser humano que se busca, por ejemplo, por parte de un investigador, un veterinario, un doctor en medicina, u otro médico.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos se deben interpretarse como meramente ilustrativos, y no limitativo del resto de la descripción en modo alguno.

Ejemplo 1: Construcción del Plásmido pET21b-His-pTAT-HOXB4-His

(a) La modificación del plásmido pET21b que contiene etiqueta His de N y C terminales y péptido de señal TAT.

El vector de expresión pET21b que contiene etiqueta His N-terminal y un péptido de señal TAT se generó mediante la inserción de oligonucleótidos

5'-TATGCACCACCACCACCACCACCTACGGCCGCAAGAAACGCCGCCAGCGCCG CCGGCG-3' (sentido) y 5'-CTAGCGGCGCTGGCGGCGTTTCTTGCGGCC GTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC-3'(antisentido) en el plásmido pET21b. La etiqueta His C-terminal ya se encuentra presente en el vector pET21b.

(b) Clonación de HOXB4 en vector de expresión pET21b modificado

Un fragmento de ADN que contiene el marco de lectura abierto (ORF) de HOXB4 y una secuencia de codificación de 6 histidinas adicionales se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando el plásmido MGC54130 (GeneDiscovery, Taipei, Taiwan. Cat. N° 5533346) como modelo, y el fragmento de cADN HOXB4 generado por PCR se subclonó en el vector de expresión pET21b modificado. La construcción del plásmido y las secuencias de ácido nucleico se muestran en las Figuras 2 y 3.

Ejemplo 2: Expresión de la Proteína Recombinante TAT-HOXB4H en *E. coli*

El vector de expresión pET21b-His-TAT-HOXB4-His se transformó en cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen). Las células transformadas se hicieron crecer durante la noche a 37 °C. Los cultivos cultivados durante una noche se diluyeron a una OD600 inicial de 0.05. Los cultivos se hicieron crecer hasta una OD600 de 0.5 a 37 °C, inducidos con 1 mM de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 37 °C durante 3 horas, con agitación vigorosa.

Ejemplo 3: Purificación de la Proteína Recombinante TAT-HOXB4H

A continuación de la inducción, las células fueron cosechadas por centrifugación y se re-suspendieron en Tampón A (8 M de Urea, 20 mM de HEPES, 0.5 mM de DTT y 100 mM de NaCl, pH 8.0). La suspensión celular se pasó tres veces a través de una prensa francesa, y el lisado celular fue aclarado por centrifugación a 20,000 x g durante 30 min a 4 °C, se ajustó el sobrenadante a 10 mM de imidazol y se cargó en las columnas de quelación HisTrap (Amersham Pharmacia). Las proteínas unidas se eluyeron con 50, 100 y 250 mM de imidazol en tampón A. Las fracciones que contenían TAT-HOXB4H se cargaron en una columna MonoSP en Tampón B (4 M de urea, 20 mM de HEPES y 50 mM de NaCl, pH 6.5), eluido con 1.5 M de NaCl y 20 mM de HEPES (pH 8.0).

Ejemplo 4: Re-Naturalización de la Proteína Recombinante TAT-HOXB4H

La proteína TAT-HOXB4H en las fracciones eluidas se solubilizó y se desnaturalizó en una solución que contenía sal desnaturalizante (por ejemplo, hidrocloreto de guanidina) y a continuación se mezcló con tampón de D-PBS-T (0.1% de Triton X-100 en 2x PBS). La relación de la solución de proteína TAT-HOXB4H por tampón D-PBS-T fue de 1:4. La mezcla resultante se añadió a un tubo de filtro centrífugo de 10K (50 ml o 15 ml) pretratado con agua (10 ml o 3 ml), y a continuación se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. En este paso, la sal de desnaturalización se sustituye por tampón de D-PBS-T en el que Triton X-100 es capaz de unirse con la región hidrófoba de la proteína HOXB4H.

Esta etapa de ultrafiltración o de intercambio de tampón utilizando un tubo de filtro centrífugo de 10K se realizó diez veces con una solución que contenía diferentes concentraciones de beta-ciclodextrina (dos veces de cada una de 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM y 5 mM de beta-ciclodextrina en tampón de almacenamiento IMDM por centrifugación a 1000-2500 x g durante 10 min. Se recogió la muestra restante en el tubo de filtro centrífugo de 10K y se almacenó a -80 °C.

La homogeneidad de la proteína TAT-HOXB4H purificada se analizó mediante gel de SDS-poliacrilamida seguido por tinción de Coomassie (Figura 5). Tal como se muestra en la Figura 5, la TAT-HOXB4H purificada a partir de HisTrap y MonoSP dio como resultado un rendimiento 3-4 veces superior en comparación con el de la proteína TAT-HOXB4. El plásmido pTAT-HA-HOXB4 fue un obsequio del Dr. Guy Sauvageau, Universidad de Montreal, Canadá. Este plásmido se transformó en BL21(DE3)pLysS (Novagen) y la purificación de la proteína TAT-HOXB4 se realizó tal como se describe en Krosi et al, 2003.

Ejemplo 5: Estabilidad de la Proteína Recombinante TAT-HOXB4H

La estabilidad de la proteína TAT-HOXB4H se midió por análisis en gel de SDS-poliacrilamida. A través de la conservación, la TAT-HOXB4H completa puede ser degradada en fragmentos de 30 kD y 10 kD. Tal como se muestra en la Figura 6, la proteína TAT-HOXB4H producida por el método de esta invención se mantuvo estable incluso después de 16 horas almacenada en PBS a 4 °C.

Además, la estabilidad de la proteína TAT-HOXB4H almacenada a 4 °C y -20 °C en PBS y tampón de almacenamiento IMDM se analizó por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% seguido por tinción con Coomassie. Tal como se muestra en la Figura 7, cuando se utilizó IMDM como tampón de almacenamiento, la estabilidad de la proteína TAT-HOXB4H se mantuvo incluso después de 4 semanas.

