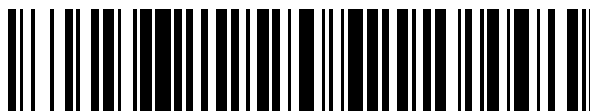


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 876**

51 Int. Cl.:

A61K 35/18 (2015.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

A61K 38/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2013 PCT/GB2013/050043**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13104909**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2013 E 13700589 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2802344**

54 Título: **Métodos de preparación de células y composiciones**

30 Prioridad:

11.01.2012 GB 201200458

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

21.10.2019

73 Titular/es:

**NHS BLOOD & TRANSPLANT (100.0%)
500 North Bristol Park, Northway, Filton
Bristol BS34 7QH, GB**

72 Inventor/es:

**FRAYNE, JAN y
ANSTEE, DAVID**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 727 876 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

Métodos de preparación de células y composiciones

5 La presente invención se refiere a un método para preparar glóbulos rojos adultos *in vitro* para uso diagnóstico y terapéutico en medicina, transfusiones y trasplantes. En el presente documento también se describen composiciones de sangre con tales células preparadas por el método.

10 Los glóbulos rojos (RBC) o eritrocitos, de la sangre completa se usan ampliamente en medicina, transfusiones de sangre y cirugía como un tratamiento de salvamento para la anemia y como reactivos para detectar y determinar la especificidad de los aloanticuerpos presentes en los sueros de los pacientes para permitir la selección de sangre compatible para transfusión. Actualmente, la principal fuente de glóbulos rojos adultos es aislarlos de sangre completa donada por un donante de sangre adulto. En la actualidad, existe la necesidad de un suministro alternativo de células cultivadas de fenotipo adulto, en particular con fenotipos poco comunes de grupos sanguíneos y, de manera más
15 general, para cubrir la escasez en la disponibilidad de sangre para transfusión cuando los requisitos del paciente superan la sangre disponible de las donaciones.

Todos los glóbulos rojos tienen hemoglobina como componente principal. La hemoglobina es una proteína portadora de oxígeno esencial para la respiración. La mayoría de los tipos de hemoglobina normal, incluidas la hemoglobina A, la hemoglobina A2 y la hemoglobina F, son tetrámeros compuestos por cuatro subunidades de proteínas y cuatro grupos protésicos hemo. Mientras que la hemoglobina del adulto (HbA) está compuesta de dos subunidades alfa y dos beta, la hemoglobina fetal (HbF) está compuesta de dos subunidades alfa y dos gamma, comúnmente denominadas $\alpha_2\gamma_2$. Debido a su presencia en la hemoglobina fetal, la subunidad gamma se denomina comúnmente subunidad de hemoglobina "fetal".
20

25 La transición de la hemoglobina fetal a la del adulto se produce durante los primeros 4-6 meses después del nacimiento. La HbF tiene una mayor afinidad por el oxígeno que la HbA y esta propiedad es ventajosa para el feto *in utero* porque facilita la transferencia de oxígeno de la madre al feto. Sin embargo, esta propiedad no es óptima en el adulto porque el oxígeno de la HbF se libera de manera menos fácil en los tejidos.

30 El locus de la β -globina humana en el cromosoma 11 contiene los genes de globina embrionaria (ϵ), fetal ($G\gamma$ y $A\gamma$) y del adulto (β) que se expresan secuencialmente durante el desarrollo. Cadena arriba del locus, un elemento regulador en cis conocido como la región de control del locus (LCR) es esencial para la expresión de alto nivel de los genes de la globina [1-4]. La interacción de la LCR con los genes de la globina se logra mediante interacciones de largo alcance y un bucle cromosómico que lleva al promotor del gen de la globina expresado activamente en una proximidad espacial cercana a la LCR [5]. La LCR regula positivamente solo un gen a la vez con los genes de globina compitiendo entre sí por la interacción con la LCR [6] siendo un factor determinante para la interacción la distancia relativa del gen a la LCR. En células adultas, el cambio final del gen de globina β fetal a otro más distante se logra mediante el silenciamiento activo de los genes fetales [7-9]. Este cambio de globina fetal a la del adulto ha sido objeto de un intenso estudio debido a su importancia clínica y, hasta la fecha, mucho trabajo se ha centrado en los tratamientos que reactivan la expresión de la globina y en células adultas para mejorar la gravedad de las hemoglobinopatías β , como las células falciformes Enfermedad y las β -talasemias. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan el cambio están lejos de dilucidarse.
40

45 La generación de glóbulos rojos *in vitro* para fines de transfusión es un objetivo importante de los servicios de salud a nivel mundial, ya que tales tecnologías tienen el potencial de proporcionar suministros reponibles de productos de transfusión con riesgo reducido de agentes infecciosos y resolver problemas complejos de aloinmunización y la disponibilidad de productos de grupos sanguíneos raros. En los últimos años, los avances en el desarrollo de sistemas para la generación de eritrocitos *in vitro* han progresado rápidamente utilizando células progenitoras aisladas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical y células madre pluripotentes humanas (células madre embrionarias (ESC) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC)).
50

Se puede inducir a las células de todas las fuentes progenitoras a diferenciarse eficazmente a lo largo de la vía eritroide. Sin embargo, los progenitores aislados de sangre de cordón umbilical tienen la clara ventaja de una mayor capacidad de expansión que aquellos aislados de sangre periférica [10]. Las ESC y las iPSC tienen el potencial de proporcionar una fuente inagotable de progenitores para la generación de altos volúmenes de RBC y facilitar el desarrollo innovador de productos de grupos sanguíneos alogénicos y raros para fines de transfusión [11, 12]. Sin embargo, aunque la sangre del cordón umbilical, las ESC y las iPSC ofrecen un potencial terapéutico atractivo y realista, un obstáculo aún no resuelto es el fallo de los eritroblastos diferenciadores para sufrir el cambio de la expresión de γ -a β -globina, dando como resultado eritrocitos que expresan predominantemente o exclusivamente globinas fetales.
55
60

La capacidad proliferativa limitada de los progenitores eritroides derivados de la sangre periférica limita el número de glóbulos rojos que pueden obtenerse mediante métodos de cultivo *in vitro* y tiene un gran impacto en la viabilidad económica de producir cantidades terapéuticas de glóbulos rojos de esta fuente. Los productos de glóbulos rojos convencionales obtenidos de donantes contienen una mezcla de glóbulos rojos en diferentes edades. En cambio, los
65

glóbulos rojos cultivados son todos nacientes y es probable que sobrevivan durante el mismo período prolongado de vida en la circulación periférica. Los pacientes que requieren transfusiones de sangre regulares (por ejemplo, pacientes con enfermedad de células falciformes, talasemia, síndrome mielodisplásico) sufren daños en los órganos como resultado de la sobrecarga de hierro de las transfusiones repetidas. Debido a la mayor vida útil *in vivo* de los glóbulos rojos cultivados, se puede anticipar que los pacientes de este tipo necesitarían transfusiones menos frecuentes y, por lo tanto, los problemas de sobrecarga de hierro se aliviarían. Los riesgos asociados con la sangre del donante, como la contaminación viral y la existencia de priones, podrían evitarse utilizando los glóbulos rojos generados *in vitro*.

El documento WO2007/095064 divulga células eritroides que han derivado de células madre embrionarias humanas que expresan intrínsecamente la hemoglobina tanto de adulto como fetal según se determina mediante PCR cuando se cultivan en un medio durante 30 días.

La presente invención busca abordar algunos de los desafíos en este campo. De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método *in vitro* para preparar glóbulos rojos adultos que comprende las etapas de cultivar células madre o líneas celulares obtenidas de una fuente de dichas células en un medio definido y modificar las células con al menos un factor de transcripción para convertir globina fetal en globina de adulto, en donde la expresión de la β -globina del adulto aumenta en comparación con las células no modificadas y en donde el al menos un factor de transcripción es BCL11A, con la condición de que las líneas celulares no sean líneas celulares embrionarias humanas.

El método aumenta la expresión de la β -globina del adulto.

Las células que se obtienen de una fuente pueden expresar hemoglobina fetal.

El método puede incluir además la conversión de las células de un fenotipo fetal a un fenotipo adulto.

El método puede tener una etapa adicional de enucleación de células en el que las células derivan de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) o células ESC.

Las células seleccionadas o aisladas de la fuente pueden expresar el antígeno de superficie CD34. Las células pueden modificarse para expresar uno o más factores de transcripción.

El BCL11A puede seleccionarse de BCL11A, otras isoformas de BCL11A y cualquier variante del mismo. Las células se pueden obtener a partir de sangre de cordón umbilical, células madre pluripotentes inducidas, células madre eritropoyéticas o líneas celulares eritropoyéticas.

En una realización, se utiliza una combinación de BCL11A y EKLF para convertir globina fetal en globina del adulto en células derivadas de sangre de cordón umbilical.

El cultivo celular y las modificaciones pueden realizarse *in vitro*.

Los medios de cultivo pueden comprender al menos uno de suero, suero fetal bovino, insulina, heparina, transferrina. Los medios pueden complementarse adicionalmente con al menos uno de SCF, EPO (eritropoyetina) o transferrina saturada de hierro.

El BCL11A puede ser BCL11A-XL.

En el presente documento se describen adicionalmente células sanguíneas preparadas de acuerdo con el método descrito en el presente documento.

En el presente documento también se describen glóbulos rojos con fenotipo adulto compuestos por células madre cultivadas modificadas *in vitro* para tener un fenotipo adulto, estar enucleadas y tener una expresión aumentada de β -globina en comparación con las células no modificadas.

Los glóbulos rojos pueden tener además una expresión reducida de la γ -globina en comparación con las células no modificadas.

Las células madre cultivadas pueden modificarse mediante cotransfección con los factores de transcripción BCL11A y EKLF o cualquier variante de los mismos.

En el presente documento se describe adicionalmente una composición que comprende glóbulos rojos preparados como se describe en el presente documento y un transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se puede preparar un paquete de transfusión de sangre que comprende glóbulos rojos descritos en el presente documento.

Los factores de transcripción se pueden seleccionar de BCL11A, (BCL11A-XL y otras isoformas), EKLF, o versiones modificadas o etiquetadas tales como HA-EKLF y variantes de los mismos que tienen el efecto deseado de aumentar la expresión de β -globina y/o suprimir la expresión de γ -globina. Otros factores de transcripción involucrados en el cambio de globina y la maduración eritroide también podrían usarse solos o en combinación, por ejemplo, GATA 1, FOG 1, SCL y cualquier otro. En particular, otros factores de transcripción que interactúan o forman un complejo con EKLF y BCL11A, p. ej. GATA 1, FOG1, SOX6.

Los glóbulos rojos se pueden obtener a partir de la sangre del cordón umbilical, iPSC o ESC y de líneas celulares eritropoyéticas derivadas de cualquiera de estas fuentes de células madre y de líneas celulares eritropoyéticas *no* derivadas de estas fuentes pero que expresan globinas fetales o de células progenitoras de cualquier fuente. Preferentemente, la fuente de las células es de seres humanos.

En el presente documento se describe un método para aumentar la expresión de β -globina en glóbulos rojos que comprende la modificación de células sanguíneas de cordón umbilical con uno o más factores de transcripción seleccionados de BCL11A y EKLF.

En el presente documento se describe adicionalmente una composición que comprende glóbulos rojos modificados que tienen una expresión incrementada de β -globina y otras proteínas eritroides normalmente expresadas en glóbulos rojos con un fenotipo adulto en comparación con las células no modificadas. Los glóbulos rojos modificados que tienen una expresión aumentada de β -globina y una expresión reducida de γ -globina también se describen en el presente documento.

Las células pueden modificarse insertando genes apropiados en las células utilizando plásmidos, vectores víricos u otros o añadiendo factores de expresión, péptidos, péptidos miméticos para hacer el cambio de globina fetal a del adulto, así como para desarrollarse desde fenotipo fetal a adulto y en el caso de iPSC y ESC para facilitar la producción de glóbulos rojos enucleados de fenotipo adulto.

Los eritroblastos generados a partir de células madre de fuentes tales como la sangre de cordón umbilical, células madre embrionarias (ESC) y iPSC tienen muchas ventajas sobre las células madre de sangre periférica para la generación de RBC *in vitro* con fines terapéuticos, tal como un mayor potencial de expansión y la facilitación del desarrollo innovador de productos de grupos sanguíneos alogénicos y raros. Sin embargo, estas células expresan predominantemente globina fetal (γ) en lugar de globina del adulto (β), que tienen diferentes propiedades bioquímicas y moleculares. Las células se pueden obtener de una fuente no embrionaria.

