

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 449**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

C12N 5/078 (2010.01)

A61K 35/18 (2015.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014** **PCT/US2014/022971**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014** **WO14164604**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014** **E 14778538 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 2970898**

54 Título: **La producción y el uso de glóbulos rojos**

30 Prioridad:

11.03.2013 US 201361776732 P

12.03.2013 US 201313797648

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

19.02.2020

73 Titular/es:

TAIGA BIOTECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
12635 East Montview Boulevard, Suite 214
Aurora, CO 80045, US

72 Inventor/es:

TURNER, BRIAN CURTIS;
REFAELI, YOSEF y
BIRD, GREGORY A.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 743 449 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

La producción y el uso de glóbulos rojos

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la Solicitud Provisional de los EE.UU. N.º 61/776.732, presentada el 11 de marzo de 2013 y la Solicitud de Utilidad de los EE.UU. N.º 13/797.648, presentado el 12 de marzo de 2013.

10

Presentación de la lista de secuencias en el archivo de texto ASCII

El contenido de la siguiente presentación en el archivo de texto ASCII se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad: una forma legible por ordenador (FLO) de la Lista de Secuencias (nombre de archivo: 106417-0181_Seq_List.txt, fecha registrada: 10 de marzo de 2013, tamaño: 9KB).

15

Campo

La presente divulgación se refiere a nuevos métodos de producción de glóbulos rojos maduros a partir de células madre hematopoyéticas *in vitro* y a su uso terapéutico y diagnóstico *in vivo*.

20

Antecedentes

La transfusión de glóbulos rojos (GR) se usa de forma rutinaria para muchas aplicaciones clínicas y quirúrgicas. De media, se necesitan 39.000 unidades de sangre cada día y los datos de 2004 indican que se transfundieron 29 millones de unidades de sangre en un año (sitio web de la Asociación Estadounidense de Bancos de Sangre). Este procedimiento por sí solo ha salvado muchas vidas en los últimos 60 años. La demanda de dichas transfusiones continúa aumentando con los avances en los tratamientos médicos y el envejecimiento de la población.

25

Además de los entornos clínicos tradicionales que se han beneficiado de la disponibilidad de la transfusión de glóbulos rojos, tales como la cirugía y el tratamiento de pacientes de traumatología, existe una serie de casos únicos en los que la transfusión de glóbulos rojos cambiaría el tratamiento de referencia. Por ejemplo, existe una serie de fenotipos raros de GR en pacientes con ascendencia afrocaribeña (Douay et al., *Transfusion Medicine Reviews* 21, 91-100, 2007). Se consideran fenotipos raros, debido a la falta de antígenos tales como los grupos sanguíneos H o ABO. Dichos pacientes pueden desarrollar una respuesta de anticuerpos neutralizantes a los antígenos del grupo sanguíneo ABO, lo que hace que no sean elegibles para transfusiones de GR. De hecho, dichos pacientes deben recibir transfusiones de una fuente idéntica para evitar una respuesta de anticuerpos neutralizantes, lo que plantea enormes desafíos en los casos en que se requieren transfusiones de glóbulos rojos repetidas (por ejemplo, pacientes con células falciformes, etc.).

35

Adicionalmente, los pacientes que padecen una diversidad de enfermedades autoinmunitarias basadas en anticuerpos y experimentan anemia hemolítica autoinmunitaria también pueden beneficiarse de las transfusiones de glóbulos rojos. Sin embargo, esto presenta un desafío para encontrar un donante o un conjunto limitado de donantes cuyos GR sean compatibles con los autoanticuerpos de los pacientes. En esencia, estos pacientes experimentan los mismos desafíos que aquellos con fenotipos sanguíneos raros.

40

Por otra parte, los pacientes que padecen hemoglobinopatías y talasemias tienen mutaciones congénicas que dan como resultado una vida más corta para sus GR. Aunque la idea de mejorar la vida y la salud de estos pacientes con transfusiones de sangre es antigua, la frecuencia de transfusiones necesaria presenta un problema importante. El promedio de semivida de los GR de un donante sano es de 28 días. El número de transfusiones necesarias para estos pacientes es grande, frecuente, y plantea un riesgo significativamente mayor de infección yatrogénica. La capacidad de generar GR *in vitro* y de proporcionar transfusiones de GR sincronizados con una semivida de 120 días reduciría enormemente el número de transfusiones necesarias para estos pacientes y mejoraría realmente su calidad de vida.

50

El problema de la semivida de los GR recolectados de donantes también es importante en el contexto del uso clínico tradicional de los GR para procedimientos de traumatología y quirúrgicos. El almacenamiento de concentrados de GR durante hasta un mes puede dar como resultado una población de GR que necesita al menos 24 horas para recuperar su capacidad para transportar oxígeno. Además, una serie de GR necróticos en esos concentrados podría desencadenar una respuesta inflamatoria en el receptor, junto con las complicaciones que surgen de una respuesta inflamatoria de este tipo. La capacidad de generar un suministro constante de glóbulos rojos *in vitro* permitiría a los profesionales de la salud anticipar y satisfacer las demandas de GR recién preparados y también eliminaría la necesidad de un almacenamiento a largo plazo de concentrados de GR.

55

Otro problema con las transfusiones de glóbulos rojos es la creciente dificultad para proporcionar transfusiones de glóbulos rojos. Las razones de esta creciente dificultad incluyen una disminución constante en el suministro de

65

sangre donada que es elegible para transfusiones debido al aumento en el número de agentes infecciosos que se ha demostrado que se transmiten a través de las transfusiones de sangre, el fracaso de los transportadores de hemoglobina y oxígeno (perfluorocarbonos) para mostrar eficacia como alternativas de los GR en el contexto clínico y las complicaciones recientes asociadas al uso de eritropoyetina (EPO). El acceso rápido a un suministro continuo de progenitores de GR que podrían generar un producto de GR definido para la transfusión alteraría la práctica en la clínica y haría de la transfusión de sangre un procedimiento más seguro y más ampliamente utilizado. Sin embargo, un enfoque de este tipo debe ser capaz de proporcionar un suministro de GR que sea seguro, eficaz y universal.

Aunque se han hecho algunos intentos iniciales para derivar GR *in vitro* a partir de células madre hematopoyéticas primarias (derivadas de médula ósea, sangre de cordón umbilical o sangre periférica) o células madre embrionarias, hasta la fecha no han tenido éxito por una diversidad de razones, incluyendo una o más de entre el gasto, la duración del protocolo, las etapas múltiples, el uso de células alimentadoras o suero, la intensidad del trabajo, el bajo rendimiento o el fracaso en la diferenciación completa a glóbulos rojos maduros y anucleados. Los intentos de generar GR *in vitro* incluyen métodos a partir de células madre hematopoyéticas primarias (Neildez-Nguyen et al., *Nat Biotech* 20, 467-72, 2002) y células madre embrionarias (Lu et al., *Blood*. 1 de diciembre de 2008; 112(12):4475-84; Lu et al., *Regen Med* 3, 693-704, 2008. Estos enfoques tampoco permiten una fuente definida y continua de progenitores de GR.