Ejemplo 6: Efecto de la Proteína Recombinante TAT-HOXB4H sobre la Hematopoyesis en Ratones Balb / c de Tipo Salvaje

Los ratones Balb / c se utilizan para investigar el posible efecto de la proteína TAT-HOXB4H recombinante en la movilización de células madre hematopoyéticas de la médula ósea a la sangre periférica. La proteína recombinante TAT-HOXB4H en solución salina tamponada con fosfato (PBS) se administró por inyección subcutánea cuatro veces al día durante 4 días. Para examinar la respuesta a la dosis, los grupos experimentales (n = 21) recibieron una dosis que oscilaba entre 1 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg, . . . hasta 100 µg por kg de peso corporal por ratón. Un grupo separado de ratones de control recibieron solución salina tamponada de fosfato solamente, y otro grupo de ratones de control fueron inyectados por vía subcutánea dos veces al día durante 4 días con una dosis de 5 µg por kg de peso corporal de G-CSF por ratón.

Se recogió la sangre periférica de todos los ratones y se analizó mediante un citómetro de flujo para obtener el porcentaje de células madre CD34⁺ en células mononucleares (MNC). Los resultados se presentan como la media ± s.d. en la Tabla 1.

Tabla 1

Grupo (Experimental / Control)	TAT-HOXB4H ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CD34 ⁺ /MNC (%)
1	1	0 \pm 0.03
2	5	0.3 \pm 0.05
3	10	0.45 \pm 0.03
4	15	0.42 \pm 0.01
5	20	0.38 \pm 0.05
6	25	0.41 \pm 0.02
7	30	0.35 \pm 0.21
8	35	0.33 \pm 0.11
9	40	0.29 \pm 0.16
10	45	0.46 \pm 0.01
11	50	0.45 \pm 0.02
12	55	0.42 \pm 0.06
13	60	0.44 \pm 0.02
14	65	0.41 \pm 0.04
15	70	0.41 \pm 0.03
16	75	0.49 \pm 0.01
17	80	0.45 \pm 0.04
18	85	0.46 \pm 0.07
19	90	0.44 \pm 0.02
20	95	0.41 \pm 0.01
21	100	0.42 \pm 0.05
Control (PBS)	0	0.002
Control (G-CSF)	0	0.5 \pm 0.03

5 El porcentaje cosechado de células CD34⁺ / MNC en sangre periférica de los ratones tratados se muestra en la Tabla 1. Los grupos experimentales 3-21 tratados con TAT-HOXB4H (que recibieron una dosis de 10 μg o más por kg de peso corporal) mostraron sustancialmente el mismo efecto de movilización que el grupo de control tratado con G-CSF.

10 La médula ósea de los ratones tratados con TAT-HOXB4H (el Grupo Exp. 3 recibió una dosis de 10 μg por kg de peso corporal), de los ratones tratados con G-CSF, y de los ratones inyectados con PBS fue fenotipado todavía más utilizando anticuerpo conjugado con FITC a CD34⁺ (Becton Dickinson) y fue analizado mediante un citómetro de flujo. La médula ósea de ratones tratados con TAT-HOXB4H (Figura 8C) parece ser más rica en células madre CD34⁺ que la médula ósea de ratones inyectados con G-CSF (Figura 8A) y PBS (Figura 8B). Por lo tanto, estos resultados indican que la inyección de proteínas TAT-HOXB4H recombinante da como resultado un aumento del número de CMH tanto en la médula ósea
15 como en la sangre periférica en ratones.

Ejemplo 7: Efecto de la Proteína Recombinante TAT-HOXB4H sobre la Hematopoyesis en el Mono Rhesus

Se utilizaron monos rhesus macho adultos para investigar la eficacia de la proteína TAT-HOXB4H recombinante en monos. El grupo experimental I (n = 5) fue inyectado por vía intravenosa con 10 µg por kg de peso corporal de la proteína TAT-HOXB4H recombinante cuatro veces al día durante 4 días. El grupo experimental II (n = 5) fue inyectado por vía intravenosa con 10 µg por kg de peso corporal de TAT-HOXB4H cuatro veces al día y fue inyectado por vía subcutánea con 5 µg por kg de peso corporal de G-CSF durante 4 días. El grupo de control I recibió PBS solamente, y el grupo de control II fue inyectado por vía subcutánea dos veces al día durante 4 días con una dosis de 5 µg por kg de peso corporal de G-CSF. Se recogió la sangre periférica de todos los monos y se analizó mediante un citómetro de flujo para obtener el porcentaje de células madre CD34⁺ en células mononucleares (MNC). Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

Grupo (Experimental / Control)	CD34 ⁺ /MNC (%)
I. TAT-HOXB4H (10 µg/kg)	0.62
II. TAT-HOXB4H (10 µg/kg) + G-CSF (5 µg/kg)	0.38
Control 1 (PBS)	0.07
Control 2 (G-CSF, 5 µg/kg)	0.28

Tal como se muestra en la Tabla 2, los monos (grupo experimental I) tratados con TAT-HOXB4H sólo mostraron un efecto de movilización significativamente mejor que los monos tratados con G-CSF (grupo de control II). Los monos tratados con TAT-HOXB4H y G-CSF (grupo experimental II) mostraron un efecto de movilización ligeramente mejor que los monos tratados con G-CSF (grupo de control II).

Las muestras de médula ósea de monos tratados con TAT-HOXB4H, G-CSF o PBS fueron fenotipadas adicionalmente usando anticuerpo conjugado con FITC a CD34⁺ (Becton Dickinson) y se analizaron mediante un citómetro de flujo. Los especímenes de médula ósea de monos tratados con TAT-HOXB4H (Figura 9C) aparecen como significativamente más ricos en células madre CD34⁺ que los especímenes de médula ósea de monos inyectados con G-CSF (Figura 9A), TAT-HOXB4H + G-CSF (Figura 9B) y PBS (Figura 9D).

Ejemplo 8: Efecto de la Proteína Recombinante TAT-HOXB4H en la Recuperación Hematopoyética en Ratones NOD-SCID

10⁴ células Lin⁻ / CD34⁺ humanas fueron inyectadas en ratones irradiados (2,5 Gy) NOD-LtSz-scid / scid (NOD-SCID), junto con 10⁵ células accesorias irradiadas CD34⁻. Los ratones se dividieron en dos grupos de forma aleatoria: un grupo (n = 28) fue inyectado por vía intravenosa con 10 µg por kg de peso corporal de la proteína TAT-HOXB4H recombinante dos veces al día, y el otro (n = 28) recibió PBS dos veces al día. La presencia de células humanas CD45⁺ en las células de sangre periférica de todos los ratones se midió periódicamente por citometría de flujo después del trasplante. La recuperación hematopoyética se evaluó como el número de ratones cuyas células CD45⁺ humanas alcanzaron niveles de > 0.1% en la sangre periférica (PB) después del trasplante. Tal como se muestra en la Figura 10, se observó una mejora en la recuperación hematopoyética en los ratones inyectados con la proteína TAT-HOXB4H recombinante.