Para explotar el potencial proliferativo de las células madre derivadas de la sangre de cordón umbilical, iPSC o ESC para la generación de glóbulos rojos humanos cultivados, los presentes inventores han encontrado condiciones para inducir el cambio de la hemoglobina fetal a del adulto en las células eritroides cultivadas. La presente invención demuestra que el cambio de gamma a beta globina puede efectuarse mediante cotransfección o cotransducción de células eritroides derivadas de progenitores de sangre de cordón umbilical, iPSC o ESC y líneas celulares eritropoyéticas (por ejemplo, células K562) que expresan globinas fetales con dos factores de transcripción (BCL11A y EKLF (KLF1)). EKLF es un regulador clave de la maduración eritroide que afecta a muchos genes eritroides, además de los genes de globina (Tallack MR, Perkins AC, IUBMB Life 2010;62(12):886-890). En consecuencia, se describe un método general para convertir progenitores eritroides que expresan un fenotipo fetal en un fenotipo adulto.

Los presentes inventores habían transfectado previamente una línea celular eritropoyética (células K562) que expresa globina fetal con el factor de transcripción EKLF, que se sabe que es esencial para el cambio de γ - a β -globina, para la inducción de la expresión de β -globina y para el desarrollo de las células eritropoyéticas. Sin embargo, los niveles de β -globina inducida fueron mínimos. Más recientemente se ha demostrado que un segundo factor de transcripción BCL11A es esencial para la supresión de la γ -globina fetal en eritroblastos adultos, facilitando el cambio de γ - a β -globina. Los presentes inventores cotransfectaron células K562 tanto con EKLF como con BCL11A y encontraron que, en combinación, inducían un cambio fuerte en la expresión de β -globina. Los presentes inventores también cotransfectaron eritroblastos derivados de sangre de cordón con BCL11A-XL y EKLF e indujeron un aumento marcado en la expresión de β -globina.

Del muy pequeño número de factores de transcripción que se sabe están involucrados en la regulación del cambio de γ a β -globina, dos participantes críticos identificados son BCL11A y EKLF.

BCL11A es un factor de transcripción con dedo de zinc (ZF) identificado a partir de estudios de asociación genética de niveles de HbF 13-16 y se ha demostrado que es un regulador crítico de la expresión de la γ - globina en seres humanos [17]. Se expresan múltiples variantes de BCL11A, aunque las tres formas principales informadas son BCL11A-XL, BCL11A-L y BCL11A-S [17,18]. Todas las variantes comparten un exón común 1, 2 y 3 y parte del exón 4, lo que da como resultado un número variable de ZF en cada forma; el exón 4 contribuye con 6 ZF a BCL11A-XL, 3 a BCL11A-L y 1 a BCL11A-S todos anexados al único ZF codificado por el exón 2. Además, BCL11A-L y -S tienen un exón adicional 5, que está ausente en BCL11A-XL.

El análisis del desarrollo de eritroblastos humanos muestra formas de BCL11A de longitud completa expresadas de forma consistente en células adultas, en niveles sustancialmente más bajos en células fetales y ausentes en eritroblastos primitivos [17], una relación inversa a la expresión de globina fetal (HbF) en estas células. En las células eritroides adultas, el BCL11A de longitud completa ocupa varias regiones discretas dentro del grupo de β -globina humana, que incluye HS3 de la LCR y una región intergénica entre los genes $\alpha\gamma$ -globina y δ -globina [17]. BCL11A también se asocia con componentes del complejo represor NURD en estas células [17]. La reducción de la expresión de BCL11A en eritroblastos humanos definitivos da como resultado un aumento de la expresión de HbF [17] y la reconfiguración de la formación de bucles de cromatina 3D en el locus de β -globina, de modo que los genes γ se asocian preferentemente con la LCR [19]. Además, la introducción de un transgén del locus β humano en ratones con BCL11A desactivado dio como resultado un silenciamiento deficiente de los genes γ en el linaje eritroide definitivo [20]. En conjunto, estos datos apoyan el papel de BCL11A como mediador crítico del silenciamiento de la γ -globina y el cambio de desarrollo de HbF a globina del adulto (HbA). Como tal, BCL11A representa una diana potencial para la reactivación de HbF en pacientes con β -hemoglobinopatías. De hecho, tal efecto se ha demostrado recientemente en ratones transgénicos con SCD, por lo que la inactivación de BCL11A corrige los defectos hematológicos y patológicos asociados con la SCD a través de la inducción de HbF [21].

EKLF (KLF1) es un factor de transcripción específico de eritroides esencial para la expresión de la β -globina, la eritropoyesis definitiva y el cambio de HbF a HbA [22-24]. El papel de EKLF en la expresión de β -globina ha sido ampliamente estudiado [25]. Los ratones nulos para EKLF mueren *in utero* alrededor del día embrionario 14-15 debido a un fallo en la expresión del gen de la β -globina durante la eritropoyesis hepática fetal [22]. La expresión de β -globina también está ausente en los ratones nulos para EKLF que contienen un transgén del locus β humano, mientras se aumenta la γ -globina [24]. De forma similar, la reducción de la expresión de EKLF en eritroblastos adultos da como resultado un aumento en la proporción de γ - a β -globina, y reduce notablemente la expresión de BCL11A [26]. La acumulación de datos muestra que EKLF también regula muchos otros genes eritroides y, por lo tanto, desempeña un papel crítico y central en la eritropoyesis [22, 27-30].

Regulado por modificaciones postraduccionales, EKLF modula tanto la remodelación de la cromatina como la actividad transcripcional a través de la interacción con otras proteínas y complejos [31-34]. Se ha demostrado que EKLF interactúa *in vivo* con HS2 y HS3 de la LCR, así como con el promotor proximal de β -globina [35]. Aunque el mecanismo exacto por el cual EKLF regula la expresión de β -globina aún no se ha dilucidado por completo, los datos indican que EKLF desempeña un papel central en la promoción de la interacción de la LCR con el promotor de β -globina proximal que da como resultado la expresión de β -globina en células eritroides adultas [36]. Como tal, la reducción de la expresión selectiva del EKLF también se ha propuesto como una estrategia para activar la HbF en individuos con enfermedad de células falciformes y β -talasemia.

Como EKLF y BCL11A son críticos para el cambio a, y la expresión de globina tipo β del adulto, los presentes inventores encontraron sorprendentemente que las células eritroides que expresan de forma intrínseca las globinas fetales tienen una expresión ausente o reducida de estos factores de transcripción. En segundo lugar, ya que la reducción de la expresión de EKLF o BCL11A puede dar como resultado la reversión del cambio de globina con un aumento concomitante de las globinas fetales, los presentes inventores encontraron sorprendentemente que, a la inversa, la expresión inducida o aumentada de estos factores de transcripción en las células que expresaban intrínsecamente las globinas fetales indujo el cambio a la expresión de globina del adulto.

El cambio de globina es una barrera importante para la fabricación comercial de glóbulos rojos humanos a partir de cordón umbilical, células madre embrionarias humanas (hESC), células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) y otras células madre hematopoyéticas no adultas, ya que las células eritroides generadas expresan globina fetal en lugar de globina del adulto, que tiene diferentes propiedades bioquímicas. Además, las células eritroides derivadas de dichas fuentes de células madre tienen un fenotipo menos maduro, que difiere en la expresión de algunos antígenos de la superficie celular a los RBC adultos y tienen tasas de enucleación defectuosas o deficientes. Tanto EKLF como BCL11A son esenciales para el cambio de desarrollo de la globina fetal (γ a la globina del adulto (β)) y para la eritropoyesis definitiva, ya que EKLF regula muchos genes eritroides esenciales, incluyendo proteínas del citoesqueleto, proteínas de membrana y aquellas implicadas en la regulación del ciclo celular.

Se demostró que la transducción de células eritroides generadas a partir de las fuentes de células madre descritas anteriormente con EKLF y BCL11A induce el cambio de γ - a β -globina y también puede inducir la maduración de los glóbulos rojos producidos a la del fenotipo de glóbulos rojos adultos. Esto tiene la ventaja de resolver el problema principal en el que se incurre actualmente con la producción de glóbulos rojos a partir de hESC y hiPSC donde se observan niveles bajos de enucleación *in vitro*. Superar estos obstáculos permitirá el uso de dichos glóbulos rojos modificados de fenotipo adulto para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

La invención se describirá a continuación solamente a modo de ilustración en los siguientes ejemplos y dibujos adjuntos, en los que:-

La Figura 1 muestra la expresión de BCL11A y EKLF en células K562.

(A) Se compararon los transcritos para las variantes de BCL11A, BCL11A-XL, BCL11A-L y BCL11A-S en células K562 y los eritroblastos se diferenciaron a partir de los progenitores de sangre periférica mediante PCR. Se utilizaron dos

conjuntos de cebadores para BCL11A-S y BCL11A-L. (B) Transferencia Western de 20 µg de proteína de células K562 sondadas con un anticuerpo de BCL11A. La proteína total de los eritroblastos diferenciados de los progenitores de sangre periférica se utilizó como control positivo. (C) Transcritos de EKLF (panel izquierdo) y proteína (panel derecho) en células K562 y eritroblastos derivados de sangre periférica en el día 9 en cultivo como control positivo (eritroides control). Las membranas se eliminaron y se volvieron a sondear con un anticuerpo contra tubulina como control de carga de proteínas.

La Figura 2 muestra que la transfección de células K562 con EKLF y BCL11A induce la expresión de β-globina. Las células K562 se transfectaron con 5 µg de pCDNA3 Flag-BCL11A-XL (B-XL), 5 µg de pBp HA-EKLF (E) o cotransfectaron con 5 µg de cada plásmido. Las células se recogieron 20 horas después de la transfección. (A) Transferencia Western de proteína total de células transfectadas y K562 control (Ctrl) sondadas con BCL11A y antiseros con etiqueta HA (para EKLF). (B) Transcritos de β-globina en células transfectadas y K562 control analizadas por qPCR. La expresión de β-globina relativa se normalizó a la expresión de PABPC1 y se calibró al K562 control. (C) Transferencia Western de la proteína total de células transfectadas y K562 control sondadas con un anticuerpo de β-globina. Todas las transferencias Western se eliminaron y se volvieron a sondear con un anticuerpo contra la tubulina como control de carga de proteínas.

La Figura 3 muestra los niveles de transcritos de β-globina paralelos a la expresión de BCL11A y EKLF. Las células K562 se cotransfectaron con 5 µg de pCDNA3 Flag-BCL11A-XL (B-XL) y 5 µg de pBp HA-EKLF (E). Las células se recogieron a las 24 y 48 horas después de la transfección. (A) Transcripciones de BCL11A, EKLF y β-globina en células cotransfectadas y K562 control (Ctrl) a las 24 y 48 horas después de la transfección. Los eritroblastos diferenciados de los progenitores de sangre periférica en el día 7 en cultivo se utilizaron como control positivo (eritroides control). Para la amplificación por PCR de las transcripciones de EKLF, se diseñó el cebador directo dentro de la región HA-tag (B). Transferencia Western de la proteína total de las células cotransfectadas y K562 control sondada con BCL11A y HA-tag (para el antisero de EKLF). Las transferencias se eliminaron y se volvieron a sondear con un anticuerpo contra tubulina como control de carga. (C) Niveles de β-globina transcrita en células cotransfectadas y K562 control a las 24 y 48 horas después de la transfección analizados por qPCR. La expresión de β-globina relativa se normalizó a la expresión de PABPC1 y se calibró al K562 control. (D) Perfiles de expresión de β- y γ-globina como una relación a la β- y γ-globina total en células cotransfectadas y K562 control a las 24 y 48 horas después de la transfección.

La Figura 4 muestra la regulación positiva de β-globina transcrita con niveles aumentados de BCL11A y EKLF. Las células K562 se transfectaron con 10 µg de pCDNA3 Flag-BCL11A-XL (B-XL) o 10 µg de pBp HA-EKLF (E) o se cotransfectaron con 5 µg o 10 µg de cada uno de ambos plásmidos. Las células se recogieron 17 horas después de la transfección. (A) Transferencia Western de proteína total de células transfectadas y K562 control (Ctrl) sondadas con BCL11A, HA-tag (para EKLF), (D) antiseros de β-globina y (E) tubulina. Las transferencias se eliminaron y se volvieron a sondear con un anticuerpo contra tubulina. (B) Transcritos de β-globina en células transfectadas y K562 control analizadas por qPCR. La expresión de β-globina relativa se normalizó a la expresión de PABPC1 y se calibró al K562 control. (D) Perfiles de expresión de β- y γ-globina como una relación a la β- y γ-globina total en células cotransfectadas y K562 control.

La Figura 5 muestra la expresión de las isoformas de globina en los RBC de cordón umbilical y de sangre periférica y BCL11A y EKLF en eritroblastos cultivados a partir de los progenitores de sangre del cordón umbilical y de sangre periférica.