La mención de los documentos y estudios anteriores no pretende ser una admisión de que ninguno de los anteriores sea una técnica anterior pertinente. Todas las declaraciones en cuanto al contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen admisión alguna en cuanto a la exactitud de los contenidos de estos documentos.

Breve resumen

En consecuencia, existe la necesidad de enfoques mejorados para la producción *in vitro* de glóbulos rojos humanos completamente maduros. De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método de producción para producir una población de glóbulos rojos maduros (GR) a partir de células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés *hematopoietic stem cells*), comprendiendo el método cultivar células madre hematopoyéticas en un medio de cultivo que comprende EPO y una o más primeras proteínas recombinantes que promueven la supervivencia y la proliferación celular en condiciones que inducen la diferenciación de células madre hematopoyéticas a glóbulos rojos, produciendo de este modo una población de glóbulos rojos maduros, en la que la primera proteína recombinante comprende un polipéptido MYC o un fragmento biológicamente activo del mismo. De forma ventajosa, estos métodos producen glóbulos rojos anucleados maduros en aproximadamente 10 días que presentan un fenotipo de glóbulos rojos adultos que incluye, sin limitación, la expresión de Glucoforina A (GPA), niveles aumentados de hemoglobina de adulto, niveles reducidos de CD71 (receptor de transferrina) niveles reducidos de hemoglobina fetal. Por otra parte, la producción de los GR a partir de HSC de largo plazo humanas inmortalizadas de forma condicional con las que puedan hacerse pases indefinidamente *in vitro*, que puedan criopreservarse y recuperarse, permite la producción continua de glóbulos rojos completamente diferenciados a partir de una fuente de definida y bien caracterizada. Adicionalmente, los GR producidos mediante los métodos novedosos de la presente divulgación también pueden contener y/o expresar una o más proteínas recombinantes de interés que pueden usarse para tratar a un sujeto que lo necesite.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una población de glóbulos rojos maduros a partir de células madre hematopoyéticas, comprendiendo el método: cultivar células madre hematopoyéticas en un medio de cultivo que comprende EPO y una o más primeras proteínas recombinantes que promueven la supervivencia y la proliferación celular en condiciones que inducen la diferenciación de células madre hematopoyéticas a glóbulos rojos, produciendo de este modo una población de glóbulos rojos maduros, en la que la primera proteína recombinante comprende un polipéptido MYC o un fragmento biológicamente activo del mismo. En algunas realizaciones, las células madre hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas inmortalizadas de forma condicional. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, las células madre hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas transducidas con proteína y la primera proteína recombinante, o un fragmento biológicamente activo de la misma, es una proteína exógena. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, las células madre hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas transgénicas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la una o más primeras proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, es un polipéptido ICN-1, un homólogo del mismo o un fragmento biológicamente activo del mismo. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el polipéptido MYC es uno o más polipéptidos MYC seleccionados entre n-Myc, c-Myc, 1-Myc, v-Myc y s-Myc. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, una o más de la una o más primeras proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, contienen un dominio de transducción de proteínas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el dominio de transducción de proteínas es uno o más dominios de transducción de proteínas seleccionados entre TAT, VPR y EPTD. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la una o más primeras proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, son TAT-MYC. En algunas realizaciones que pueden combinarse con

cualquiera de las realizaciones anteriores, la una o más primeras proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, se proporcionan en forma de un bolo. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la una o más primeras proteínas recombinantes se proporcionan en forma de un bolo aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente cada 48 horas o aproximadamente cada 72 horas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el método incluye adicionalmente cultivar las células madre hematopoyéticas en presencia de IL-3. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el método incluye adicionalmente cultivar las células madre hematopoyéticas en ausencia de células alimentadoras y suero. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el método incluye adicionalmente cultivar la población de glóbulos rojos maduros en presencia de una o más segundas proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, que inhiben la apoptosis. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la una o más segundas proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, contienen uno o más dominios de homología Bcl-2. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el uno o más dominios de homología Bcl-2 son uno o más dominios de homología Bcl-2 seleccionados entre BH1, BH2, BH3 y BH4. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la una o más segundas proteínas recombinantes son una o más de entre Bcl-2, Bcl-w, Bcl-X, Bcl-XL o Mcl-1. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la una o más segundas proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, son Bcl-2. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, una o más de la una o más segundas proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, contienen un dominio de transducción de proteínas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el dominio de transducción de proteínas es uno o más dominios de transducción de proteínas seleccionados entre TAT, VPR y EPTD. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la una o más segundas proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, son TAT-Bcl-2. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, las células madre hematopoyéticas contienen adicionalmente una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, son una proteína exógena, o un fragmento biológicamente activo de la misma. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, las células madre hematopoyéticas contienen uno o más transgenes que codifican una o más proteínas seleccionadas entre la una o más primeras proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas; la una o más segundas proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas; y una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la expresión o la función de una o más de la una o más primeras proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas; la una o más segundas proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas; o una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas son controlables. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la expresión o la función de una o más de la una o más primeras proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas; la una o más segundas proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas; o una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, son inducibles. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, uno o más de los uno o más transgenes codifican un elemento sensible a antibióticos o un elemento sensible a hormonas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el elemento sensible a antibióticos o el elemento sensible a hormonas es uno o más elementos de respuesta seleccionados entre un elemento de respuesta al estrógeno, un elemento de respuesta a la gonadotropina, o un elemento de respuesta a las tetraciclinas y un elemento de respuesta a los glucocorticoides. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el uno o más transgenes sobreexpresan una o más proteínas seleccionadas entre la una o más primeras proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas; la una o más segundas proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas; y una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la producción de la población de glóbulos rojos maduros se acelera en al menos un 45 % en comparación con la producción de una población de glóbulos rojos a partir de una célula madre primaria cultivada en presencia de IL-3 y EPO durante ocho días, después, en presencia de células alimentadoras y EPO durante tres días y, finalmente, en presencia de células alimentadoras solas durante 10 días. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos maduros se produce en 7 a 14 días. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos maduros presenta una o más características seleccionadas entre una población de glóbulos rojos maduros, donde del 40 % al 100 % de las células están anucleadas; una población de glóbulos rojos maduros, donde del 40 % al 100 % de las células expresan GPA; una población de glóbulos rojos maduros, donde del 40 % al 100 % de las células expresan hemoglobina de adulto; una población de glóbulos rojos maduros, donde del 40 % al 100 % de las células presentan niveles reducidos de expresión de CD71; una población de glóbulos rojos maduros, donde del 40 % al 100 % de las células presentan niveles reducidos de expresión de hemoglobina fetal. En algunas realizaciones que pueden

combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, las células madre hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas humanas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, las células madre hematopoyéticas se aislaron de un paciente con un tipo sanguíneo raro. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el paciente tiene una afección autoinmunitaria. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, las células madre hematopoyéticas se produjeron a partir de células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos maduros es una población de células humanas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos maduros tiene uno o más tipos sanguíneos seleccionados entre A+, A-, B+, B-, AB+, AB-, O+ y O-. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos maduros es un tipo sanguíneo raro. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos maduros es una población de células animales no humanas.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a una población de glóbulos rojos maduros diferenciados *in vitro*, que contiene glóbulos rojos anucleados que expresan GPA, que expresan hemoglobina de adulto, que presentan niveles reducidos de expresión de CD71 y que presentan niveles reducidos de expresión de hemoglobina fetal, donde: de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población están anucleados; de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población expresan GPA; de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población expresan hemoglobina de adulto; de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan niveles reducidos de expresión de CD71; y de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan niveles reducidos de expresión de hemoglobina fetal. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, los glóbulos rojos contienen una o más proteínas recombinantes de interés. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, los glóbulos rojos tienen un tipo sanguíneo raro. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, los glóbulos rojos son glóbulos rojos humanos. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, los glóbulos rojos son glóbulos rojos de animales no humanos. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos maduros diferenciados *in vitro* se produce mediante cualquier método de producción de una población de glóbulos rojos maduros a partir de células madre hematopoyéticas de cualquiera de las realizaciones anteriores.

Otros aspectos de la presente divulgación se relacionan con una composición farmacéutica que contiene: una población de glóbulos rojos maduros diferenciados *in vitro*, donde de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población están anucleados, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población expresan GPA, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población expresan hemoglobina de adulto, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan niveles reducidos de expresión de CD71 y de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan niveles reducidos de expresión de hemoglobina fetal; y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, donde la composición contiene adicionalmente una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos contiene una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, es una proteína exógena. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, los glóbulos rojos tienen un tipo sanguíneo raro. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, los glóbulos rojos son glóbulos rojos humanos. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, los glóbulos rojos son glóbulos rojos de animales no humanos. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos maduros diferenciados *in vitro* se produce mediante cualquier método de producción de una población de glóbulos rojos maduros a partir de células madre hematopoyéticas de cualquiera de las realizaciones anteriores.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método de tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o un trastorno caracterizados por una deficiencia de glóbulos rojos anucleados: proporcionando a un sujeto que lo necesite una población de glóbulos rojos maduros diferenciados *in vitro*, donde de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población están anucleados, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población expresan GPA, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población expresan hemoglobina de adulto, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan niveles reducidos de expresión de CD71 y de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan niveles reducidos de expresión de hemoglobina fetal. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto es un ser humano. En algunas

realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto es un animal no humano. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos contiene una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, es una proteína exógena. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos maduros diferenciados *in vitro* se produce mediante cualquier método de producción de una población de glóbulos rojos maduros a partir de células madre hematopoyéticas de cualquiera de las realizaciones anteriores.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método para prolongar la semivida de una población de glóbulos rojos maduros *in vitro*: manteniendo la población de glóbulos rojos en un medio que contiene uno o más polipéptidos exógenos, homólogos de los mismos o fragmentos biológicamente activos de los mismos, que inhiben la apoptosis. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el uno o más polipéptidos exógenos, homólogos de los mismos o fragmentos biológicamente activos de los mismos, contienen uno o más dominios de homología Bcl2. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el uno o más dominios de homología Bcl-2 son uno o más dominios de homología Bcl-2 seleccionados entre BH1, BH2, BH3 y BH4. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el uno o más polipéptidos exógenos, homólogos de los mismos o fragmentos biológicamente activos de los mismos, son uno o más de Bcl-2, Bcl-w, Bcl-X, Bcl-XL o Mcl-1. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el uno o más polipéptidos exógenos, homólogos de los mismos o fragmentos biológicamente activos de los mismos, son Bcl-2. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, uno o más del uno o más polipéptidos exógenos, homólogos de los mismos o fragmentos biológicamente activos de los mismos, contienen un dominio de transducción de proteínas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el dominio de transducción de proteínas es uno o más dominios de transducción de proteínas seleccionados entre TAT, VPR y EPTD. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el uno o más polipéptidos exógenos, homólogos de los mismos o fragmentos biológicamente activos de los mismos, son TAT-Bcl-2. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la población de glóbulos rojos maduros se produce mediante cualquier método de producción de una población de glóbulos rojos maduros a partir de células madre hematopoyéticas de cualquiera de las realizaciones anteriores.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** representa un enfoque general para la generación de estirpes de células cttlt-HSC. La **Figura 1A** representa una representación esquemática de construcciones retrovíricas utilizadas para transducir células HSC murinas primarias con MYC-ER y Bcl-2. La **Figura 1B** representa análisis de citometría de flujo de HSC obtenidas de donantes tratados con 5-fluorouracilo después de la transducción con pMIG-MYC-ER y pMIG-Bcl-2. La **Figura 1C** representa la cinética de la leucemogénesis en ratones trasplantados con las HSC transducidas que se muestran en la Figura 1B. La **Figura 1D** representa un análisis por FACS de una cttlt-HSC poco después de la recuperación a partir de la médula ósea de ratones leucémicos. La **Figura 1E** representa el análisis por FACS de una estirpe celular cttlt-HSC que se ha establecido. La **Figura 1F** representa el análisis por FACS de marcadores de células madre en Lt-HSC normales, sin manipular, de la médula ósea de ratones C57/BL6 de tipo silvestre.

La **Figura 2** representa la caracterización de células inmunitarias maduras que surgen después del trasplante de cttlt-HSC. La **Figura 2A** representa la frecuencia de células derivadas de cttlt-HSC en tejidos linfoides después del trasplante. La **Figura 2B** representa la detección de células de linaje mieloide GFP+ en la médula ósea. La **Figura 2C** representa el análisis de linfocitos periféricos maduros en el bazo. La **Figura 2D** representa el análisis de linfocitos periféricos maduros en ratones receptores de trasplantes después del segundo pase en serie de cttlt-HSC.

La **Figura 3** representa el fenotipo de superficie de tres estirpes de células cttlt-HSC humanas. La **Figura 3A**, la **Figura 3B** y la **Figura 3C** muestran la fracción de CD34+ de HSC transducidas (es decir, GFP+) a partir de tres estirpes de células cttlt-HSC humanas establecidas. La **Figura 3D**, la **Figura 3E** y la **Figura 3F** muestran la fracción de c-kit+ de HSC transducidas (es decir, GFP+) a partir de tres estirpes de células cttlt-HSC humanas establecidas. La **Figura 3G** representa que las HSC transducidas (es decir, GFP+) a partir de las estirpes de células cttlt-HSC humanas establecidas no expresan CD45. La **Figura 3H** representa que las HSC transducidas (es decir, GFP+) a partir de las estirpes de células cttlt-HSC humanas establecidas no expresan Flk-2. La **Figura 3I** representa que las HSC transducidas (es decir, GFP+) a partir de las estirpes de células cttlt-HSC humanas establecidas no expresan CD 150.