Ejemplo 9: Efecto de la Proteína Recombinante TAT-HOXB4H en la Recuperación Hematopoyética en Ratones Balb / c después de Quimioterapia con Cisplatino

Ratones Balb / c de 5 semanas de edad fueron inyectados por vía intravenosa varias veces con cisplatino hasta que el número de células Ly5 (murinas CD45) en la sangre periférica de los ratones disminuyeron a aproximadamente un 10% del número original. Los ratones tratados con cisplatino se dividieron en dos grupos aleatorios: un grupo (n = 28) fueron inyectados por vía intravenosa con 10 µg por kg de peso corporal de la proteína TAT-HOXB4H recombinante dos veces al día, y el otro (n = 28) recibió PBS dos veces por día. La presencia de células Ly5 en las células de sangre periférica de todos los ratones se midió periódicamente por citometría de flujo después del trasplante. La tasa de recuperación hematopoyética se evaluó como el porcentaje del número de células Ly5 en la sangre periférica con respecto al número original. Tal como se muestra en la Figura 11, se observó una mejora en la recuperación hematopoyética en los ratones inyectados con la proteína TAT-HOXB4H recombinante.

ES 2 567 780 T3

Los modelos animales utilizados en estos experimentos han sido reconocidos en la técnica como predictivos de los resultados que se obtendrán en pacientes humanos. Véase, por ejemplo, Broxmeyer et al. (2005) The Journal of Experimental Medicine, 201, 1307-1318; Larochelle et al. (2006) Blood 107, 3772-3778.

<110> Taiwan Advance Bio-Pharm Inc.
 <120> Método para la producción de proteína TAT-HOXB4H recombinante para su utilización como estimulante de la hematopoyesis in vivo
 <130> P49051
 <140>
 <141> 2008-03-31
 <150> US 12/042,097
 <151> 2008-03-04
 <160> 4
 <210> 1
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400>

TATGCACCAC CACCACCACC ACTACGGCCG CAAGAAACGC CGCCAGCGCC 50
GCCGGCG 57

<210> 2
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400>

CTAGCGGCGC TGGCGGCGTT TCTTGC GGCC GTAGTGGTGG TGGTGGTGGT 50
GCA 53

<210> 3
 <211> 840
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400>

ATGCACCACC ACCACCACCA CTACGGCCGC AAGAAACGCC GCCAGCGCCG 50
CCGCGCTAGC ATGGCTATGA GTTCTTTTTT GATCAACTCA AACTATGTCG 100
ACCCCAAGTT CCCTCCATGC GAGGAATATT CACAGAGCGA TTACCTACCC 150
AGCGACCACT CGCCCGGGTA CTACGCCGGC GGCCAGAGGC GAGAGAGCAG 200
CTTCCAGCCG GAGGCGGGCT TCGGGCGGCG CGCGGCGTGC ACCGTGCAGC 250
GCTACGCGGC CTGCCGGGAC CCTGGGCCCC CGCCGCCCTCC GCCACCACCC 300
CCGCCGCCCC CGCCACCGCC CGGTCTGTCC CCTCGGGCTC CTGCGCCGCC 350
ACCCGCCGGG GCCCTCCTCC CGGAGCCC GG CCAGCGCTGC GAGGCGGTCA 400
GCAGCAGCCC CCCGCCGCTT CCCTGCGCCC AGAACCCCT GCACCCAGC 450
CCGTCCCACT CCGCGTGCAA AGAGCCCGTC GTCTACCCCT GGATGCGCAA 500
AGTTCACGTG AGCACGGTAA ACCCAATTA CGCCGGCGGG GAGCCCAAGC 550
GCTCTCGGAC CGCTACACG CGCCAGCAGG TCTTGGAGCT GGAGAAGGAA 600
TTTCACTACA ACCGTACCT GACACGGCGC CGGAGGGTGG AGATCGCCCA 650
CGCGCTCTGC CTCTCCGAGC GCCAGATCAA GATCTGGTTC CAGAACC GGC 700
GCATGAAGTG GAAAAAAGAC CACAAGTTGC CCAACACCAA GATCCGCTCG 750
GGTGGTGC GG CAGGCTCAGC CGGAGGGCCC CCTGGCCGGC CCAATGGAGG 800
CCCCCGCGCG CTCTCGAGC ACCACCACCA CCACCCTGA 840

<210> 4
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<400>

Met	His	His	His	His	His	His	Tyr	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln
1				5					10					15
Arg	Arg	Arg	Ala	Ser	Met	Ala	Met	Ser	Ser	Phe	Leu	Ile	Asn	Ser
				20					25					30
Asn	Tyr	Val	Asp	Pro	Lys	Phe	Pro	Pro	Cys	Glu	Glu	Tyr	Ser	Gln
				35					40					45
Ser	Asp	Tyr	Leu	Pro	Ser	Asp	His	Ser	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Gly
				50					55					60
Gly	Gln	Arg	Arg	Glu	Ser	Ser	Phe	Gln	Pro	Glu	Ala	Gly	Phe	Gly
				65					70					75
Arg	Arg	Ala	Ala	Cys	Thr	Val	Gln	Arg	Tyr	Ala	Ala	Cys	Arg	Asp
				80					85					90
Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
				95					100					105
Pro	Pro	Gly	Leu	Ser	Pro	Arg	Ala	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Gly
				110					115					120
Ala	Leu	Leu	Pro	Glu	Pro	Gly	Gln	Arg	Cys	Glu	Ala	Val	Ser	Ser
				125					130					135
Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Cys	Ala	Gln	Asn	Pro	Leu	His	Pro	Ser
				140					145					150
Pro	Ser	His	Ser	Ala	Cys	Lys	Glu	Pro	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Met
				155					160					165
Arg	Lys	Val	His	Val	Ser	Thr	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr	Ala	Gly	Gly
				170					175					180
Glu	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Thr	Ala	Tyr	Thr	Arg	Gln	Gln	Val	Leu
				185					190					195
Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe	His	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Arg
				200					205					210
Arg	Arg	Val	Glu	Ile	Ala	His	Ala	Leu	Cys	Leu	Ser	Glu	Arg	Gln
				215					220					225
Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys	Asp
				230					235					240
His	Lys	Leu	Pro	Asn	Thr	Lys	Ile	Arg	Ser	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly
				245					250					255
Ser	Ala	Gly	Gly	Pro	Pro	Gly	Arg	Pro	Asn	Gly	Gly	Pro	Arg	Ala
				260					265					270
Leu	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His	Ter					
				275					280					