(A) Gel que muestra isoformas de globina en RBC de cordón umbilical maduro y adultos. (B) Transferencia Western de proteína total de eritroblastos derivados de cordón umbilical y de sangre periférica en los días 6, 8 y 11 sondados con antiseros de BCL11A y EKLF. Las transferencias se eliminaron y se volvieron a sondear con un anticuerpo contra tubulina como un control para carga de proteínas. (C) Gráfico que muestra el % de tipos de células observados durante el cultivo ex vivo de eritroblastos derivados de sangre de cordón umbilical (SC) y de sangre periférica (SP).

La Figura 6 muestra que la cotransfección de eritroblastos derivados de sangre de cordón umbilical con EKLF y BCL11A aumenta la expresión de β-globina.

Los eritroblastos cultivados a partir de progenitores de sangre de cordón umbilical se cotransfectaron con 5 µg de cada pCDNA3 Flag-BCL11A-XL (B-XL) y pBp HA-EKLF (E). Las células se recogieron 17 horas después de la transfección. (A) Transferencia Western de proteína total de eritroblastos derivados de sangre de cordón umbilical de control cotransfectados (BX-L: E) y transfectados de forma simulada (sin ADN) sondados con antiseros de BCL11A y HA-tag (para EKLF), eliminada a continuación y sondados de nuevo con antiseros de β-globina. La transferencia se eliminó de nuevo y se volvieron a sondear con un anticuerpo contra tubulina como control de carga de proteínas. (B) Transcripciones de β-globina en células transfectadas analizadas por qPCR. La expresión de β-globina relativa se normalizó a la expresión de PABPC1 y se calibró para controlar (sin ADN) las células de sangre de cordón umbilical transfectadas (n = 2). (C) Expresión relativa de la proteína β-globina en células sueltas y cotransfectadas normalizada a la expresión de tubulina y calibrada para simular (sin ADN) las células de control transfectadas (n = 3)

La Figura 7 muestra las células K562 48 horas después de la transducción dual con EKLF y BCL11A-XL.

Las células K562 se transdujeron con las construcciones lentivirales pXLG3-mcherry-EKLF y pXLG3-eGFP-BCL11A-XL. Después de la imagen confocal, las células que expresan EKLF se muestran en rojo (A), las células que expresan

BCL11A-XL se muestran en verde (B) y las células que expresan tanto EKLF como BCL11A se muestran en naranja/amarillo (C).

Ejemplos

Métodos

Ejemplo 1 - Construcción de Plásmidos

La Dra. Belinda Singleton proporcionó amablemente el plásmido de expresión de EKLF de tipo silvestre (WT) pBabe puro HAI WT EKLF. Brevemente, el EKLF de longitud completa se amplificó utilizando los siguientes cebadores: 5'-GATTACGCTGAATTCTCATGGCCACAGCCGAGACC-3' (SEQ ID No: 1) y 5'-GATACTCGAGAATTCTCAAAGGTGGCGCTTCATG -3' (SEQ ID NO:2), clonados en el vector pCR®2.1-TOPO y posteriormente subclonados en el sitio EcoRI de pBabe puro HAI (plásmido 14738, Addgene Inc., Cambridge, MA, EE.UU., por cortesía del laboratorio del Dr. Adrienne Cox).

Los plásmidos de expresión de BCL11A pCDNA3-Flag-BCL11A-XL, pCDNA3-Flag-BCL11A-L y pCDNA3-Flag-BCL11A-S fueron amables regalos del Dr. P. Tucker y del Dr. Baeck-Seung Lee (Sección de Genética Molecular y Microbiología e Instituto de Biología Celular y Molecular, Universidad de Texas).

Ejemplo 2 - Cultivo celular y Nucleofección

Las células CD34+ aisladas de la sangre de cordón umbilical utilizando el sistema de separación con perlas magnéticas MiniMacs™ (Miltenyi Biotech Ltd, Surrey, Reino Unido) se cultivaron *ex vivo* durante 5-8 días utilizando el método de cultivo de eritroides de tres etapas descrito previamente [37]; IMDM (Source Bio-Science) que contiene 3 % (v/v) de suero AB (Sigma), Suero bovino fetal al 2 % (v/v) (Hyclone, Fisher Scientific UK Ltd), 10 µg/ml de insulina (Sigma), 3 U/ml de heparina (Sigma), 200 µg/ml de transferrina (R&D Systems). En la primera etapa (días 0-8) este se complementó con 10 ng/ml de SCF (factor de células madre), 1 ng/ml de IL-3 y 3 U/ml de EPO (eritropoyetina); en la segunda etapa (días 8-11) con 10 ng/ml de SCF, 3 U/ml de EPO y 800 µg/ml adicionales de transferrina saturada de hierro y en la etapa final (días 11-20) con 3 U/ml de EPO y 800 µg/ml adicionales de transferrina saturada de hierro.

Las células K562 se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (Salisbury, Reino Unido) y se mantuvieron en cultivo a 2x10⁵ células/ml en medio de Dulbecco modificado con Iscove con L-Glutamina complementado con suero de ternera fetal al 10 %.

Las células de la sangre de cordón umbilical y las células K562 se transfectaron utilizando el sistema Amaxa Nucleofection® (Lonza Cologne AG, Colonia, Alemania) con el kit Amaxa® Human CD34+ Cell Nucleofector® y el kit V de Amaxa® Cell Line Nucleofector®, respectivamente, siguiendo los protocolos del fabricante. Brevemente, para cada reacción de nucleofección, se resuspendieron suavemente 1,5-2x10⁶ células en 100 µl de solución Amaxa® Nucleofector® con un complemento, se mezclaron con 5 - 10 µg de BCL11A y/o ADN plásmido de EKLF de tipo silvestre y se pulsaron con un programa predefinido (U-008 para células de sangre del cordón umbilical y T-016 para células K562). Las células transfectadas se transfirieron a los pocillos de una placa de 12 pocillos con 2 ml (volumen final) de medios por muestra y se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %.

Ejemplo 3 - Análisis de reacción en cadena de polimerasa convencional y cuantitativa

Un mínimo de 5 x 10⁵ células se lavaron dos veces en una solución salina tamponada con Hanks 1 X (HBSS, Sigma-Aldrich) y se congelaron en ARN más tarde. Se extrajo el ARN total y se cuantificó el rendimiento. Se transcribieron de forma inversa 400 ng de ARN en ADNc utilizando la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen, Paisley). La expresión de BCL11A y EKLF se analizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR), mientras que la expresión de los genes de β-globina y γ-globina se analizó mediante PCR cuantitativa (q). Todos los métodos se han descrito previamente [38]. Las secuencias utilizadas en PCR y qPCR son las siguientes: *BCL11A-XL*: 5'-AGATCCCTTCCTTAGCTTCG-3' (SEQ ID NO:3) y 5'-TCAACACTCGATCACTGTGC-3' (SEQ ID NO:4); *BCL11A-L*: 5'-GACGATGGCACTGTTAATGG-3' (SEQ ID NO:5) y (1) 5'-GGGTGTGTGAAGAACAAGTG-3' (SEQ ID NO:6); (2) 5'-AATGGGGGTGTGTGAAGAAC-3' (SEQ ID NO:7); *BCL11A-S*: 5'-CATGACCTCCTCACCTGTGG-3' (SEQ ID NO:8) y (1) 5'-GGTGTGTGAAGAACCCGCGG-3' (SEQ ID NO:9); (2) 5'-ATGGGGGTGTGTGAAGAACC-3' (SEQ ID NO:10); *EKLF*: 5'-GCCCTCCATCAGCACT-3' (SEQ ID NO:11) y 5'-GATCCTCCGAACCCAAAAG-3' (SEQ ID NO:12); *HA-EKLF*: 5'-ATATGATGTGCCGACTATGC-3' (SEQ ID NO:13) (secuencia de cebador dentro de HA tag) y 5'-GATCCTCCGAACCCAAAAG-3' (SEQ ID NO:14); *HBB* (PCR): *HBB* (PCR): 5'-CTTTAGTGATGGCTGGCTC-3' (SEQ ID NO:15) y 5'-GGCAGAATCCAGATGCTCAA-3' (SEQ ID NO:16); *HBB* (qPCR): 5'-GCAAGGTGAACGTGGATGAAG-3' (SEQ ID NO:17) y 5'-TCACCTTAGGGTTGCCATAACT-3' (SEQ ID NO:18); *HBG*: 5'-GGGCAAGGTGAATGTGGAAGAT-3' (SEQ ID NO:19) y 5'-GGGTCCATGGGTAGACAACCA-3' (SEQ ID NO:20); *PABPC1*: 5'-AGCTGTTCCCAACCCTGTAATC-3' (SEQ ID NO:21) y 5'-GGATAGTATGCAGCACGGTTCTG-3' (SEQ ID NO:22). Para el análisis de qPCR, todas las secuencias de genes diana se han normalizado a PABPC1 y calibrado a un control indicado en la leyenda de la figura.

Ejemplo 4 - Análisis de transferencia Western

Se prepararon células K562 transfectadas y células de sangre del cordón umbilical para el análisis de transferencia Western lavando los sedimentos celulares dos veces en 1 x HBSS y lisando, a continuación, células completas en tampón de solubilización (Tris HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Glicerol al 10 %, Triton al 1 %, SDS al 0,1 %, 1 x inhibidor de proteasa completa y PMSF 2 mM) durante 1 hora, seguido de 1 hora de tratamiento con 12,5 U de nucleasa Benzonase® (Novagen, Damstadt, Alemania). La proteína (3-15 µg) cuantificada mediante el reactivo de tinción de ensayo de proteínas BioRad se resolvió mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida (PAGE) al 8 %, 12 % o 18 % y se transfirió a una membrana de PVDF. EKLF, BCL11A y β-globina se detectaron mediante incubación con los siguientes anticuerpos; HA.II (16B12 Covance, Crawley, UK) o EKLF (H-210, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), Ct1p1 (14B5, Abcam, Cambridge, UK) y Hemoglobina β (37-8 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante un mínimo de 1 hora. Las bandas de proteínas se cuantificaron utilizando el software BIORAD Quantity One versión 4.5.1.

Ejemplo 5 - Preparación de lentivirus y transducción celular

Las regiones codificantes de EKLF y BCL11A-XL se amplificaron por PCR y se insertaron en el vector lentiviral pXLG3-eGFP o pXLG3-mcherry utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech). Se transfectaron células HEK 293T con las construcciones pMDG2 (recubrimiento viral), pCMVR8.91 (proteína de empaquetamiento) y pXLG3-eGFP-BCL11A-XL y pXLG3-mcherry-EKLF utilizando polietilenimina (PEI). Las soluciones de PEI/ADN se incubaron con las células durante 4 horas, después de lo cual se reemplazó el medio. Después de 48 horas, los medios que contenían el virus se filtraron y se dividieron en partes alícuotas. Las células eritroides se incubaron con 1 ml de virus con la adición de polibreno a 8 µg/ml. Las células se recogieron a las 48 horas y se fijaron con paraformaldehído al 4 % sobre cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina y se tomaron imágenes con microscopía confocal.

Resultados

Ejemplo 6 - Expresión de BCL11A en células K562

La expresión de los transcritos de BCL11A-XL, BCL11A-L y BCL11A-S se determinó en células K562, una línea celular eritropoyética que expresa HbE y HbF pero no HbA y en eritroblastos cultivados de células CD34+ de sangre periférica en el día 9 en cultivo como control positivo, mediante PCR utilizando cebadores específicos para cada variante de BCL11A. Se detectaron transcritos de las 3 variantes de BCL11A en los eritroblastos, pero no se detectaron transcritos en células K562 (Fig. 1A). Además, la proteína BCL11A de longitud completa se detectó fácilmente en los eritroides, pero no se detectaron variantes de longitud completa ni más cortas de la proteína BCL11A en las células K562 (Fig. 1B). Los transcritos para KLF-1 se detectaron en células K562, pero a un nivel bajo en comparación con los eritroblastos del día 9, sin embargo, no se detectó proteína KLF-1 (Figura 1C). Por lo tanto, las células K562 se consideran nulas para EKLF. La falta de expresión de β-globina en células K562, por lo tanto, se correlaciona con la falta de BCL11A y EKLF.

Ejemplo 7 - La transfección de células K562 con EKLF y BCL11A-XL induce la expresión de β-globina.

Las células K562 se transfectaron de manera transitoria con pCDNA3-Flag-BCL11A-XL (BCL11A-XL; 5 µg), pBp HA-EKLF (HA-EKLF; 5 µg) o cotransfectaron con ambos plásmidos (5 µg de cada uno). Las células se recogieron 20 horas después de la transfección y se analizaron para determinar la expresión de BCL11A, EKLF y β-globina. Las células transfectadas con BCL11A-XL o HA-EKLF expresaron las proteínas respectivas, las células cotransfectadas expresaron ambas proteínas (Fig. 2A). Los niveles de β-globina transcrita en las células sueltas y cotransfectadas se analizaron por qPCR. Se detectaron transcritos insignificantes para β-globina en células transfectadas con BCL11A mientras que se detectó un pequeño aumento (3 veces mayor que en células K562 no transfectadas) en los transfectantes HA-EKLF (Fig. 2B). Sin embargo, en la cotransfección con BCL11A-XL y HA-EKLF, los niveles de transcritos para β-globina aumentaron 168 veces en comparación con las células no transfectadas (Fig. 2B) con un aumento notable en los niveles de proteína β-globina (7,9 veces cuando se normaliza a la tubulina y compara con células K562 no transfectadas; Fig. 2C).