La **Figura 4** representa la diferenciación de estirpes de células cttlt-HSC humanas a células linfoides maduras en ratones NOD/SCID/ $\beta 2M^{-/-}$. La **Figura 4A** representa datos obtenidos de un ratón de control (sin trasplante). La **Figura 4B**, la **Figura 4C** y la **Figura 4D** muestran datos obtenidos de un ratón receptor de trasplante que

presentó células linfoides humanas maduras en la sangre periférica.

La **Figura 5** representa glóbulos rojos humanos generados *in vitro* usando cttlt-HSC humanas como fuente. La **Figura 5A** representa la tinción con H y E de sangre periférica de ratón. La **Figura 5B** representa la tinción con H y E de sangre primaria humana de cordón umbilical fetal. La **Figura 5C**, la **Figura 5D** y la **Figura 5E** muestran la tinción con H y E de tres estirpes celulares de sangre de cordón umbilical fetal transformadas de forma condicional que se trataron durante 12 días con IL-3 y EPO. La **Figura 5F** muestra una vista ampliada de las células de la **Figura 5E** para mostrar la morfología de los glóbulos rojos.

La **Figura 6** representa que los GR humanos generados *in vitro* pueden rescatar a los ratones de la anemia letal inducida químicamente.

La **Figura 7** representa que los glóbulos rojos humanos generados *in vitro* pueden rescatar a ratones del choque hemorrágico.

La **Figura 8** representa la expresión y purificación de las proteínas TAT-MYC y TAT-Bcl-2 recombinantes para la transducción directa de proteína en células. La **Figura 8A** representa TAT-MYC. La **Figura 8B** representa TAT-Bcl-2.

La **Figura 9** representa un análisis por FACS que muestra el desarrollo de estirpes de células HSC (pltlt-HSC) de largo plazo transducidas con proteína murinas. La **Figura 9A** representa células sin teñir. La **Figura 9B** representa la tinción con anticuerpos contra Scal y c-Kit. La **Figura 9C** representa la tinción con anticuerpos contra B220 y CD3. La **Figura 9D** representa el fenotipo de superficie de la estirpe pltlt-HSC resultante.

La **Figura 10** representa un análisis por FACS que muestra la reconstitución del compartimento linfóide en ratones Rag-1^{-/-} mediante una estirpe celular pltlt-HSC murina. La **Figura 10A** representa células sin teñir. La **Figura 10B** representa la tinción para los marcadores de células B B220 e IgM. La **Figura 10C** representa la tinción para los marcadores de linfocitos T CD4 y TCRβ. La **Figura 10D** representa la tinción para los marcadores de linfocitos T CD8 y TCRβ.

La **Figura 11** representa el desarrollo de glóbulos rojos murinos maduros a partir de pltlt-HSC *in vitro*. La **Figura 11A** representa la tinción con H y E de pltlt-HSC murinas no diferenciadas con un objetivo de 40x. La **Figura 11B** representa la tinción con H y E de glóbulos rojos derivados de pltlt-HSC murinas con un objetivo de 40x. La **Figura 11C** representa la tinción con H y E de glóbulos rojos derivados de pltlt-HSC murinas con un objetivo de 100x.

La **Figura 12** representa la expansión de HSC derivada de sangre de cordón umbilical *in vitro*. La **Figura 12A** representa la tinción con anticuerpos contra CD38 y CD34 después de cultivar las HSC durante 3 días en un medio que contenía TAT-MYC y TAT-Bcl-2. La **Figura 12B** representa la tinción con anticuerpos contra CD38 y CD34 después de cultivar las HSC durante 14 días en un medio que contenía TAT-MYC y TAT-Bcl-2.

La **Figura 13** representa la inducción de diferenciación de glóbulos rojos *in vitro*. La **Figura 13A** representa células HSC sin teñir de la **Figura 12** después de 4 días de cultivo en un medio que contenía IL-3 y EPO. La **Figura 13B** representa la tinción con anticuerpos contra GPA y CD71 después de cultivar las células HSC de la **Figura 12** durante 4 días en medio neutro. La **Figura 13C** representa la tinción con anticuerpos contra GPA y CD71 después de cultivar las células HSC de la **Figura 12** durante 4 días en un medio que contenía IL-3 y EPO.

La **Figura 14** representa un análisis dinámico de marcadores de diferenciación de glóbulos rojos *in vitro*. La **Figura 14A** representa la tinción con anticuerpos contra GPA, CD71 y hemoglobina fetal de GR humanos maduros (+ Control). La **Figura 14B** representa la tinción con anticuerpos contra GPA, CD71 y hemoglobina fetal después de 5 días de cultivo de las células HSC de la **Figura 12** en medio que contenía IL-3 y EPO. La **Figura 14C** representa la tinción con anticuerpos contra GPA, CD71 y hemoglobina fetal después de 9 días de cultivo de las células HSC de la **Figura 12** en medio que contenía IL-3 y EPO.

La **Figura 15** representa un análisis histológico de una enucleación en cultivo. La **Figura 15A** representa la tinción con H y E de células de la **Figura 12** después de 3 días de cultivo en medio que contenía IL-3 y EPO. La **Figura 15B** representa la tinción con H y E de células de la **Figura 12** después de 7 días de cultivo en medio que contenía IL-3 y EPO.

La **Figura 16** representa la producción de glóbulos rojos en una bolsa permeable a gases. La **Figura 16A** representa glóbulos rojos diferenciados a partir de pltlt-HSC inmortalizadas de forma condicional después de cultivar en medio que contenía IL-3 y EPO durante 4 días. La **Figura 16B** representa la tinción con H y E de glóbulos rojos, que muestra la maduración y la enucleación de los glóbulos rojos.

La **Figura 17** representa la producción de glóbulos rojos en ratones a partir de células de la médula ósea. La **Figura 17A** representa la tinción con H y E de células madre hematopoyéticas de ratón sin tratar (control) de

médula ósea. La **Figura 17B** representa la tinción con H y E de células madre hematopoyéticas de ratón de médula ósea tratada con IL3 y EPO, pero no con Tat-Myc o Tat-Bcl-2. La **Figura 17C** representa la tinción con H y E de células madre hematopoyéticas de ratón de médula ósea tratada con IL3, EPO y Tat-Myc, pero no con Tat-Bcl-2. La **Figura 17D** representa la tinción con H y E de células madre hematopoyéticas de ratón de médula ósea tratada con IL3, EPO y Tat-Bcl-2, pero no con Tat-Myc. La **Figura 17E** representa la tinción con H y E de células madre hematopoyéticas de ratón de médula ósea tratada con IL3, EPO, Tat-Bcl-2 y Tat-Myc.