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición farmacéutica para la administración *in vivo* para mejorar la movilización de Células Madre Hematopoyéticas (CMH) desde la médula ósea a la sangre periférica, que comprende una proteína TAT-HOXB4H que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, en que la proteína TAT-HOXB4H es producida a través de un método que comprende:
- 10 (a) proporcionar una célula huésped que comprende un vector que codifica la proteína;
 (b) expresar la proteína en la célula huésped;
 (c) recoger una solución impura de la proteína expresada;
 (d) purificar la proteína de la solución mediante:
- 15 (i) aplicar la solución a una columna HisTrap;
 (ii) lavar la columna HisTrap;
 (iii) eluir la proteína parcialmente purificada de la columna HisTrap para formar una solución de proteína parcialmente purificada;
 (iv) aplicar la solución de proteína parcialmente purificada a una columna MonoSP;
 (v) lavar la columna MonoSP;
 (vi) eluir la proteína purificada de la columna MonoSP;
- 20 (e) replegar la proteína desnaturalizada eluida utilizando compuestos hidrófobos mediante:
- 25 (i) la combinación de la proteína desnaturalizada eluida y una solución de compuestos hidrófobos para formar una solución de la proteína y compuestos hidrófobos, en que los compuestos hidrófobos son capaces de proteger la proteína TAT-HOXB4H de la formación de agregados insolubles durante la fase de eliminación de sal de desnaturalización;
 (ii) la desalación de la solución de la proteína y compuestos hidrófobos para obtener una proteína desalada y una solución de compuesto hidrófobo;
 (iii) la eliminación de los compuestos hidrófobos de la solución de la proteína desalada utilizando ultrafiltración mediante un tubo de filtro centrífugo o una célula de agitación; y
- 30 (f) el almacenamiento de la proteína purificada en medio IMDM o en medio DMEM.
- 35 2. Una composición farmacéutica para su utilización en un método para mejorar el tiempo de recuperación de un paciente que ha sido sometido a trasplante de CMH, radiación o quimioterapia mediante administración *in vivo*, en que dicha composición comprende una proteína TAT-HOXB4H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 en que la proteína TAT-HOXB4H es producida por un método que comprende:
- 40 (a) proporcionar una célula huésped que comprende un vector que codifica la proteína;
 (b) expresar la proteína en la célula huésped;
 (c) recoger una solución impura de la proteína expresada;
 (d) purificar la proteína de la solución mediante:
- 45 (i) aplicar la solución impura a una columna HisTrap;
 (ii) lavar la columna HisTrap;
 (iii) eluir la proteína parcialmente purificada de la columna HisTrap para formar una solución de proteína parcialmente purificada;
 (iv) aplicar la solución de proteína parcialmente purificada a una columna MonoSP;
 (v) lavar la columna MonoSP;
 (vi) eluir la proteína purificada de la columna MonoSP en forma desnaturalizada;
- 50 (e) replegar la proteína desnaturalizada eluida utilizando compuestos hidrófobos mediante:
- 55 (i) la combinación de la proteína desnaturalizada eluida y una solución de compuestos hidrófobos para formar una solución de la proteína y compuestos hidrófobos, en que los compuestos hidrófobos son capaces de proteger la proteína TAT-HOXB4H de la formación de agregados insolubles durante la fase de eliminación de sal de desnaturalización;
 (ii) la desalación de la solución de la proteína y compuestos hidrófobos para obtener una proteína desalada y una solución de compuesto hidrófobo;
 (iii) la eliminación de los compuestos hidrófobos de la solución de la proteína desalada utilizando ultrafiltración mediante un tubo de filtro centrífugo o una célula de agitación; y
- 60 (f) el almacenamiento de la proteína purificada en medio IMDM o en medio DMEM.
- 65