Ejemplo 8 - La expresión de β-globina es paralela a los niveles de expresión de BCL11A y EKLF

Para determinar si los niveles de expresión de β-globina aumentaron con el tiempo después de la transfección, se analizaron células K562 cotransfectadas con BCL11A-XL y HA-EKLF (5 µg de cada uno) para BCL11A, EKLF y β-globina a las 24 y 48 horas después de la transfección. Tras la transfección, los transcritos y la proteína para BCL11A y EKLF se detectaron fácilmente, pero sus niveles disminuyeron entre las 24 y 48 horas posteriores a la transfección (Figuras. 3A y B). La expresión de β-globina nuevamente fue marcadamente más alta en células cotransfectadas en comparación con las células no transfectadas, pero los niveles de transcritos también disminuyeron de 24 a 48 horas después de la transfección, en paralelo con la disminución de los niveles de BCL11A y EKLF (Fig. 3A y C). Además, la relación de la expresión de γ- a β-globina disminuyó después de la transfección pero aumentó ligeramente entre 24 y 48 horas después de la transfección (Fig. 3D).

Por lo tanto, la cotransfección de solo BCL11A-XL y EKLF es claramente suficiente para inducir y regular la expresión de β -globina en estas células.

Ejemplo 9 - La transfección de células K562 con una mayor cantidad de BCL11A-XL y EKLF mejora adicionalmente la expresión de β -globina

En un intento por aumentar el nivel de expresión de β -globina en células K562 cotransfectadas, se aumentó la cantidad de ADN utilizado para la transfección de 5 μ g a 10 μ g de cada plásmido. También se compararon los niveles de transcritos en diferentes momentos posteriores a la transfección y se encontró que 17 horas son óptimas en este ejemplo (datos no mostrados). La cotransfección con la mayor concentración de ADN aumentó el nivel de BCL11A y EKLF en las células (Fig. 4A). Las células K562 se transfectaron inicialmente con BCL11A-XL (10 μ g) o HA-EKLF (10 μ g) y se analizaron para determinar la expresión de β -globina 17 horas después de la transfección mediante qPCR. La transfección con solo BCL11A-XL o HA-EKLF aumentó el nivel de β -globina transcrita en 5,9 y 7,5 veces, respectivamente, en comparación con las células K562 no transfectadas (Fig. 4B). La cotransfección con 5 μ g de BCL11A-XL y HA-EKLF aumentó los niveles de β -globina transcrita en 305 $\pm$ 156,9 veces ($n = 2$) (Fig. 4B). Sin embargo, la cotransfección con 10 μ g de BCL11A-XL y HA-EKLF aumentó los niveles de β -globina transcrita en 887 $\pm$ 143 veces ($n = 2$) en comparación con las células K562 no transfectadas (Fig. 4B). La proteína beta globina se detectó en células K562 después de la transfección con ambas concentraciones de ADN (Fig. 4A). La proporción de la expresión de γ - a β -globina nuevamente disminuyó en la cotransfección con BCL11A-XL y EKLF, pero solo se detectó una disminución muy pequeña en la proporción en la transfección con 10 μ g en comparación con 5 μ g de cada plásmido (Fig. 4C).

La cotransfección de células con pCDNA3-Flag-BCL11A-L o pCDNA3-Flag-BCL11A-S junto con HA-EKLF (10 μ g de cada uno) no aumentó los niveles de expresión de β -globina en comparación con las células transfectadas con EKLF solo (datos no mostrados).

Por lo tanto, BCL11A-XL y EKLF individualmente tienen un efecto modesto en la inducción de la expresión de globina β . Sin embargo, la cotransfección de células K562 con BCL11A-XL y EKLF tiene un efecto fuerte en la inducción de la expresión de β -globina en estas células.

Ejemplo 10 - Expresión de BCL11A y EKLF en eritroblastos diferenciados de sangre de cordón umbilical en comparación con los progenitores de sangre periférica.

Los eritroblastos diferenciados de los progenitores CD34⁺ de sangre de cordón umbilical expresan predominantemente HbF (~ 65 %) a diferencia de los eritroblastos diferenciados de las células CD34⁺ de sangre periférica que expresan predominantemente HbA (-94 %), similar a las células eritroides adultas normales. La Figura 5A muestra las isoformas de globina presentes en los RBC adultos en comparación con los RBC de cordón umbilical.

Cambiar el perfil de expresión de globina en eritroblastos de sangre de cordón umbilical a células eritroides adultas es un objetivo altamente deseable ya que estas células tienen una excelente capacidad de expansión y, por lo tanto, son progenitores atractivos para sistemas *in vitro* dirigidos a generar RBC para fines de transfusión.

Los niveles de BCL11A y EKLF mostraron ser más bajos en los eritroblastos derivados de sangre de cordón umbilical en comparación con las células CD34⁺ de sangre periférica, en consonancia con sus perfiles de expresión de globina. El nivel de BCL11A y EKLF en eritroblastos cultivados a partir de progenitores de sangre periférica y de cordón se compararon en varios momentos en cultivo por transferencia Western con antisueros específicos de BCL11A y EKLF. Los niveles de EKLF (normalizados para el control de la tubulina) en los eritroblastos de sangre de cordón umbilical fueron significativamente más bajos en todos los puntos examinados que en los eritroblastos de la sangre periférica; 41, 10 y 2,5 veces para los días 6, 8 y 11 respectivamente (Fig. 5B). La diferencia en el nivel disminuyó a medida que la sincronización entre los dos cultivos disminuyó con la reducción en el número de prepro y pronormoblastos proliferativos y el aumento en la diferenciación de los eritroblastos en la sangre periférica en comparación con las células derivadas de sangre de cordón umbilical notoria el día 11 (Fig. 5C). Los niveles de BCL11A en eritroblastos en el día 6 y 8 en cultivo fueron 9 y 6 veces más bajos respectivamente en el cordón en comparación con los eritroblastos derivados de sangre periférica (Fig. 5B). En el día 11 en cultivo, los niveles de BCL11A habían disminuido y eran extremadamente bajos en ambas poblaciones celulares. Por lo tanto, los niveles tanto de BCL11A como de EKLF son consistentemente más bajos en eritroblastos derivados de sangre de cordón umbilical en comparación con los eritroblastos derivados de sangre periférica que se correlacionan con la proporción de expresión de γ - a β -globina en estas células.

Ejemplo 11: La cotransfección de eritroblastos derivados de sangre de cordón umbilical con BCL11A-XL y EKLF aumenta la expresión de β -globina

Se encontró que el aumento de la expresión de BCL11A y EKLF en los eritroblastos de sangre de cordón umbilical aumenta la expresión de la β -globina del adulto.

Los eritroblastos cultivados a partir de progenitores de sangre de cordón se cotransfectaron con BCL11A-XL y HA-EKLF. El programa de transfección dio como resultado una cantidad significativa de muerte celular (-50 %). Sin embargo, después de la transfección, los niveles de proteína BCL11A y HA-EKLF aumentaron notablemente en comparación con los de las células sometidas a nucleofección en ausencia de ADN (Fig. 6A). De forma correspondiente, los niveles de β -globina transcrita aumentaron en $4,9 \pm 1,3$ (Figura 6B; $n = 2$). También se analizaron los niveles de proteína β -globina en células transfectadas solo con BCL11A-XL o HA-KLF-1, así como en células cotransfectadas. El nivel de β -globina (normalizado a tubulina control) en células transfectadas con BCL11A o KLF-1 no mostró un aumento claro ($1,1 \pm 0,14$ y $1,23 \pm 0,18$ veces respectivamente, en comparación con las células de control). Sin embargo, las células cotransfectadas con BCL11A y KLF-1 mostraron un aumento de $5,1 \pm 2$ veces ($n = 3$) en el nivel de proteína β -globina, en comparación con las células de control (Figura 6A y C).

Estos datos demuestran claramente que el aumento de la expresión de BCL11A y EKLF en los eritroblastos derivados de sangre de cordón umbilical de como resultado un aumento significativo en la expresión de β -globina. El aumento en la expresión de β -globina obtenido fue significativo, ya que se ha informado una disminución de 5 veces en el ARNm de β -globina en KLF1 nulo [22].

Ejemplo 12 - Suministro de genes para EKLF y BCL11A en células eritroides usando procedimientos de transducción viral

Se desarrolló un sistema más eficaz para el suministro de los genes tanto para EKLF como para BCL11A en células eritroides. Se produjeron construcciones de lentivirus para ambos genes BCL11A y EKLF utilizando el plásmido pSEW-GFP de lentivirus (el plásmido de cadena principal, plásmido de empaquetamiento viral, plásmido de vector de transferencia y células 293T fueron donados por the School of Biochemistry). Para verificar la viabilidad de la línea celular eritropoyética del enfoque, las células K562 se transdujeron simultáneamente con las construcciones lentivirales pXLG3-mcherry-EKLF (Fig. 7A) y pXLG3-eGFP-BCL11A-XL (Fig. 7B). La eficacia de transducción fue rutinariamente $> 80 \%$. La superposición de las imágenes confocales de EKLF y BCL11A mostró $> 40 \%$ de expresión dual de los factores de transcripción (Fig. 7C).

Los eritroblastos de sangre de cordón se cotransdujeron el día 5 después del aislamiento con las construcciones de EKLF y BCL11A. Las células se aislaron del día 8 al 9 para el análisis de la expresión de globina por qPCR y transferencia Western.

Los eritroblastos generados a partir de células CD34+ de sangre de cordón umbilical de origen fetal son inherentemente menos maduros que los eritroblastos generados a partir de células CD34+ adultas, difiriendo en la expresión de algunos antígenos de RBC de la superficie celular; por ejemplo, el antígeno i en lugar del antígeno I adulto.

Siguiendo el protocolo de transducción dual, se permitió que las células se diferenciaron de la vía eritroide y se analizaron para determinar las características morfológicas y enucleación, se examinaron para determinar una serie de antígenos de glóbulos rojos de la superficie celular mediante citometría de flujo utilizando un grupo de antisueros específicos y para determinar propiedades funcionales que incluyen la unión de oxígeno y la liberación que son las medidas clave de un fenotipo adulto. La expresión inducida de EKLF y BCL11A indujo la maduración de las células de sangre de cordón umbilical a un fenotipo adulto y facilitó la enucleación.

REFERENCIAS

- [1] Bender, M. A.; Bulger, M.; Close, J.; Groudine, M. Beta-globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous beta-globin locus in mice do not require the locus control region. *Mol Cell* 5:387-393; 2000.
- [2] Forrester, W. C.; Thompson, C.; Elder, J. T.; Groudine, M. A developmentally stable chromatin structure in the human beta-globin gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:1359-1363; 1986.
- [3] Grosveld, F.; van Assendelft, G. B.; Greaves, D. R.; Kollias, G. Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* 51:975-985; 1987.
- [4] Tuan, D.; Solomon, W.; Li, Q.; Londres, I. M. The "beta-like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:6384-6388; 1985.
- [5] Noordermeer, D.; de Laat, W. Joining the loops: beta-globin gene regulation. *IUBMB life* 60:824-833; 2008.
- [6] Wijgerde, M.; Grosveld, F.; Fraser, P. Transcription complex stability and chromatin dynamics *in vivo*. *Nature* 377:209-213; 1995.
- [7] Dillon, N.; Grosveld, F. Human gamma-globin genes silenced independently of other genes in the beta-globin locus. *Nature* 350:252-254; 1991.
- [8] Raich, N.; Enver, T.; Nakamoto, B.; Josephson, B.; Papayannopoulou, T.; Stamatoyannopoulos, G. Autonomous developmental control of human embryonic globin gene switching in transgenic mice. *Science* 250:1147-1149; 1990.