La **Figura 18** representa la generación y caracterización *in vitro* de proteínas de fusión Tat. La **Figura 18A** representa una representación gráfica de las proteínas de fusión Tat-Myc y Tat-Bcl-2 que incluye la ubicación del dominio de transducción de proteínas en fase de lectura de Tat del VIH-1 y los marcadores V5 y 6xHis. La **Figura 18B** representa proteínas recombinantes después de la purificación de *E. coli*, la separación por SDS-PAGE y la tinción con Coomassie. La **Figura 18C** representa un césped de células 3T3 confluentes expuestas a Tat-Myc recombinante purificado, Tat-Bcl-2 o se deja sin tratar (NT) durante dos horas y después se fija y se tiñe con un anticuerpo monoclonal contra V5 y con una tinción nuclear Hoechst 9934. La proteína Tat-Myc se localizó en gran medida en la región nuclear en este periodo de tiempo, mientras que la Tat-Bcl-2 permaneció en el espacio citoplásmico y perinuclear. La **Figura 18D** representa un análisis por SDS-PAGE y transferencia western (anticuerpos monoclonales contra V5 y β -actina) de HSC derivadas de sangre de cordón umbilical humano pulsadas con una única exposición de Tat-Myc durante 1 hora, lavadas y después lisadas (en los puntos temporales indicados) para separar la membrana plasmática y la fracción citoplásmica de la fracción nuclear. La **Figura 18E** representa un análisis por SDS-PAGE y transferencia western (anticuerpos monoclonales contra V5 y β -actina) de la fracción nuclear de HSC derivadas de sangre de cordón umbilical humano pulsadas con una única exposición de Tat-Myc durante 2 horas, lavadas y después lisadas (en los puntos temporales indicados) para separar la membrana plasmática y la fracción citoplásmica de la fracción nuclear. La mayor parte de la proteína se pierde entre 24 y 48 horas. No queda proteína detectable en ningún punto temporal después de 72 horas.

La **Figura 19** representa una representación gráfica de la expansión de HSC derivadas de células de sangre de cordón umbilical humano con Tat-Myc y Tat-Bcl-2. La **Figura 19A** representa una representación gráfica de un análisis por FACS del fenotipo de superficie de las células de sangre de cordón umbilical humano expandidas *in vitro* durante 14 días (solo el cóctel de citocinas de los paneles superiores; cóctel de citocinas de los paneles inferiores complementado con Tat-Myc y Tat-Bcl-2). La **Figura 19B** representa una representación gráfica de la cinética de la expansión de células CD34+ *in vitro* con ambos conjuntos de condiciones. La **Figura 19C** representa las imágenes de tres tipos de colonias diferentes desarrolladas en ensayos de metilcelulosa en condiciones que soportan la diferenciación mieloeritroide, derivadas de pttt-HSC humanas. La **Figura 19D** representa una representación gráfica de la cuantificación de cada tipo de colonia que se observó en cultivos de metilcelulosa sembrados con 10^3 células de sangre de cordón umbilical cultivadas con un cóctel de citocinas (barras de color negro), 10^3 células de sangre de cordón umbilical cultivadas con un cóctel de citocinas complementado con Tat-Myc y Tat-Bcl-2 (barras de color gris oscuro) o 10^4 células de cordón umbilical recién preparadas sin manipular (barras de color gris claro). La **Figura 19E** representa una representación gráfica de la cuantificación del número de colonias observadas en cultivos de metilcelulosa tras volver a cultivar en placa las células que se muestran en la Figura 19D.

La **Figura 20** representa una representación gráfica del análisis funcional de (pttt)-HSC de largo plazo transducidas con proteína derivada de sangre de cordón umbilical humano *in vivo*. La **Figura 20A** representa una representación gráfica de un análisis por FACS de la médula ósea de cohortes de ratones NSG irradiados de forma subletal a los que se les proporcionaron trasplantes de 10^6 células de sangre de cordón umbilical expandidas *in vitro* en un cóctel de citocinas (primer panel; SCUF) o expandidas en un cóctel de citocinas complementado con Tat-Myc y Tat-Bcl-2 (segundo panel; TMTB de SCUF) o 5×10^6 células de cordón umbilical sin manipular recién preparadas (tercer panel; SCUF recién preparada). La **Figura 20B** representa una representación gráfica de un análisis por FACS de células de médula ósea, bazo y timo de los ratones xenoquímicos. Todas las células se tiñeron para CD45 humano. La estimulación con células CD45+ mostró células CD34+ CD38^{lo} humanas en la médula ósea (primer panel; MO); CD19+ humanas y linfocitos CD3+ humanos en el bazo (segundo panel; bazo); y células CD3+ humanas en el timo (tercer panel; timo). La **Figura 20C** representa una representación gráfica de un análisis por FACS de células B esplénicas humanas marcadas con CFSE y cultivadas en presencia de anticuerpos monoclonales contra CD40 e IgM humanos. Las células B humanas que se desarrollaron en ratones xenoquímicos NSG experimentaron una proliferación tras la estimulación de su receptor de antígeno. La **Figura 20D** representa una representación gráfica de la cuantificación de colonias mieloeritroides a partir de células CD34+CD38^{lo} humanas obtenidas a partir de la médula ósea de ratones xenoquímicos NSG y cultivadas en placa sobre metilcelulosa. La **Figura 20E** representa una representación gráfica de la cuantificación del desarrollo de colonias mieloeritroides después de volver a cultivar en placa. La **Figura 20F** representa una representación gráfica de la cuantificación de la diferenciación de células mieloides y linfoides (expresión de CD1 lb, CD33, CD3 y CD19) en la población de CD45 positiva de células de médula ósea expandidas *in vitro* en un cóctel de citocinas (círculos abiertos) o un cóctel de citocinas complementadas con Tat-Myc y Tat-Bcl-2 (cuadrados de color negro). La **Figura 20G** representa una representación gráfica de la cuantificación de la diferenciación de células mieloides y linfoides (expresión de CD1 lb, CD33, CD3 y CD19) en la población CD45 positiva de células de bazo expandidas *in vitro*.

en un cóctel de citocinas (círculos abiertos) o un cóctel de citocinas complementadas con Tat-Myc y Tat-Bcl-2 (cuadrados de color negro).