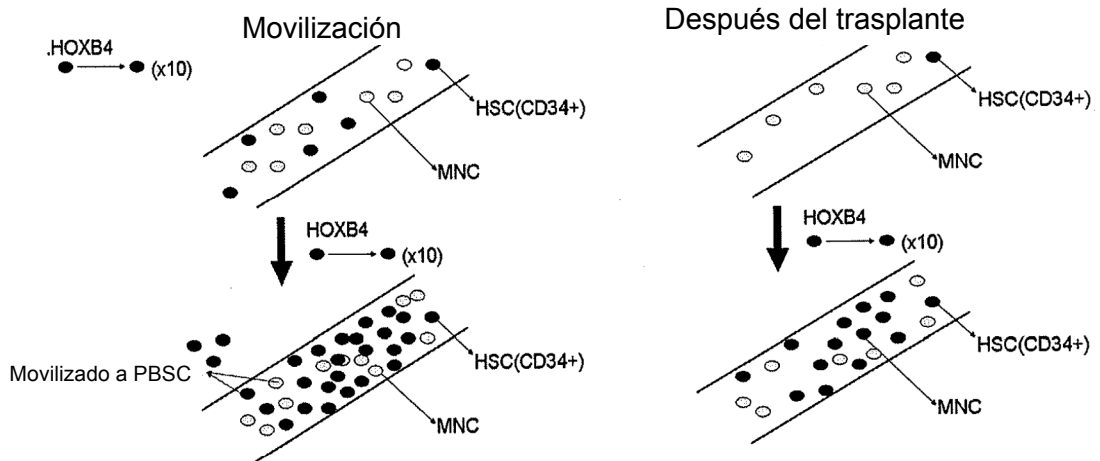


Figura 1

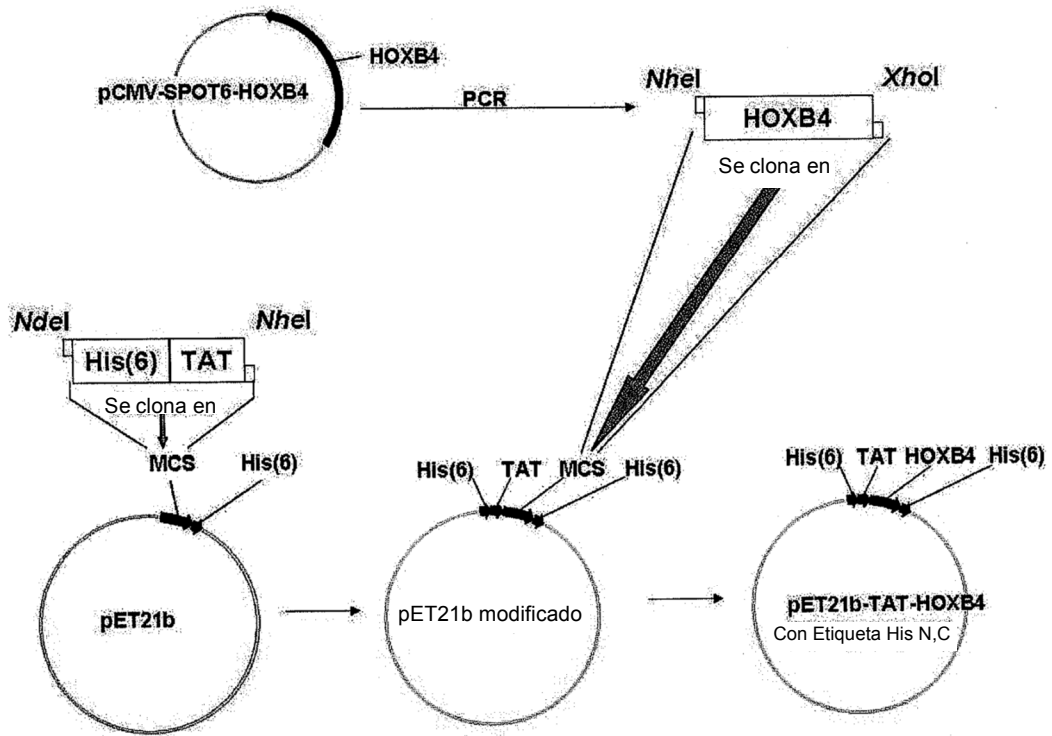


Figura 2

Secuencia de pTAT-HOXB4H

His	TAT	NheI		
<u>ATGCACCACCACCACCACCACTACGGCCGCAAGAAAGCCGCCAGCGCCGCGCGCTAGC</u>				
ATGGCTATGAGTTCTTTTTGATCAACTCAAATATGTCGACCCCAAGTTCCTCCATGCGAGGA			HOXB4	
ATATTCACAGAGCGATTACCTACCCAGCGACCACTCGCCCGGGTACTACGCCGGCGGCCAGAG				
GCGAGAGAGCAGCTTCCAGCCGGAGGCGGGCTTCGGGCGGGCGCGGGCGTGCACCGTGCAGC				
GCTACGCGGCCTGCCGGGACCCTGGGCCCCCGCCGCTCCGCCACCACCCCGCCGCCCCCGC				
CACCGCCCGGTCTGTCCCCTCGGGTCTCTGCGCCGCCACCCGCCGGGGCCCTCCTCCGGAGCC				
CGGCCAGCGCTGCGAGGCGGTGAGCAGCAGCCCCCGCCGCTCCCTGCGCCAGAACCCCT				
GCACCCAGCCCGTCCCACTCCGCGTGAAAGAGCCCGTCTGCTTACCCTGGATGCGCAAAGTT				
CACGTGAGCACGGTAAACCCCAATTACGCCGGCGGGGAGCCCAAGCGCTCTCGGACCGCCTAC				
ACGCGCCAGCAGGTCTTGAGCTGGAGAAGGAATTTCACTACAACCGCTACCTGACACGGCGC				
CGGAGGGTGGAGATCGCCACGCGCTCTGCCTCTCCGAGCGCCAGATCAAGATCTGGTCCAG				
AACCGGCGCATGAAGTGAAAAAAGACCACAAGTTGCCCAACACCAAGATCCGCTCGGGTGGT				
GCGGCAGGCTCAGCCGGAGGGCCCCCTGGCCGGCCCAATGGAGGCCCCGCGCGCTCCTCGAG				
<u>CACCACCACCACCACCACTGA</u>				
	His			

Figura 3

Secuencia de proteína TAT-HOXB4H

TAT

MHHHHHHYGRKKRRQRRRASAMAMSSFLINSNYVDPKFPPCEEYSQSDY
LPSDHSPGYYAGGQRRESSFQPEAGFGRRAACTVQRYAACRDPGPPPPPP
PPPPPPPGLSRAPAPPAGALLPEPGQRCEAVSSPPPPPCAQNPLHPSPSH **HOXB4**
SACEPVVYPWMRKVHVSTVNPNYAGGEPKRSRTAYTRQQVLELEKEFH
YNRYLTRRRRVEIAHALCLSERQIKIWFQNRRMKWKKDHKLPNTKIRSGG
AAGSAGGPPGRPNGGPRALLEHHHHHH