- [9] Sabatino, D. E.; Cline, A. P.; Gallagher, P. G.; Garrett, L. J.; Stamatoyannopoulos, G.; Forget, B. G.; Bodine, D. M. Substitution of the human beta-spectrin promoter for the human agamma-globin promoter prevents silencing of a linked human beta-globin gene in transgenic mice. *Molecular and cellular biology* 18:6634-6640; 1998.
- [10] Tanavde, V. M.; Malehorn, M. T.; Lumkul, R.; Gao, Z.; Wingard, J.; Garrett, E. S.; Civin, C. I. Human stem-progenitor cells from neonatal cord blood have greater hematopoietic expansion capacity than those from mobilized adult blood. *Exp Hematol* 30:816-823; 2002.
- [11] Kaufman, D. S. Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 114:3513-3523; 2009.
- [12] Peyrard, T.; Bardiaux, L.; Krause, C.; Kobari, L.; Lapillonne, H.; Andreu, G.; Douay, L. Banking of pluripotent adult stem cells as an unlimited source for red blood cell production: potential applications for alloimmunized patients and rare blood challenges. *Transfus Med Rev* 25:206-216; 2011.
- [13] Lettre, G.; Sankaran, V. G.; Bezerra, M. A.; Araujo, A. S.; Uda, M.; Sanna, S.; Cao, A.; Schlessinger, D.; Costa, F. F.; Hirschhorn, J. N.; Orkin, S. H. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal haemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:11869-11874; 2008.
- [14] Menzel, S.; Garner, C.; Gut, I.; Matsuda, F.; Yamaguchi, M.; Heath, S.; Foglio, M.; Zelenika, D.; Boland, A.; Rooks, H.; Best, S.; Spector, T. D.; Farrall, M.; Lathrop, M.; Thein, S. L. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nature genetics* 39:1197-1199; 2007.
- [15] Sedgewick, A. E.; Timofeev, N.; Sebastiani, P.; So, J. C.; Ma, E. S.; Chan, L. C.; Fucharoen, G.; Fucharoen, S.; Barbosa, C. G.; Vardarajan, B. N.; Farrer, L. A.; Baldwin, C. T.; Steinberg, M. H.; Chui, D. H. BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with beta-hemoglobinopathies. *Blood Cells Mol Dis* 41:255-258; 2008.
- [16] Uda, M.; Galanello, R.; Sanna, S.; Lettre, G.; Sankaran, V. G.; Chen, W.; Usala, G.; Busonero, F.; Maschio, A.; Albai, G.; Piras, M. G.; Sestu, N.; Lai, S.; Dei, M.; Mulas, A.; Crisponi, L.; Naitza, S.; Asunis, I.; Deiana, M.; Nagaraja, R.; Perseu, L.; Satta, S.; Cipollina, M. D.; Sollaino, C.; Moi, P.; Hirschhorn, J. N.; Orkin, S. H.; Abecasis, G. R.; Schlessinger, D.; Cao, A. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal haemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:1620-1625; 2008.
- [17] Sankaran, V. G.; Menne, T. F.; Xu, J.; Akie, T.E.; Lettre, G.; Van Handel, B.; Mikkola, H. K.; Hirschhorn, J. N.; Cantor, A. B.; Orkin, S. H. Human fetal haemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science* 322:1839-1842; 2008.
- [18] Liu, H.; Ippolito, G. C.; Wall, J. K.; Niu, T.; Probst, L.; Lee, B. S.; Pulford, K.; Banham, A. H.; Stockwin, L.; Shaffer, A. L.; Staudt, L. M.; Das, C.; Dyer, M. J.; Tucker, P. W. Functional studies of BCL11A: characterization of the conserved BCL11A-XL splice variant and its interaction with BCL6 in nuclear paraspeckles of germinal center B cells. *Mol Cancer* 5:18; 2006.
- [19] Xu, J.; Sankaran, V. G.; Ni, M.; Menne, T. F.; Puram, R. V.; Kim, W.; Orkin, S. H. Transcriptional silencing of {gamma}-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes & development* 24:783-798; 2010.
- [20] Sankaran, V. G.; Xu, J.; Ragoczy, T.; Ippolito, G. C.; Walkley, C. R.; Maika, S. D.; Fujiwara, Y.; Ito, M.; Groudine, M.; Bender, M. A.; Tucker, P. W.; Orkin, S. H. Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature* 460:1093-1097; 2009.
- [21] Xu, J.; Peng, C.; Sankaran, V. G.; Shao, Z.; Esrick, E. B.; Chong, B. G.; Ippolito, G. C.; Fujiwara, Y.; Ebert, B. L.; Tucker, P. W.; Orkin, S. H. Correction of Sickle Cell Disease in Adult Mice by Interference with Fetal Hemoglobin Silencing. *Science* 334:993-996; 2011.
- [22] Hodge, D.; Coghill, E.; Keys, J.; Maguire, T.; Hartmann, B.; McDowall, A.; Weiss, M.; Grimmond, S.; Perkins, A. A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood* 107:3359-3370; 2006.
- [23] Miller, I. J.; Bieker, J. J. A novel, erythroid cell- specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Molecular and cellular biology* 13:2776-2786; 1993.
- [24] Wijgerde, M.; Gribnau, J.; Trimborn, T.; Nuez, B.; Philipsen, S.; Grosveld, F.; Fraser, P. The role of EKLF in human beta-globin gene competition. *Genes & development* 10:2894-2902; 1996.
- [25] Bieker, J. J. Probing the onset and regulation of erythroid cell-specific gene expression. *The Mount Sinai journal of medicine, Nueva York* 72:333-338; 2005.
- [26] Zhou, D.; Liu, K.; Sun, C. W.; Pawlik, K. M.; Townes, T. M. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nature genetics* 42:742-744; 2010.
- [27] Drissen, R.; von Lindern, M.; Kolbus, A.; Driegen, S.; Steinlein, P.; Beug, H.; Grosveld, F.; Philipsen, S. The erythroid phenotype of EKLF-null mice: defects in haemoglobin metabolism and membrane stability. *Molecular and cellular biology* 25:5205-5214; 2005.
- [28] Funnell, A. P.; Maloney, C. A.; Thompson, L. J.; Keys, J.; Tallack, M.; Perkins, A. C.; Crossley, M. Erythroid Kruppel-like factor directly activates the basic Kruppel-like factor gene in erythroid cells. *Molecular and cellular biology* 27:2777-2790; 2007.
- [29] Pilon, A. M.; Arcasoy, M. O.; Dressman, H. K.; Vayda, S. E.; Maksimova, Y. D.; Sangerman, J. I.; Gallagher, P. G.; Bodine, D. M. Failure of terminal erythroid differentiation in EKLF-deficient mice is associated with cell cycle perturbation and reduced expression of E2F2. *Molecular and cellular biology* 28:7394-7401; 2008.
- [30] Singleton, B. K.; Burton, N. M.; Green, C.; Brady, R. L.; Anstee, D. J. Mutations in EKLF/KLF1 form the molecular basis of the rare blood group In(Lu) phenotype. *Blood* 112:2081-2088; 2008.

- [31] Armstrong, J. A.; Bieker, J. J.; Emerson, B. M. A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF *in vitro*. Cell 95:93-104; 1998.
- [32] Ouyang, L.; Chen, X.; Bieker, J. J. Regulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) transcriptional activity by phosphorylation of a protein kinase casein kinase II site within its interaction domain. The Journal of biological chemistry 273:23019-23025; 1998.
- [33] Zhang, W.; Bieker, J. J. Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:9855-9860; 1998.
- [34] Zhang, W.; Kadam, S.; Emerson, B. M.; Bieker, J. J. Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid Kruppel-like factor transcriptional activity via its interaction with the SWI- SNF complex. Molecular and cellular biology 21:2413-2422; 2001.
- [35] Im, H.; Grass, J. A.; Johnson, K. D.; Kim, S. I.; Boyer, M. E.; Imbalzano, A. N.; Bieker, J. J.; Bresnick, E. H. Chromatin domain activation via GATA- 1 utilization of a small subset of dispersed GATA motifs within a broad chromosomal region. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:17065-17070; 2005.
- [36] Drissen, R.; Palstra, R. J.; Gillemans, N.; Splinter, E.; Grosveld, F.; Philipsen, S.; de Laat, W. The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF. Genes & development 18:2485-2490; 2004.
- [37] Griffiths RE et al. Maturing human reticulocytes reduce plasma membrane by endocytosis of Glycophorin A-containing vacuoles which fuse with autophagosomes and exocytose. Blood 2012 Jun 28;119(26):6296-306

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NHS Blood and Transplant

<120> MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE CÉLULAS Y COMPOSICIONES

<130> P5097WO1

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 1

gattacgctg aattctcatg gccacagcc gagacc 36

<210> 2

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 2

gatactcgag aattctcaaa ggtggcgctt catg 34

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 3

agatcccttc cttagcttcg 20

	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<400> 4	
10	tcaacactcg atcactgtgc	20
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<400> 5	
20	gacgatggca ctgttaatgg	20
	<210> 6	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
30	<400> 6	
	gggtgtgtga agaacaagtg	20
	<210> 7	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Secuencia artificial	
	<400> 7	
	aatgggggtg tgtgaagaac	20
45	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<400> 8	
55	catgacctcc tcacctgtgg	20
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<400> 9	
65	ggtgtgtgaa gaacccgcgg	20

	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<400> 10	
10	atgggggtgt gtgaagaacc	20
	<210> 11	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<400> 11	
20	gccctccatc agcacact	18
	<210> 12	
	<211> 19	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
30	<400> 12	
	gatcctccga acccaaaag	19
	<210> 13	
35	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Secuencia artificial	
	<400> 13	
	atatgatgtg cccgactatg c	21
45	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<400> 14	
55	gatcctccga acccaaaag	19
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<400> 15	
65	cttagtgat ggcctggctc	20

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <400> 16
 10 ggcagaatcc agatgctcaa 20
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 20 <400> 17
 gcaaggatgaa cgtggatgaa g 21
 <210> 18
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 30 <400> 18
 tcacctagg gttgccata act 23
 <210> 19
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia artificial
 <400> 19
 gggcaaggatg aatgtgaag at 22
 45 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <400> 20
 55 ggtccatgg gtagacaacc a 21
 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <400> 21
 65 agctgtccc aaccctgtaa tc 22

<210> 22
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia artificial

10 <400> 22
ggatagtatg cagcacggtt ctg 23

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para preparar glóbulos rojos adultos que comprende las etapas de cultivar células madre o líneas celulares eritropoyéticas obtenidas en un medio definido y modificar las células con al menos un factor de transcripción para convertir la globina fetal en globina del adulto, en donde la expresión de la β -globina del adulto aumenta en comparación con las células no modificadas y en donde el al menos un factor de transcripción es BCL11A.
- 10 2. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se induce la expresión de globina del adulto en comparación con una célula no modificada.
3. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde las células madre o las líneas celulares eritropoyéticas expresan hemoglobina fetal.
- 15 4. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde las células se convierten de un fenotipo fetal a un fenotipo adulto.
5. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el método incluye una etapa adicional de enucleación de células en la que las células derivan de células madre pluripotentes inducidas.
- 20 6. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde las células expresan el antígeno de superficie CD34.
- 25 7. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende la etapa de modificar las células con una combinación de BCL11A y EKLF.
8. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde las células se obtienen de sangre de cordón umbilical, células madre pluripotentes inducidas, células madre eritropoyéticas o líneas celulares eritropoyéticas.
- 30 9. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde los medios de cultivo comprenden al menos uno de suero, suero fetal bovino, insulina, heparina, transferrina.
10. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 9, en donde los medios pueden complementarse con al menos uno de SCF, EPO o transferrina saturada de hierro.
- 35 11. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que el BCL11A es BCL11A-XL.