La **Figura 21** representa una representación gráfica de la expansión de HSC movilizadas con G-CSF humanas de adulto *in vitro* con Tat-Myc y Tat-Bcl-2. La **Figura 21A** representa una representación gráfica del fenotipo de superficie de células CD45+ humanas que muestra un enriquecimiento de la fracción de CD34+ y CD38+ humanas. La **Figura 21B** representa una representación gráfica de la cinética de la expansión celular *in vitro* durante 18 días en cultivo en presencia de Tat-Myc y Tat-Bcl-2. La **Figura 21C** representa una representación gráfica que muestra que 5×10^3 HSC G-CSF humanas de adulto, expandidas *in vitro* con Tat-Myc y Tat-Bcl-2, dieron lugar a 4 tipos de colonias morfológicamente distintas en metilcelulosa. La **Figura 21D** representa una representación gráfica de un análisis por FACS que muestra que HSC G-CSF de adulto humanas expandidas *in vitro* con Tat-Myc y Tat-Bcl-2 dieron origen a linajes hematopoyéticos humanos en ratones NSG xenoquímicos. La médula ósea procedía de ratones NSG trasplantados con pttf-HSC expandidas con un cóctel de citocinas complementado con Tat-Myc y Tat-Bcl-2 (primer panel; G-CSF +TMTB) o con células de sangre de cordón umbilical sin manipular recién preparadas (segundo panel; SCUF recién preparada). La **Figura 21E** representa una representación gráfica de un análisis por FACS de células de médula ósea, bazo y timo. Las células de la médula ósea incluían células CD45 humanas que también eran CD34+ y CD38+ humanas (primer panel), las células del bazo incluían células CD45 humanas que también se tiñeron para CD3 humano (segundo panel) y las células del timo incluían células CD45 humanas así como CD3 (tercer panel). La **Figura 21F** y la **Figura 21G** representan una representación gráfica de una cohorte de ratones xenoquímicos injertados con 10^6 células movilizadas con G-CSF expandidas *in vitro* en un cóctel de citocinas complementado con Tat-Myc y Tat-Bcl-2 (cuadrados de color negro) que se evaluaron para determinar la diferenciación de células linfoides. La población CD45 positiva de células de médula ósea (Fig. 21F) y células de bazo (Fig. 21G) se analizó para determinar la expresión de CD11b, CD33, CD3 y CD19.

La **Figura 22** representa la actividad de diversas construcciones de proteínas de fusión Myc en un ensayo de viabilidad de linfocitos T activados. La **Figura 22A** representa una alineación esquemática de algunas construcciones de proteínas de fusión Myc representativas. La **Figura 22B** representa una representación gráfica del porcentaje de linfocitos T vivos 48 horas después del tratamiento con construcciones de proteínas de fusión Myc representativas.

La **Figura 23** representa la actividad de diversas proteínas de fusión Tat (cada una a 50 ug/ml) en un ensayo de viabilidad de linfocitos T activados. La **Figura 23A** representa una representación gráfica de la estimulación en vivo del análisis por FACS (dispersión del lado X hacia adelante) para células sin tratar (sin tratamiento). La **Figura 23B** representa una representación gráfica de la estimulación en vivo del análisis por FACS (dispersión del lado X hacia adelante) para células tratadas con Tat-Cre (Control de Tat-Cre). La **Figura 23C** representa una representación gráfica de la estimulación en vivo del análisis por FACS (dispersión del lado X hacia adelante) para células tratadas con Tat-Bcl-2 (Tat-Bcl-2). La **Figura 23D** representa una representación gráfica de la estimulación en vivo del análisis por FACS (dispersión del lado X hacia adelante) para células tratadas con Tat-Myc (Tat-Myc).

La **Figura 24** representa las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y ácido nucleico (SEQ ID NO: 2) para algunas realizaciones del polipéptido Tat-Myc.

La **Figura 25** representa las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) y ácido nucleico (SEQ ID NO: 4) para algunas realizaciones del polipéptido del dominio Bcl-2.

La **Figura 26** representa HSC primarias que también se diferencian en glóbulos rojos maduros usando medios de diferenciación incluyendo Tat-Myc. La **Figura 26A** representa que en los días 6 y 11, las células se evaluaron para determinar marcadores de superficie eritroides GPXCD71; y en el día 11, las células también se evaluaron para determinar la expresión de hemoglobina fetal y de adultos mediante citometría de flujo. La **Figura 26B** representa que el día 10, una muestra del cultivo de diferenciación se sometió a citocentrifugado sobre un cubreobjetos para la tinción con H y E. Las imágenes son de 10 y 20 aumentos.

Descripción detallada

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método de producción de una población de glóbulos rojos maduros a partir de células madre hematopoyéticas (HSC), comprendiendo el método el cultivo de HSC en un medio de cultivo que comprende eritropoyetina (EPO) y uno o más proteínas recombinantes que promueve la supervivencia y proliferación celular en condiciones que inducen la diferenciación de las células madre hematopoyéticas a glóbulos rojos maduros, produciendo de este modo una población de glóbulos rojos maduros, en la que la primera proteína recombinante comprende un polipéptido MYC o un fragmento biológicamente activo del mismo. El proceso de diferenciación que se describe en el presente documento no requiere células alimentadoras (por ejemplo, fibroblastos) y/o suero y da como resultado la producción de glóbulos rojos anucleados maduros en aproximadamente 7 a 14 días.

Los métodos de producción de glóbulos rojos maduros que se describen en el presente documento pueden usarse con HSC de cualquier fuente, incluyendo, pero sin limitación, médula ósea, sangre periférica, sangre periférica movilizada, sangre de cordón umbilical y placenta, así como HSC producidas a partir de células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas. Las HSC aisladas de cualquier fuente pueden usarse para producir, sin limitación, glóbulos rojos de donante universal, glóbulos rojos de un tipo sanguíneo raro, glóbulos rojos para medicina personalizada (por ejemplo, transfusión autóloga, opcionalmente con carga útil o ingeniería genética) y glóbulos rojos modificados por ingeniería genética para incluir una o más proteínas de interés.

La producción de glóbulos rojos maduros a partir de HSC *in vitro*, usando los métodos de la presente invención, puede potenciarse mediante el uso de HSC inmortalizadas de forma condicional. La potenciación puede incluir, pero sin limitación, uno o más de un mayor número de glóbulos rojos maduros por HSC de partida, la mejora de una o más características de la población de glóbulos rojos maduros o un número reducido de días para generar glóbulos rojos maduros. Pueden producirse HSC inmortalizadas de forma condicional mediante la exposición de las HSC a una primera proteína que promueve la proliferación y/o supervivencia celular y una segunda proteína que inhibe la apoptosis, usando uno o más de cualquier enfoque transgénico y/o enfoque de transducción de proteínas conocido en la técnica.

La presente divulgación también se refiere, entre otras cosas, a poblaciones de glóbulos rojos maduros producidas mediante uno o más de los métodos de la presente divulgación. Las poblaciones de glóbulos rojos maduros pueden caracterizarse por una o más características, incluyendo, pero sin limitación, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 99 % o el 100 % de las células de la población son células anucleadas, que expresan niveles aumentados de GPA, niveles aumentados de hemoglobina de adulto (segunda década o más por FACS), niveles reducidos de expresión de CD71 (por ejemplo, GPA+/CD71-) y niveles reducidos de hemoglobina fetal (primera década; 0-10 por FACS). Las poblaciones de glóbulos rojos maduros también pueden incluir una o más proteínas recombinantes de interés. Estas proteínas de interés pueden ser útiles en la prevención, el tratamiento o el diagnóstico de una o más enfermedades o trastornos.

La presente divulgación también se refiere, entre otras cosas, a composiciones farmacéuticas que incluyen poblaciones de glóbulos rojos maduros producidos mediante uno o más de los métodos que se describen en el presente documento. Estas composiciones farmacéuticas también pueden incluir una o más proteínas exógenas de interés útiles en la prevención, el tratamiento o el diagnóstico de una o más enfermedades o trastornos.