Figura 4

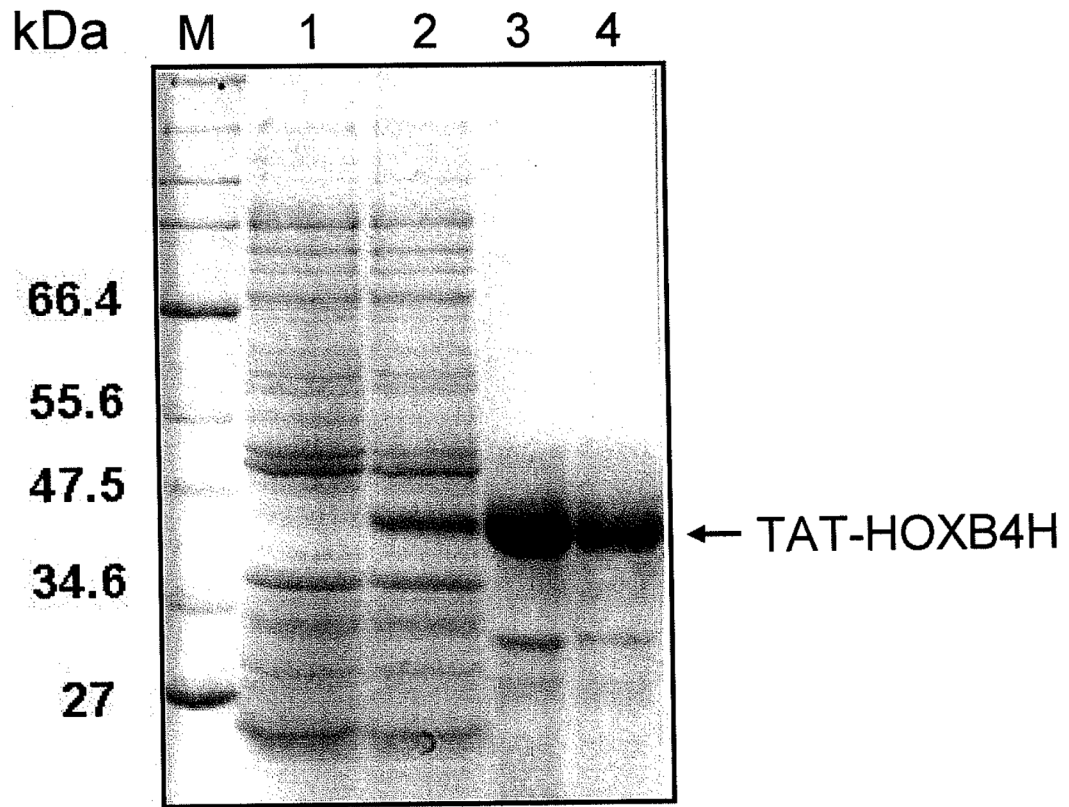


Figura 5

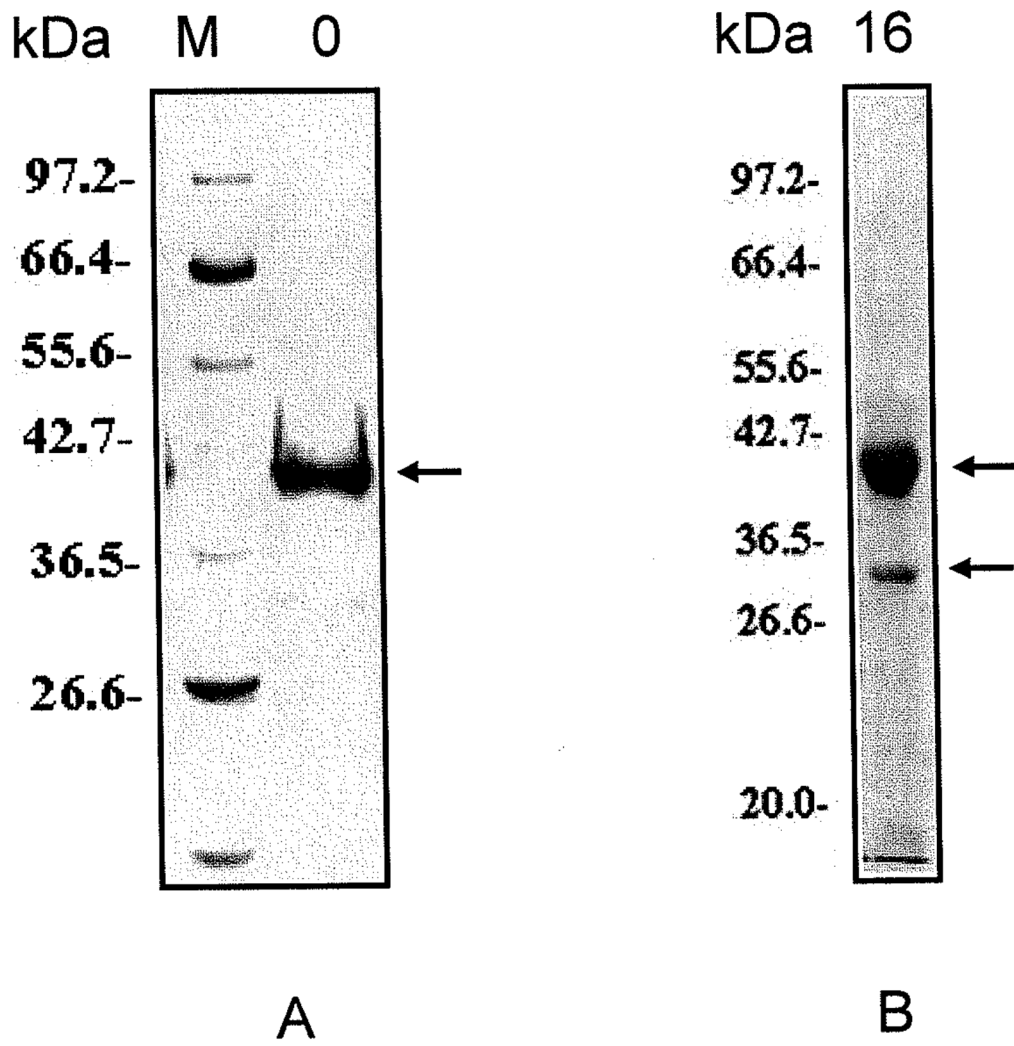


Figura 6