Figura 1 A- C

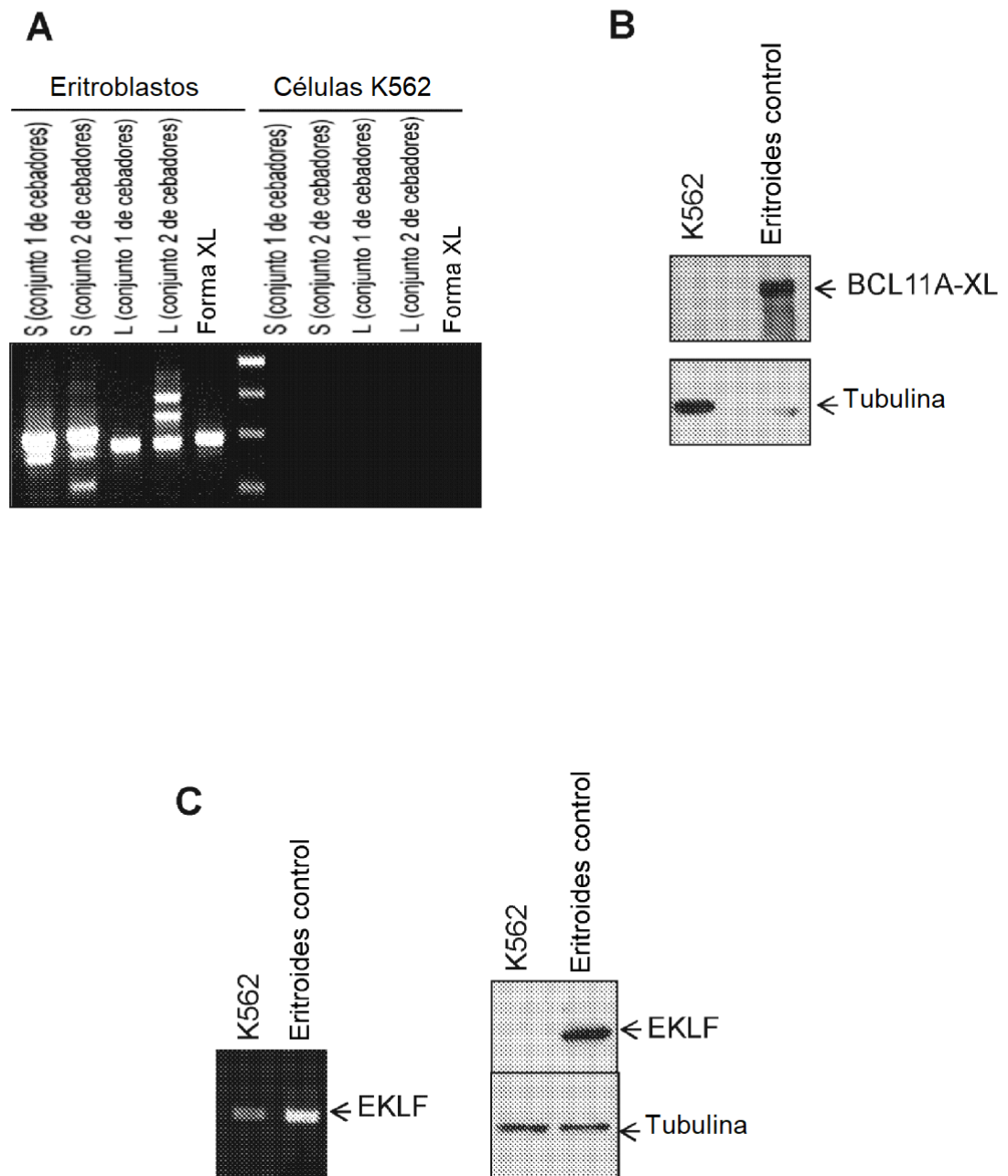


Figura 2 A

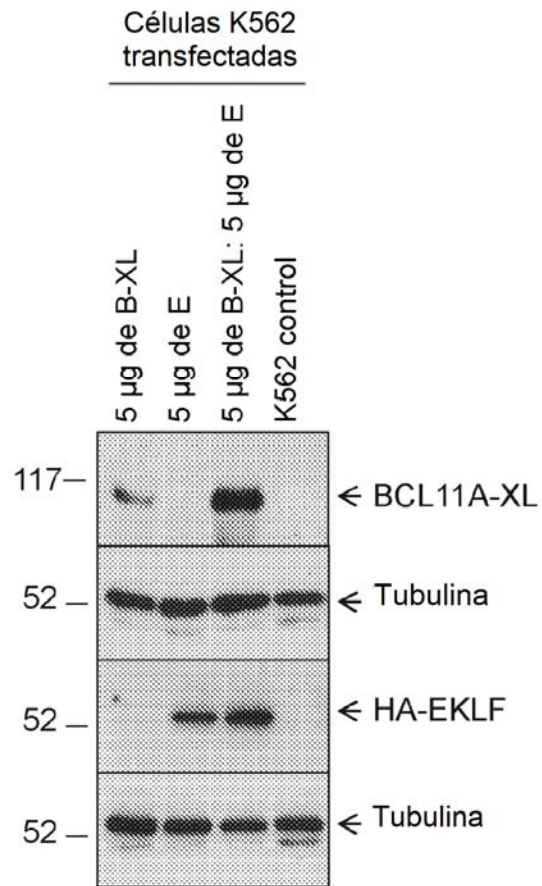


Figura 2 B- C

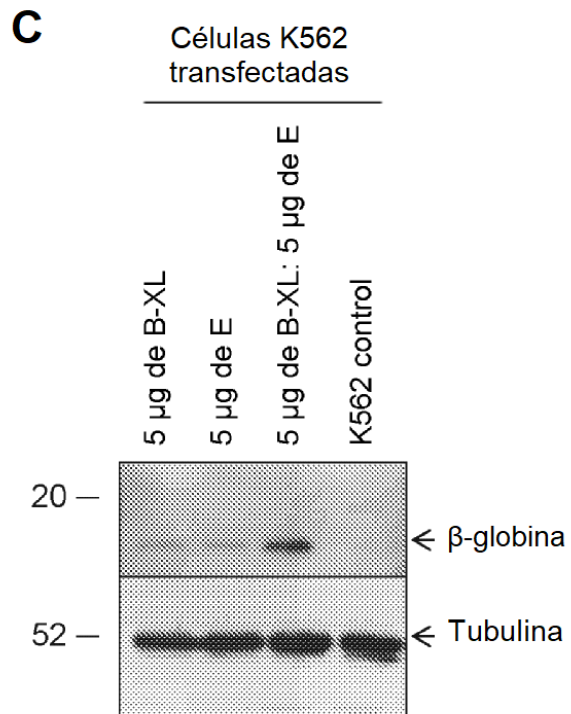
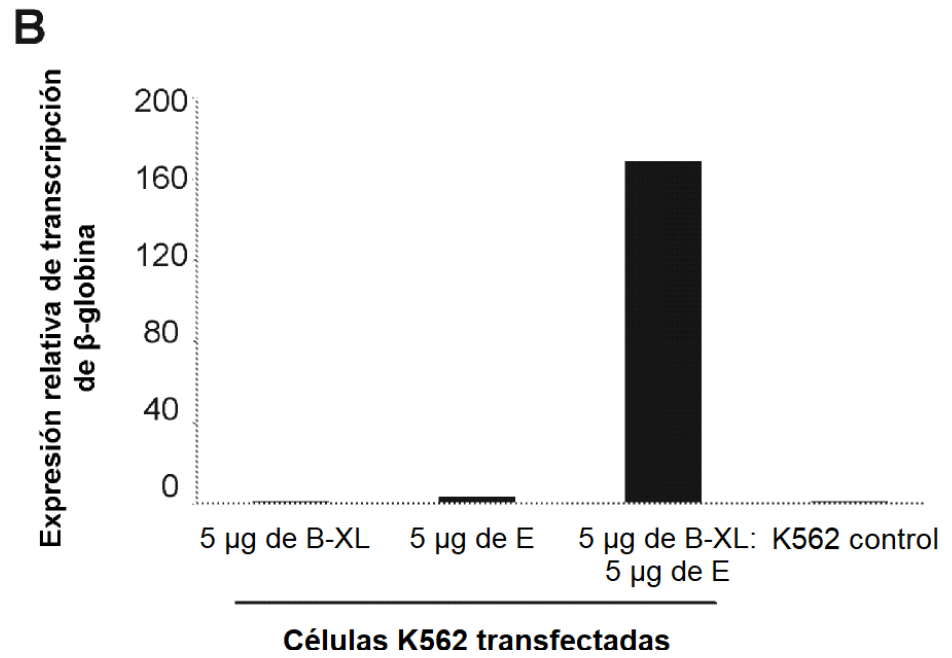