La presente divulgación también se refiere, entre otras cosas, a métodos de tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o un trastorno caracterizados por una deficiencia de glóbulos rojos proporcionando a un sujeto que lo necesite una población de glóbulos rojos maduros de la presente divulgación. La presente divulgación también se refiere, entre otras cosas, a métodos de tratamiento o de prevención de una enfermedad o un trastorno mediante la administración de una o más poblaciones de glóbulos rojos o una composición farmacéutica de la presente divulgación que incluye una o más proteínas de interés a un sujeto, donde la una o más proteínas de interés son útiles en el tratamiento o la prevención de la enfermedad o trastorno.

La presente divulgación también se refiere, entre otras cosas, a métodos para prolongar la vida o la semivida de los glóbulos rojos o la población de glóbulos rojos *in vitro*. La prolongación de la semivida de los glóbulos rojos *in vitro* aumenta la capacidad de los bancos de sangre para almacenar y suministrar sangre a los pacientes (por ejemplo, civiles y fuerzas armadas) que lo necesiten. Como se describe en el presente documento, el mantenimiento de glóbulos rojos en medios que contienen uno o más polipéptidos exógenos que inhiben la apoptosis aumenta la semivida de la población de glóbulos rojos *in vitro*.

Proteínas de la presente divulgación

La invención se refiere a un método para producir una población de glóbulos rojos maduros a partir de células madre hematopoyéticas (HSC). La divulgación también se refiere al mantenimiento de una población de glóbulos rojos, mediante el cultivo de HSC y/o glóbulos rojos en presencia de medios que contienen una o más proteínas recombinantes (tales como proteínas exógenas) o fragmentos biológicamente activos de las mismas, que promueven la supervivencia y/o la proliferación celular y/o inhiben la apoptosis. Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a HSC y/o glóbulos rojos de la presente divulgación que contienen, incluyen y/o expresan una o más proteínas de interés.

Como se usa en el presente documento, una proteína que "promueve la supervivencia y/o la proliferación de las células" se refiere a una proteína cuya actividad biológica, directa o indirectamente, activa, induce, potencia, estimula, permite o aumenta la supervivencia celular y/o la proliferación celular. Como se usa en el presente documento, un "fragmento biológicamente activo" de una proteína de la presente divulgación, tal como una proteína que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular o una proteína que inhibe la apoptosis, es un fragmento de una proteína de longitud completa de la presente divulgación que conserva al menos una actividad y/o función de la

proteína de longitud completa.

Como se usan en el presente documento, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos de origen natural así como a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son aminoácidos de origen no natural, por ejemplo, un análogo de aminoácidos. Como se usan en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, donde los restos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

10 Proteínas recombinantes que promueven la supervivencia celular y/o la proliferación celular

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una población de glóbulos rojos maduros a partir de células madre hematopoyéticas (HSC), comprendiendo el método el cultivo de HSC en un medio de cultivo que comprende EPO y una o más proteínas recombinantes que promueven la supervivencia y la proliferación celular en condiciones que inducen la diferenciación de las células madre hematopoyéticas a glóbulos rojos maduros, produciendo de este modo una población de glóbulos rojos maduros, en el que la primera proteína recombinante comprende un polipéptido MYC o un fragmento activo biológico del mismo.

Puede usarse adicionalmente cualquier proteína adecuada conocida en la técnica que promueva la supervivencia y/o la proliferación celular. En algunas realizaciones, la una o más proteínas recombinantes que promueven la supervivencia y/o la proliferación celular es un oncopéptido (por ejemplo, un polipéptido codificado por un protooncogén y/u oncogén). Los oncopéptidos adecuados pueden ser de cualquier clase adecuada que induzca la inmortalidad celular. Los ejemplos de oncopéptidos adecuados que promueven la supervivencia y/o la proliferación celular incluyen, sin limitación, factores de crecimiento y/o mitógenos (por ejemplo, factores de crecimiento derivados de PDGF tales como c-Sis); tirosina cinasas receptoras, en particular tirosina cinasas receptoras activas constitutivamente (por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento derivado de trombocitos (PDGFR), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y HER2/neu); tirosina cinasas citoplásmicas (por ejemplo, familia Src, familia Syk-ZAP-70 y familia BTK de tirosina cinasas); serina/treonina cinasas citoplásmicas y sus subunidades reguladoras (por ejemplo, cinasas Raf, cinasas dependientes de ciclina, miembros de la familia Akt); GTPasas reguladoras (por ejemplo, proteína Ras); factores de transcripción (por ejemplo, HIF-1a); transcriptasas inversas de la telomerasa (por ejemplo, *TERT* o hTERT); y/o factores que activan otros oncopéptidos (por ejemplo, ciclinas, incluyendo las ciclinas A, B, D y/o E, tales como la ciclina D1 y D3).

En determinadas realizaciones, un elemento adicional que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular es, a modo de ejemplo no limitante, mTOR, ciclina D1, ciclina D3, STAT3, STAT5, AML-ETO, AKT, ICN-1, hTERT, PDK-1, MLL-ENL, cadena β del receptor de IL3, β catenina, familia Hedgehog (Shh, Ihh, Dhh), Bmi-1, c-Jun, Wnt, Bcl-2, Bcl-6, Bcl-10, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB-1, HER1), ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3/HER3, ErbB-4/HER4, familia de ligandos EGFR; familia del receptor del factor de crecimiento similar a insulina (IGFR), proteínas de unión a IGF (IGFBP), familia de ligandos de IGFR; familia del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), familia de ligandos del PDGFR; familia del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), familia de ligandos de FGFR, familia del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), familia de VEGF; familia del receptor de HGF; familia del receptor de TRK; familia del receptor de efrina (EPH); familia del receptor de AXL; familia del receptor de leucocito tirosina cinasa (LTK); familia del receptor de TIE, angiopoyetina 1,2; familia de receptores del receptor huérfano similar a tirosina cinasa receptora (ROR); familia del receptor del dominio discoidina (DDR); familia del receptor de RET; familia del receptor de KLG; familia del receptor de RYK; familia del receptor de MuSK; factor de crecimiento transformante β , receptores de (TGF- β), TGF- β ; receptores de citocinas, receptores de clase I (familia de hematopoyetina) y de clase II (familia de interferón/IL-10), superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (TNFRSF), familia del receptor de muerte; antígenos de cáncer de testículo (CT), antígenos específicos de linaje, antígenos de diferenciación, α -actinina-4, ARTC1, productos de fusión de la región de la agrupación del punto de ruptura-Abelson (Bcr-abl), B-RAF, caspasa-5 (CASP-5), caspasa-8 (CASP-8), β -catenina (CTNNB1), ciclo de división celular 27 (CDC27), cinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4), CDKN2A, COA-1, proteína de fusión dek-can, EFTUD-2, factor de elongación 2 (ELF2), proteína de fusión de gen de variante Ets 6/gen de leucemia mieloide aguda 1 ETS (ETC6-AML1), fibronectina (FN), GPNMB, receptor de lípidos de baja densidad/GDP-L fucosa: proteína de fusión de β -Dgalactosa 2- α -L-fucosiltransferasa (LDLR/FUT), intercambio de arginina a isoleucina HLA-A2 en el resto 170 de la hélice α del dominio $\alpha 2$ en el gen HLA-A2 (HLA-A*201-R170I), HLA-A11, proteína de choque térmico 70-2 mutada (HSP70-2M), KIAA0205, MART2, melanoma ubicuo mutado 1, 2, 3 (MUM-1, 2, 3), fosfatasa ácida prostática (PAP), neo-PAP, miosina de clase I, NFYC, OGT, OS-9, proteína de fusión pml-RAR α , PRDX5, PTPRK, K-ras (KRAS2), N-ras (NRAS), HRAS, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, proteína de fusión de SYT-SSX1 o -SSX2, triosafosfato isomerasa, BAGE, BAGE-1, BAGE-2, 3, 4, 5, GAGE-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, GnT-V (N-acetil glucosaminil transferasa aberrante V, MGAT5), HERV-K-MEL, KK-LC, KM-HN-1, LAGE, LAGE-1, antígeno reconocido por CTL en el melanoma (CAMEL), MAGE-A1 (MAGE-1), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-3, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, mucina 1 (MUC1), MART-1/Melan-A (MLANA), gp100, gp100/Pmel17 (SILV), tirosinasa (TYR), TRP-1, HAGE, NA-88, NY-ESO-1, NY-ESO-1/AGE-2, SAGE, Sp17, SSX-1,2,3,4, TRP2-INT2, antígeno carcinoembrionario (CEA), calicreína 4, mamaglobina-A, OA1, antígeno