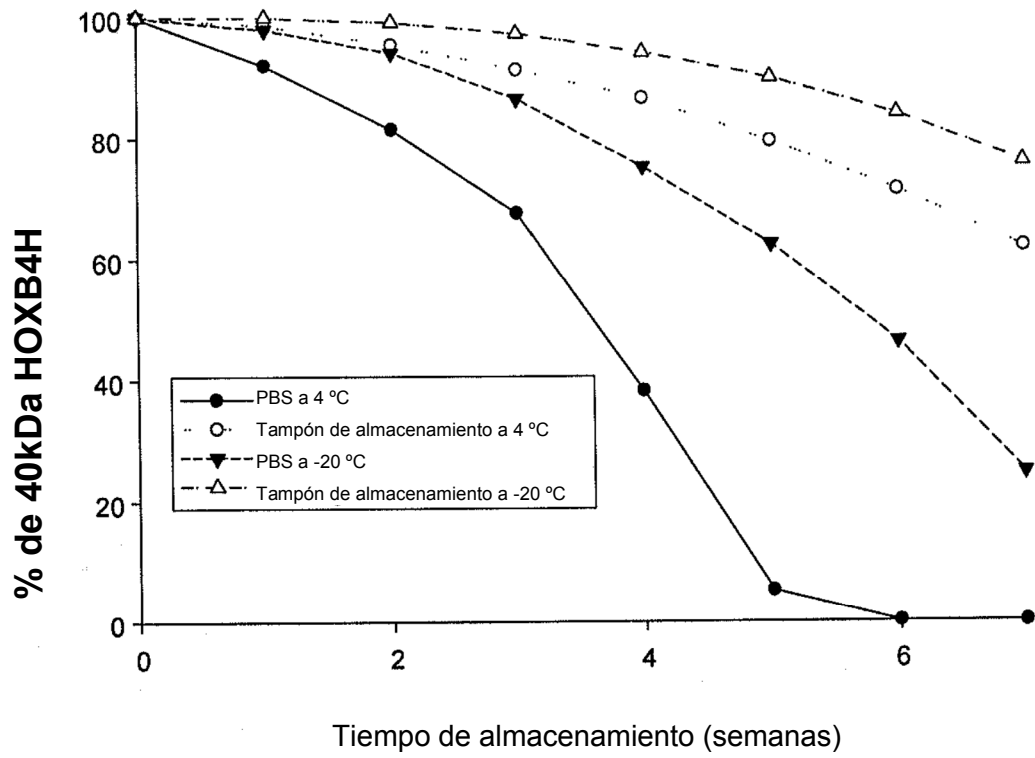


Figura 7

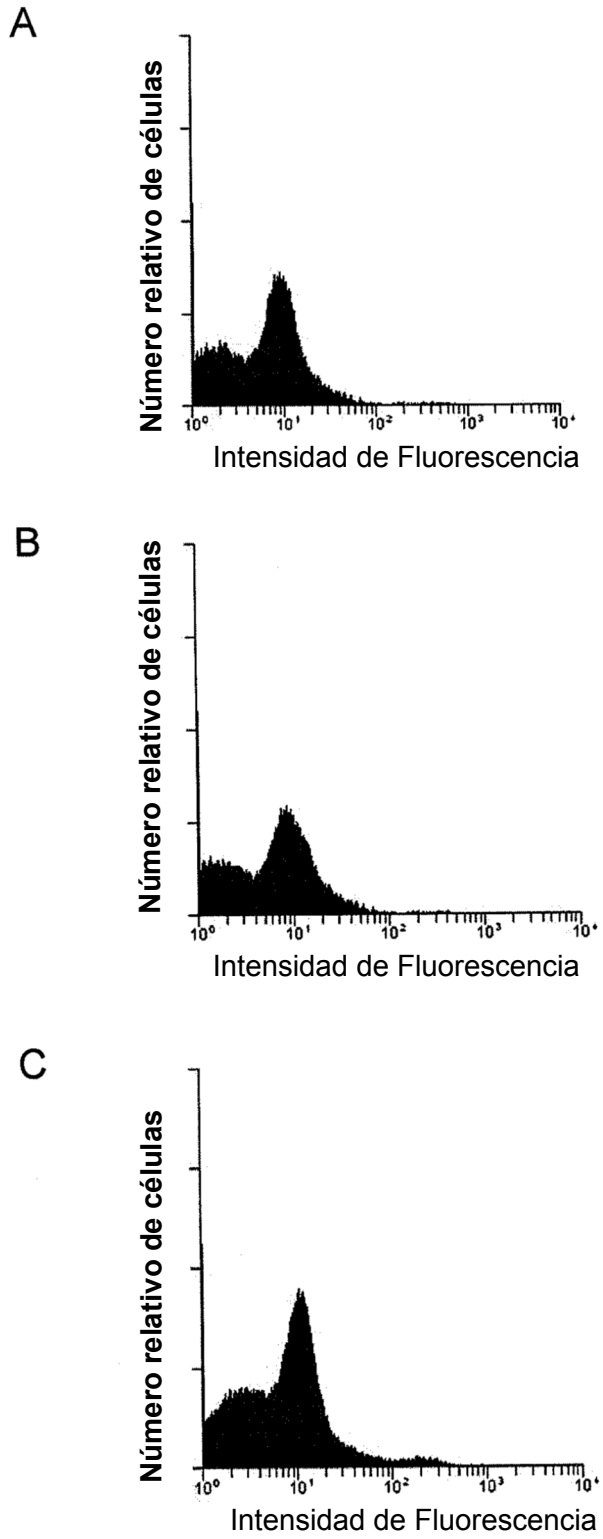


Figura 8

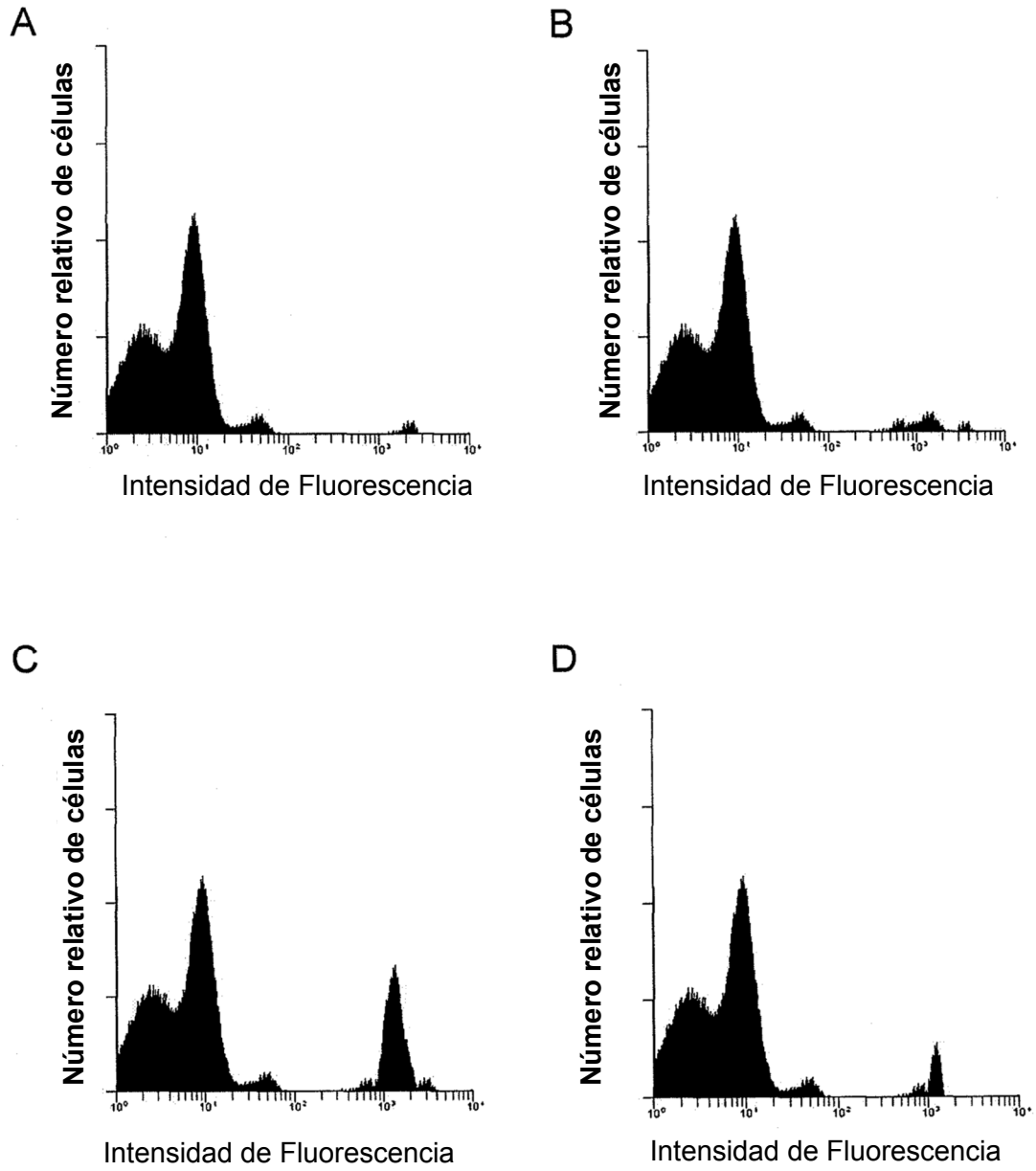