Figura 3 A

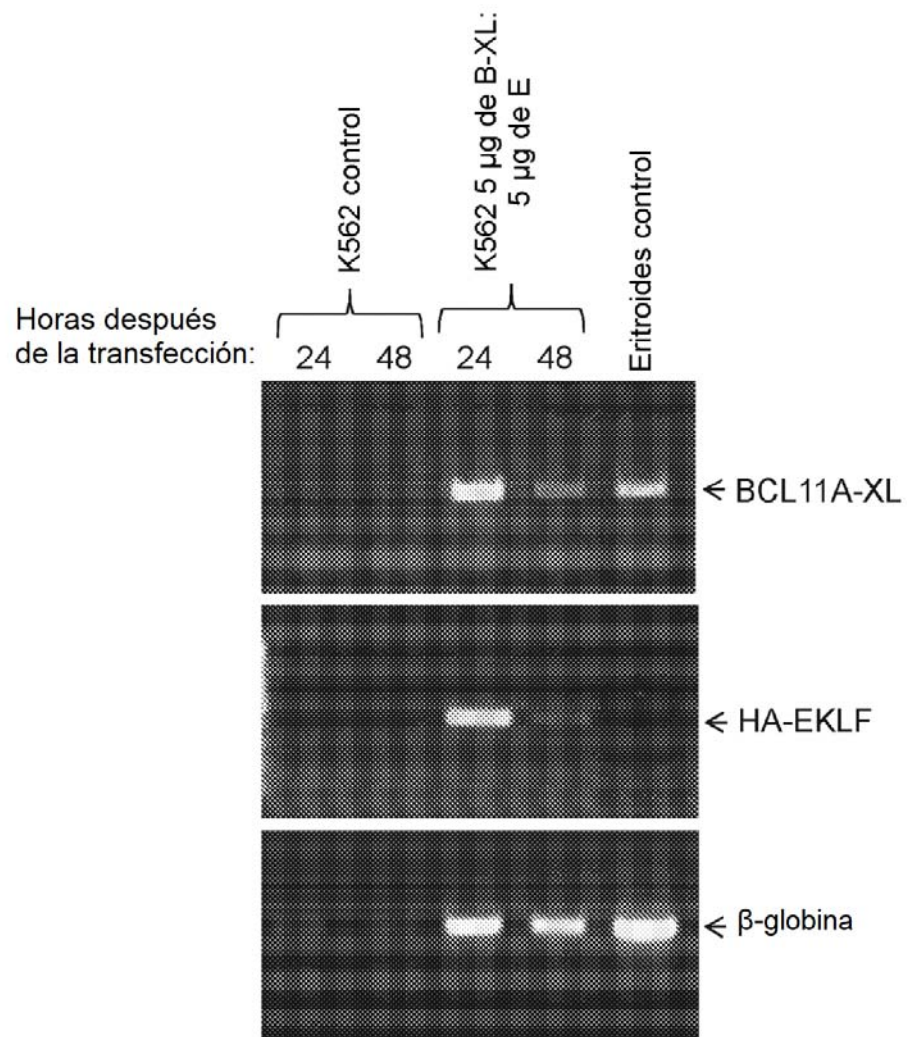


Figura 3 B

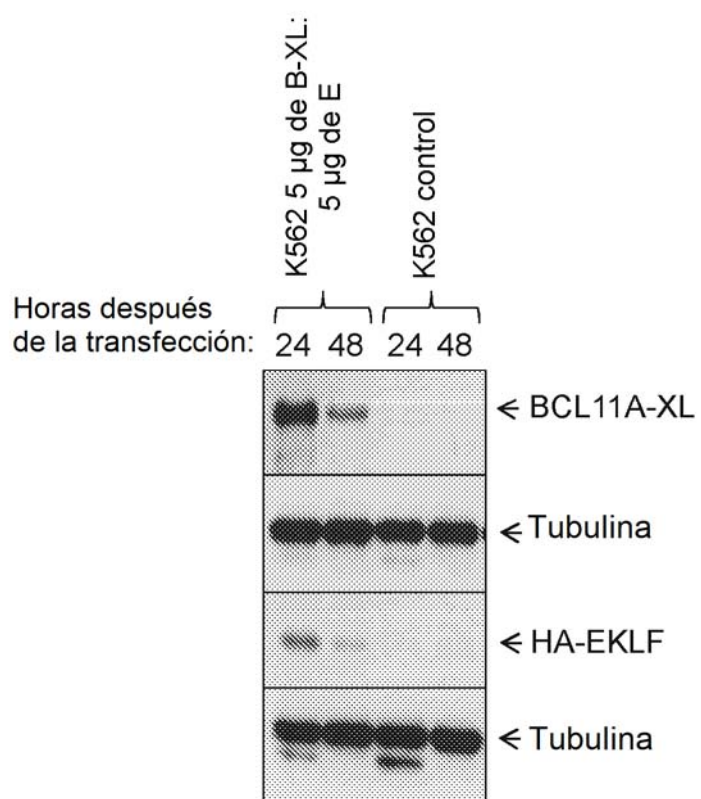


Figura 3 C- D

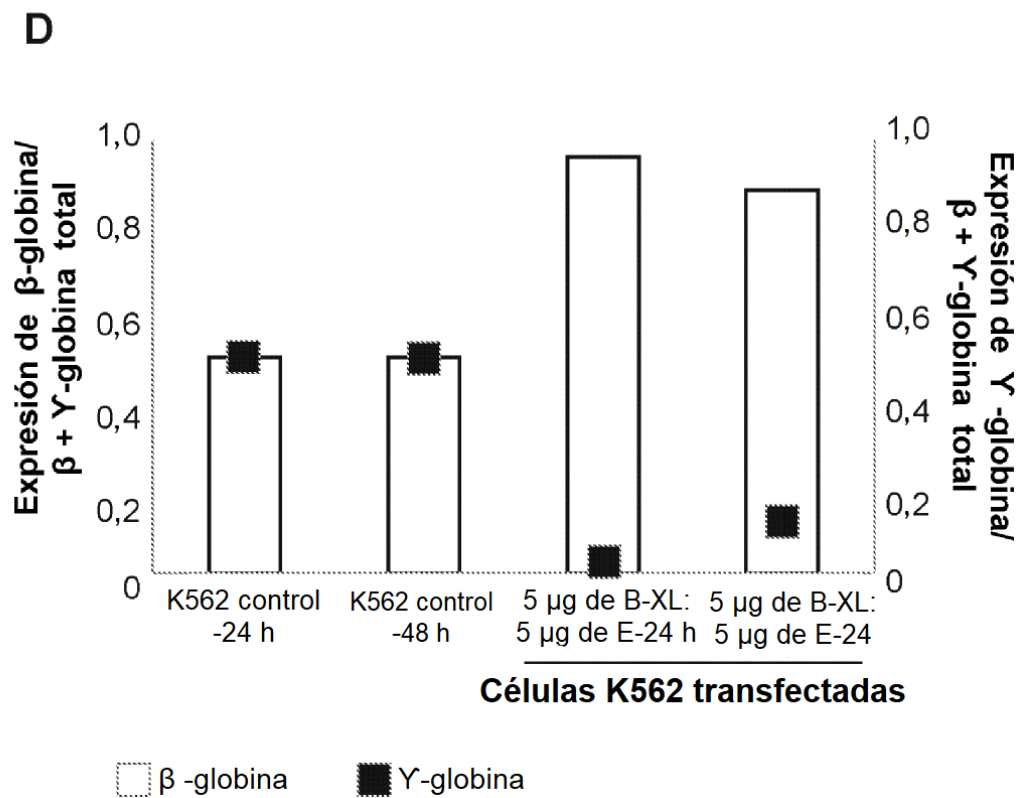
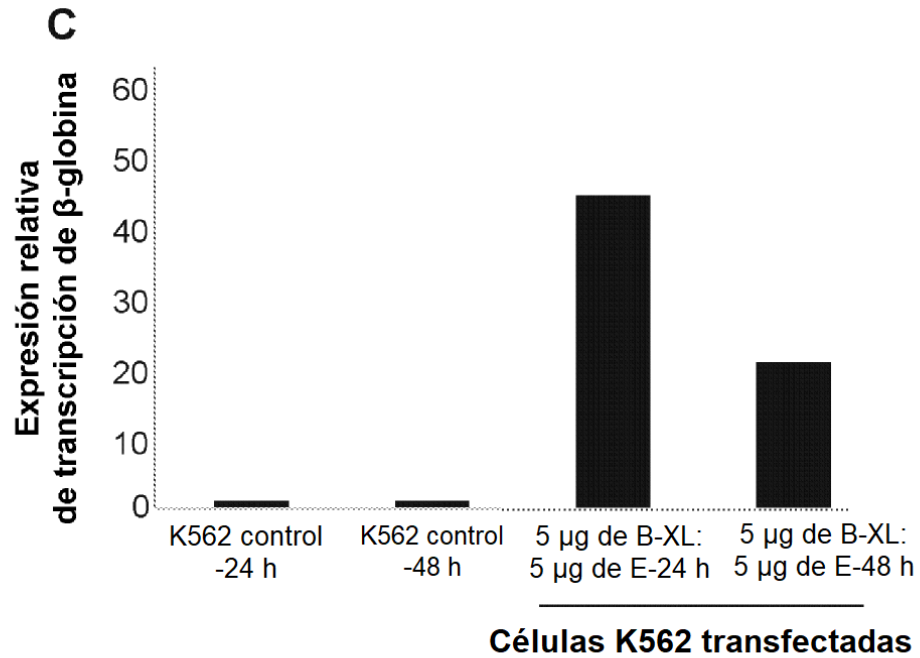


Figura 4 A

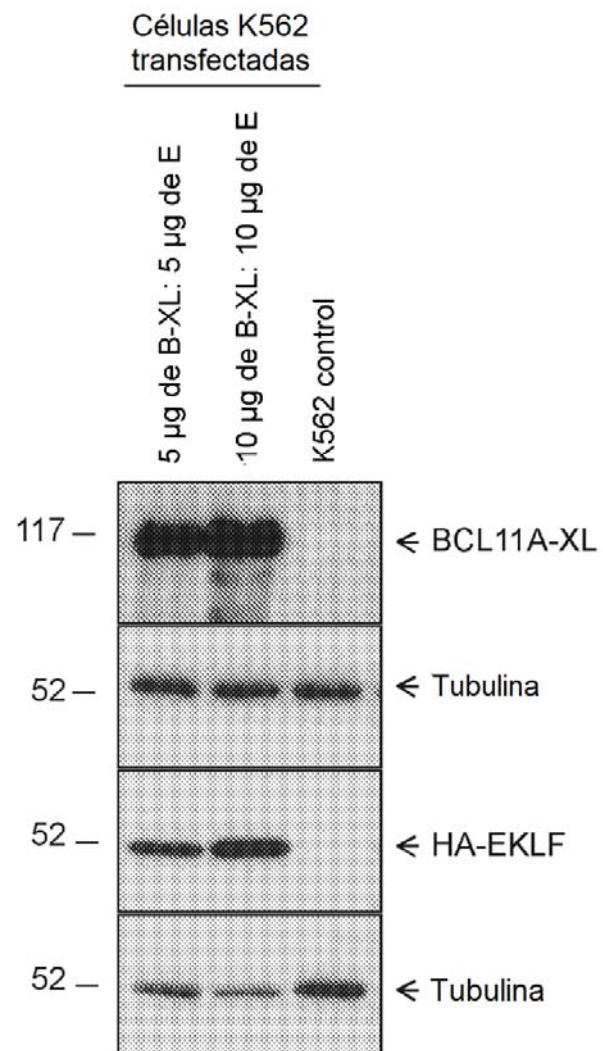


Figura 4 B- C

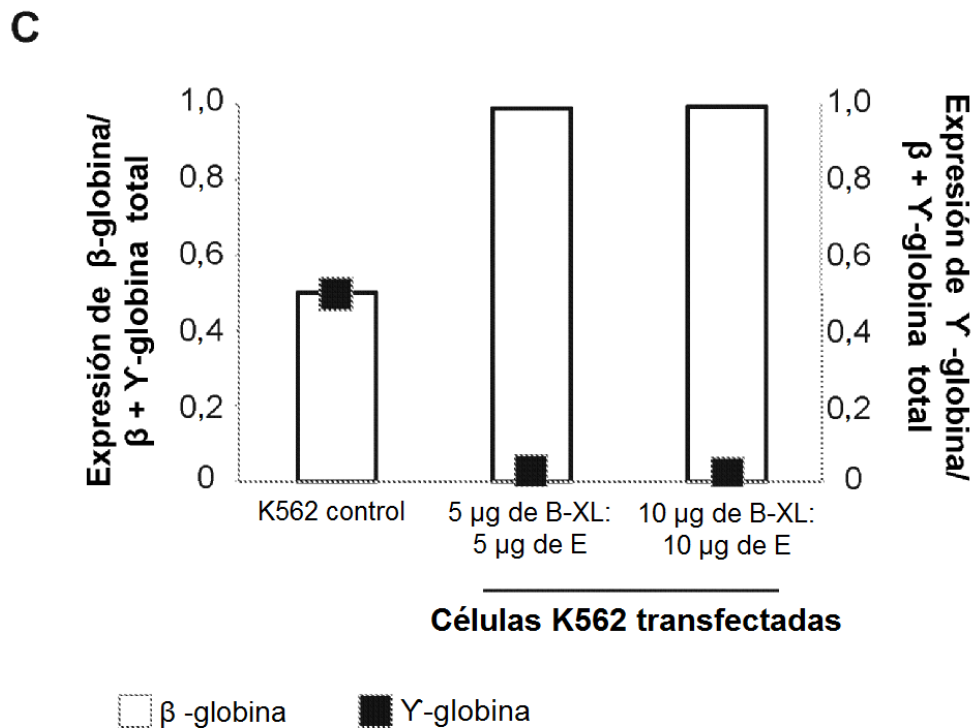
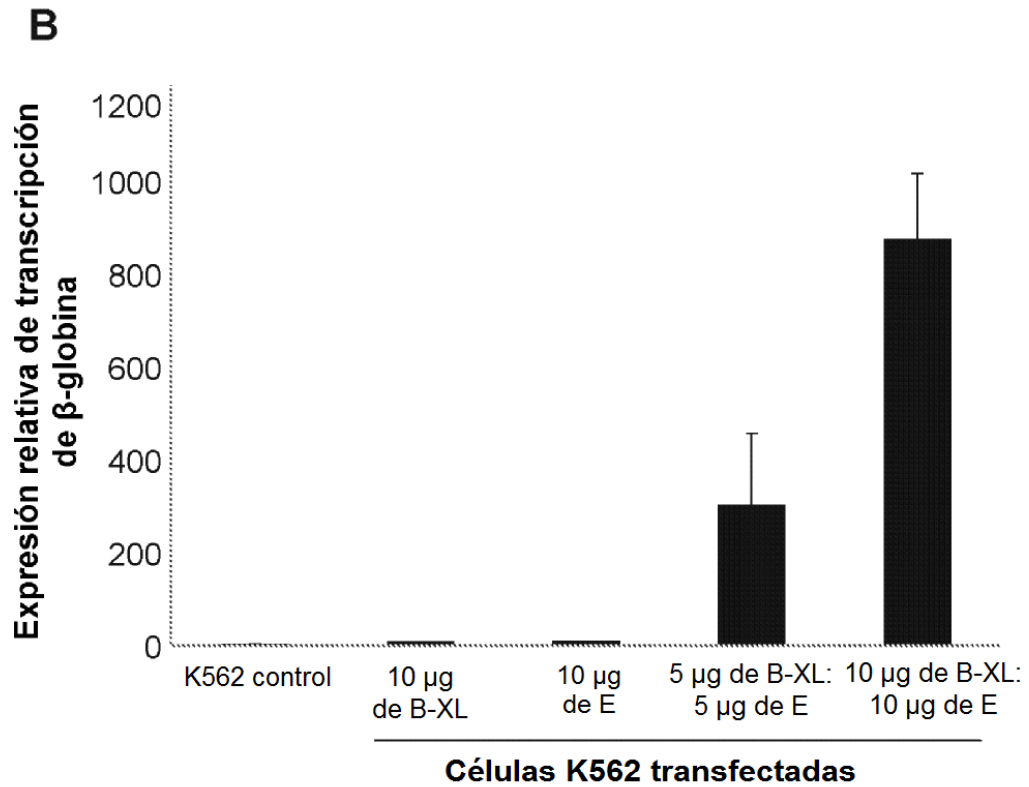


Figura 4 D- E

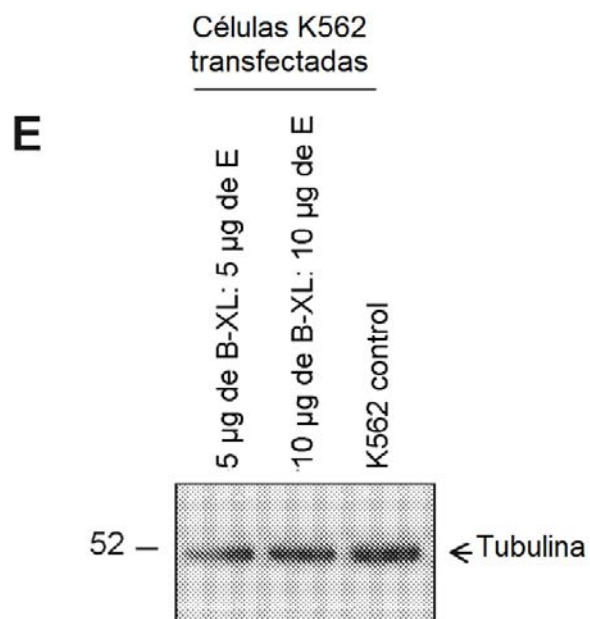
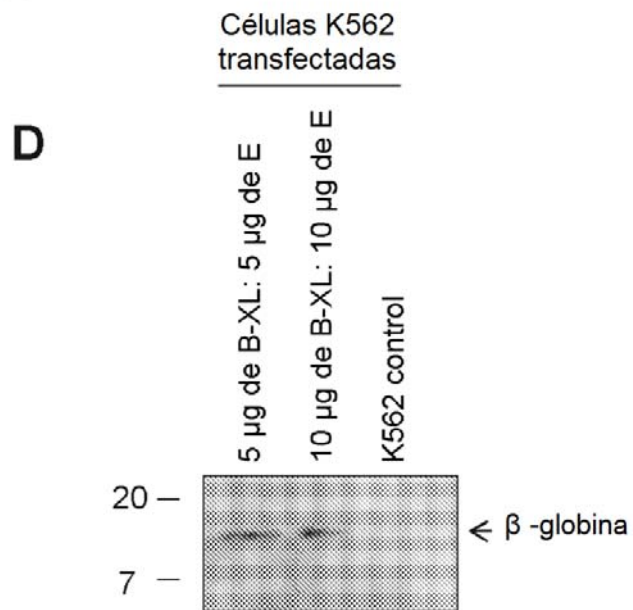


Figura 5 A- B

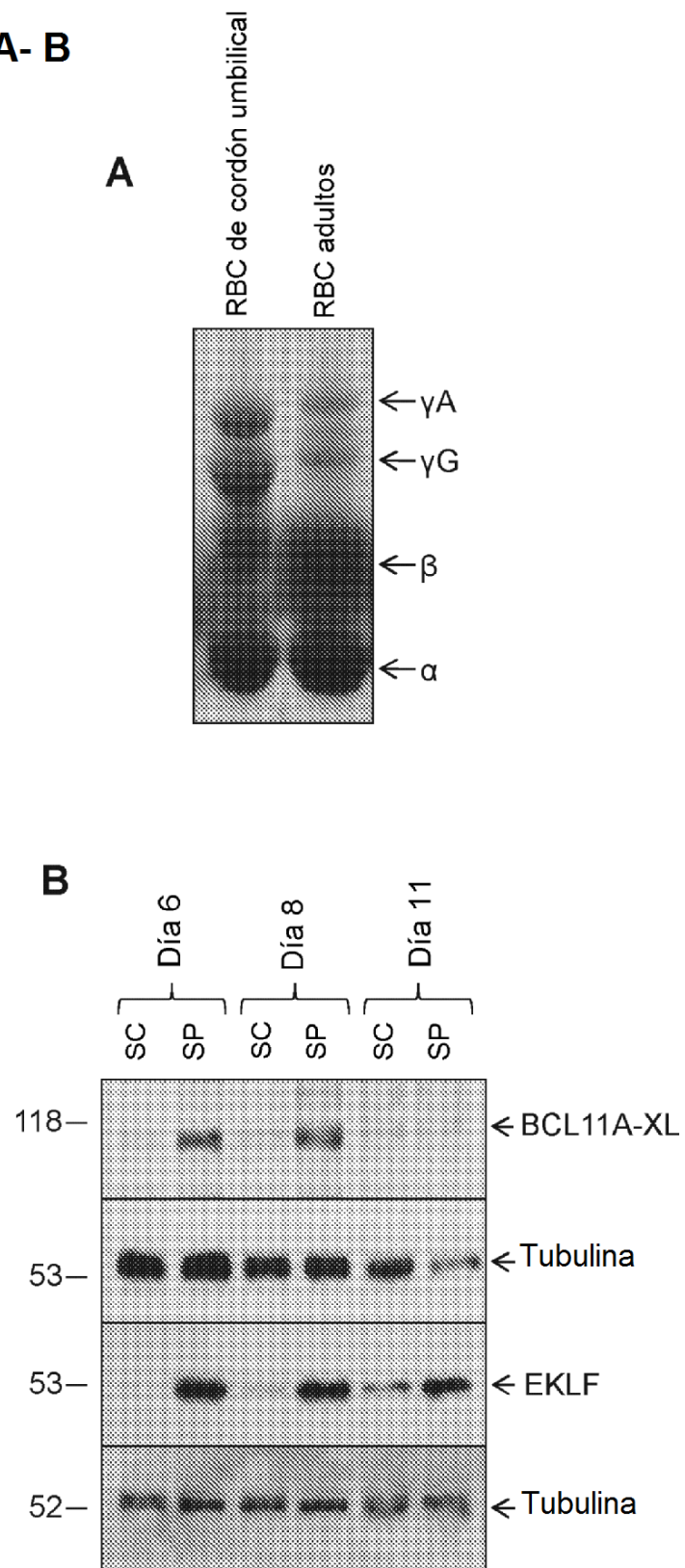


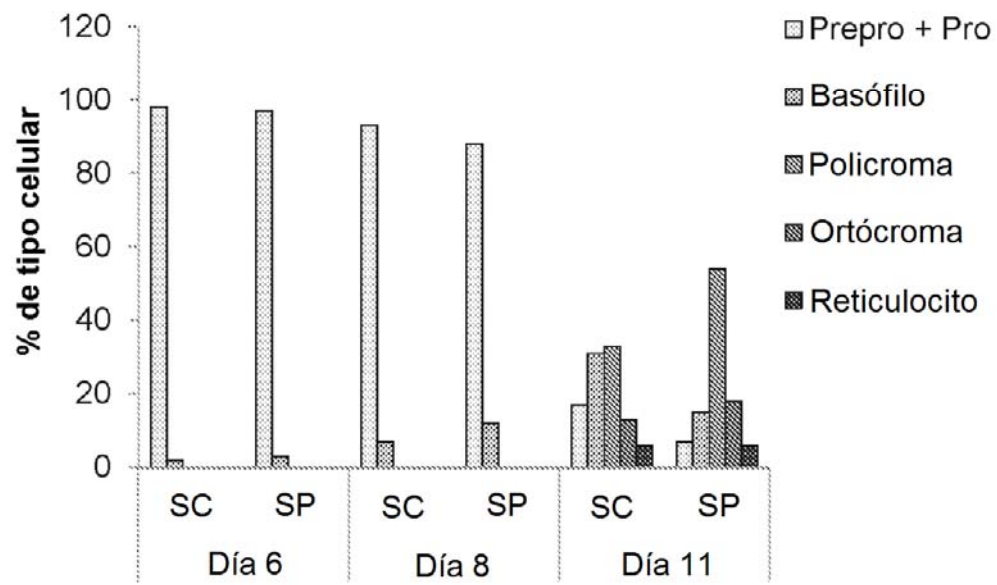
Figura 5 C

Figura 6 A

Células sanguíneas
de cordón umbilical

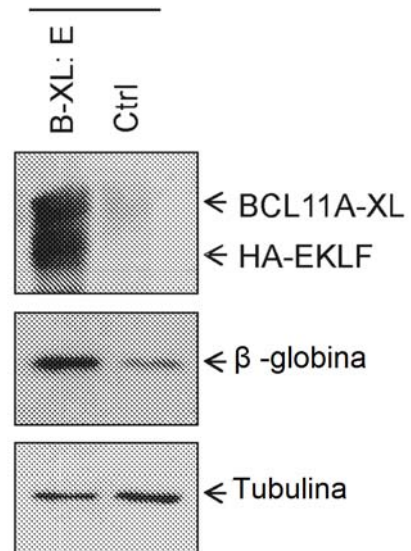


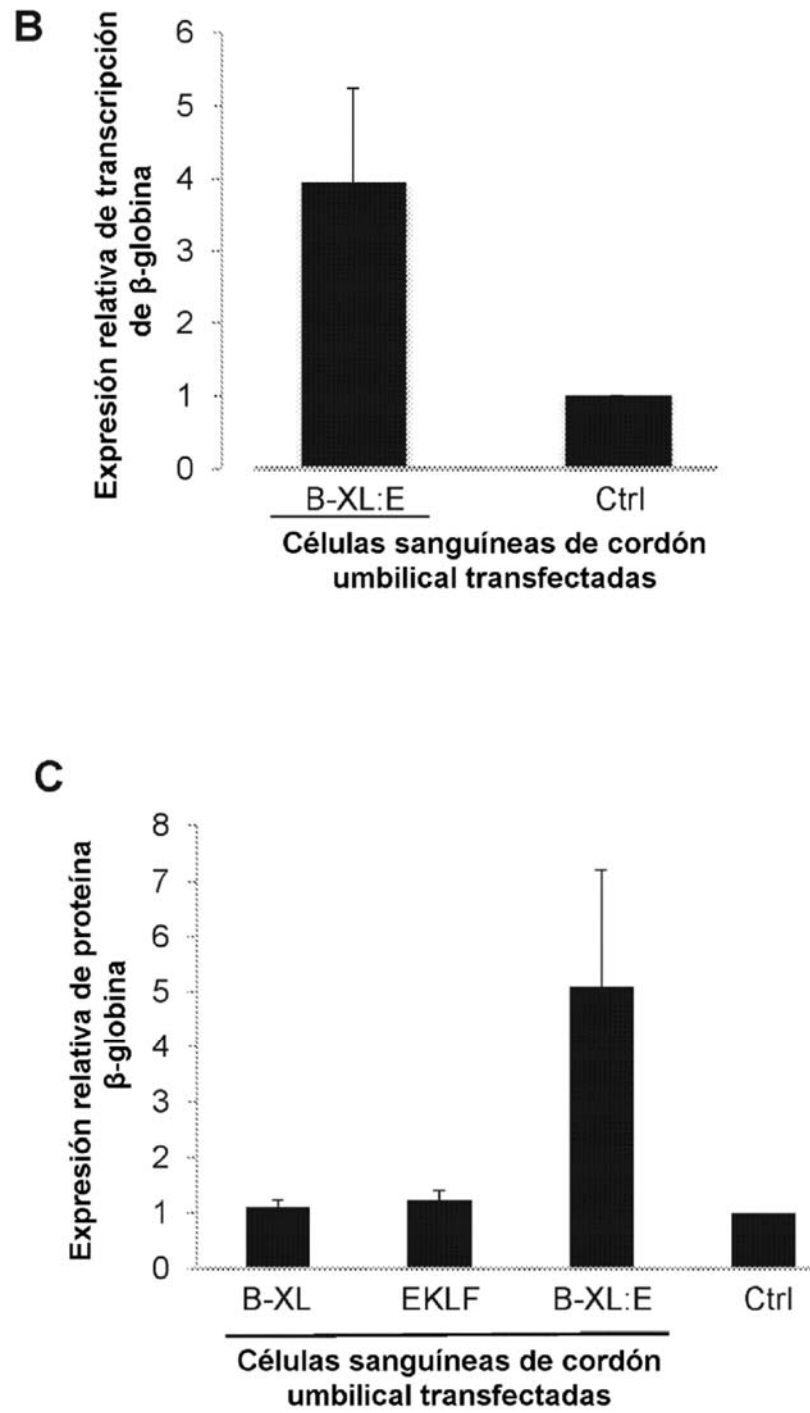
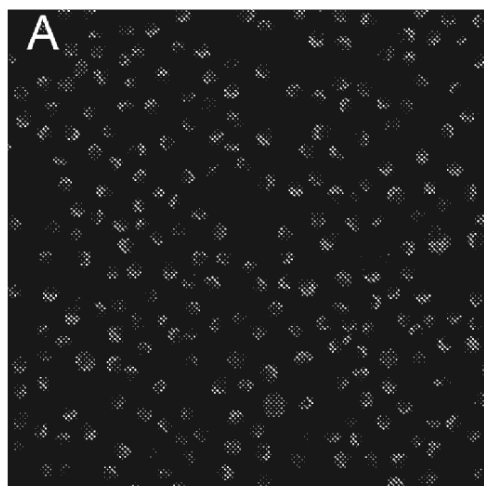
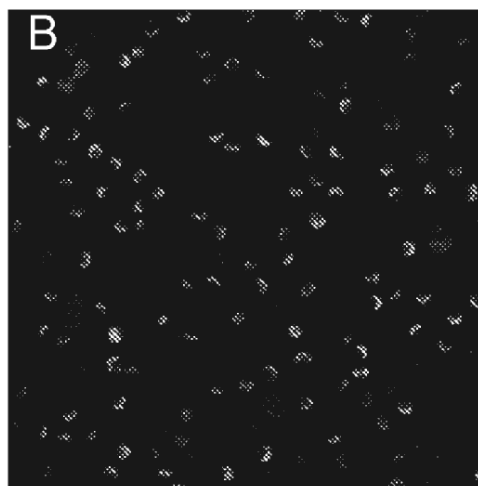
Figura 6 B- C

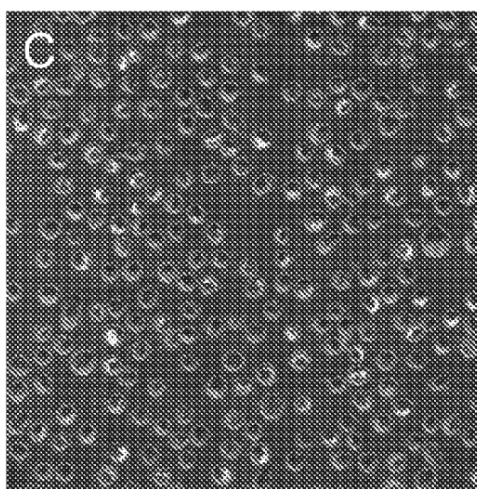
Figura 7 A- C



Expresión de EKLf



Expresión de BCL11A-XL



Superposición de imágenes
de expresión EKLf y BCL11A