Figura 9

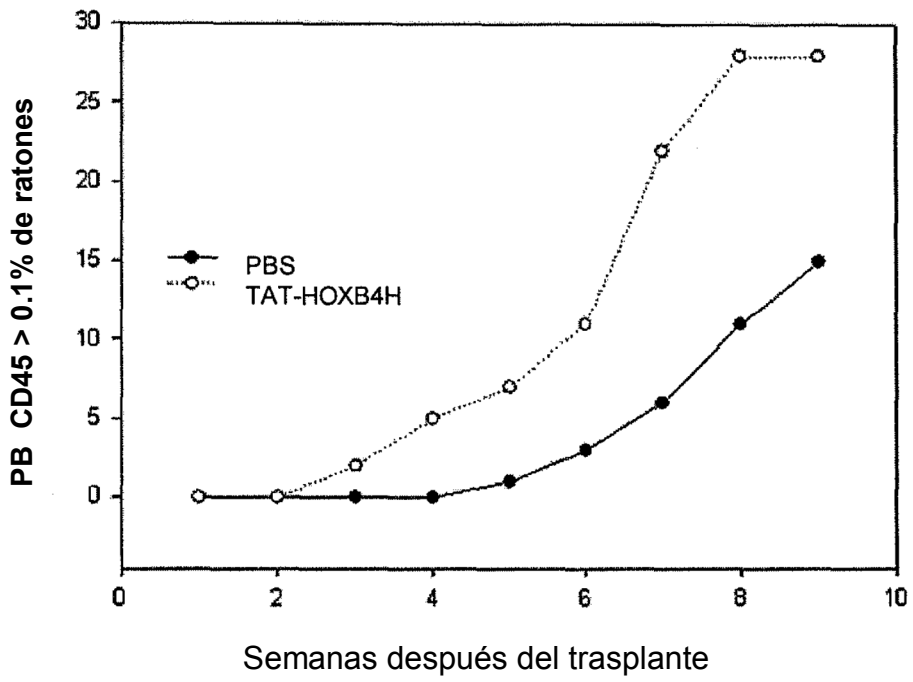


Figura 10

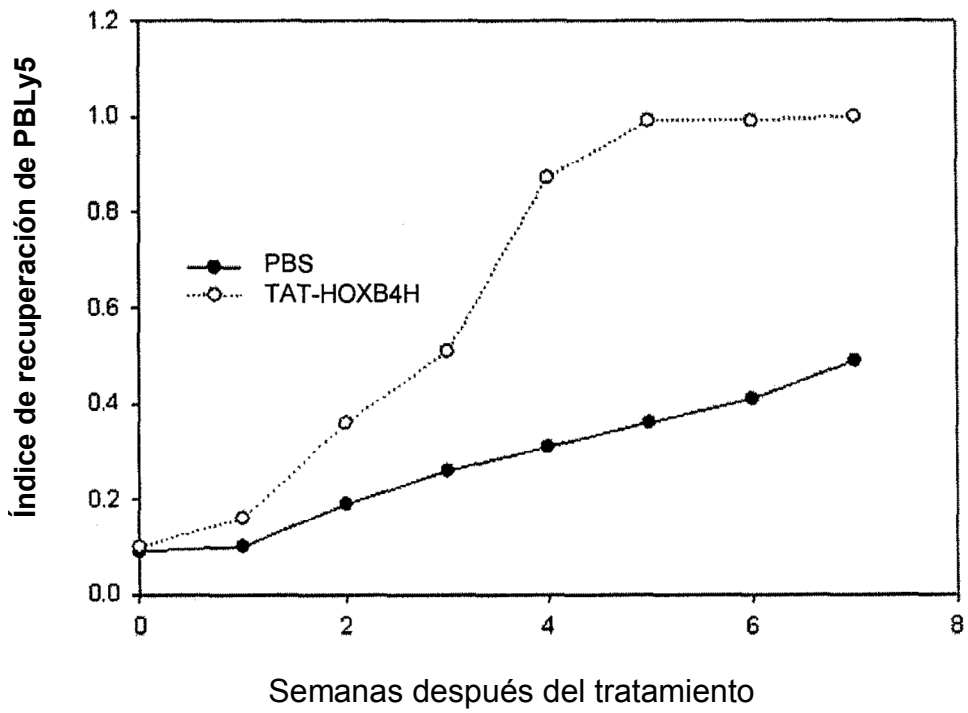


Figura 11

C