prostático específico (PSA), TRP-1/gp75, TRP-2, adipofilina, proteína inducible por interferón ausente en el melanoma 2 (AIM-2), BING-4, CPSF, ciclina D1, molécula de adhesión de células epiteliales (Ep-CAM), EphA3, factor de crecimiento de fibroblastos-5 (FGF-5), glucoproteína 250 (gp250), EGFR (ERBB1), HER-2/neu (ERBB2), cadena $\alpha 2$ del receptor de interleucina 13 (IL1 3R α 2), receptor de IL-6, carboxil esterasa intestinal (iCE), α -feto proteína (AFP), M-CSF, mdm-2, MUC1, p53 (TP53), PBF, PRAME, PSMA, RAGE-1, RNF43, RU2AS, SOX10, STEAP1, survivina (BIRC5), transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT), telomerasa, gen de tumor de Wilms (WT1), SYCP1, BRDT, SPANX, XAGE, ADAM2, PAGE-5, LIP1, CTAGE-1, CSAGE, MMA1, CAGE, BORIS, HOM-TES-85, AF15q14, HCA661, LDHC, MORC, SGY-1, SPO11, TPX1, NY-SAR-35, FTHL17, NXF2, TDRD1, TEX15, FATE, TPTE, idiotipos de inmunoglobulina, proteína de Bence-Jones, receptores de estrógeno (ER), receptores de andrógeno (AR), CD40, CD30, CD20, CD19, CD33, antígeno de cáncer 72-4 (CA 72-4), antígeno de cáncer 15-3 (CA 15-3), antígeno de cáncer 27-29 (CA 27-29), antígeno de cáncer 125 (CA 125), antígeno de cáncer 19-9 (CA 19-9), gonadotropina coriónica humana β , antígeno de carcinoma de células escamosas, enolasa específica de neuronas, proteína de choque térmico gp96, GM2, sargramostim, CTLA-4, 707 alanina prolina (707-AP), antígeno de adenocarcinoma reconocido por linfocitos T 4 (ART-4), péptido 1 de antígeno carcinoembrionario (CAP-1), canal 2 de cloruro activado por calcio (CLCA2), ciclofilina B (Cyp-B), tumor de anillo de sello humano 2 (HST-2), genes y proteínas transformantes derivados del virus de simio 40 (SV40), proteínas del virus del papiloma humano (VPH) (HPV-E6, HPV-E7, antígenos de la cápside principales o secundarios, otros), proteínas del virus de Epstein-Barr (EBV) (proteínas de membrana latentes del EBV-LMP1, LMP2; otras), proteínas del virus de la hepatitis B o C, proteínas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), homólogos funcionales, análogos funcionales o fragmentos biológicamente activos de los mismos.

En algunas realizaciones, una proteína que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular es una proteína que inhibe un antagonista endógeno (por ejemplo, proteína y/o gen) de la supervivencia y/o la proliferación celular. Por ejemplo, la proteína puede ser un inhibidor de un represor transcripcional que suprime la expresión de un gen que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular. En determinadas realizaciones, el represor transcripcional puede antagonizar un oncopéptido de la presente divulgación que regula la expresión de un gen que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular, tal como MYC. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína inhibe al menos un miembro de la familia MAD de represores transcripcionales, por ejemplo, MAD-1; o inhibidores de cinasa dependientes de ciclina (por ejemplo, p16, p19, p21 o p27).

En otras realizaciones, la supervivencia y/o la proliferación celular son promovidas por un agente que inhibe un antagonista endógeno (por ejemplo, proteína y/o gen) de la supervivencia y/o la proliferación celular. Por ejemplo, el agente puede ser un inhibidor genético o un inhibidor de molécula pequeña (tal como un antagonista). En algunas realizaciones, el agente puede incluir un inhibidor de un represor transcripcional que suprime la expresión de un gen que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular. En determinadas realizaciones, el represor transcripcional antagoniza un oncopéptido de la presente divulgación que regula la expresión de un gen que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular, por ejemplo, MYC. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente que inhibe al menos un miembro de la familia MAD de represores transcripcionales, por ejemplo, MAD-1. En determinadas realizaciones diferentes, el agente es un inhibidor de inhibidores de cinasa dependientes de ciclina (por ejemplo, p16, p19, p21 o p27).

Cualquier agente que inhiba un antagonista endógeno de una proteína que promueva la supervivencia y/o la proliferación celular con respecto a una célula de tipo silvestre del mismo tipo es adecuado para su uso en los métodos de la presente divulgación. Un agente que es un inhibidor de un antagonista endógeno de una proteína que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular reduce, inhibe o disminuye la actividad o el nivel del antagonista en cualquier etapa o mediante cualquier mecanismo. Por ejemplo, en algunos casos, un agente de este tipo interfiere con la expresión de un agente que antagoniza la actividad de una proteína que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular, por ejemplo, a nivel de la traducción o al nivel de la transcripción. En determinadas realizaciones, un agente que interfiere con la expresión de un agente que antagoniza la actividad de una proteína que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular es un agente capaz de producir interferencia de ARN (una molécula de ARNi). En algunas realizaciones, una molécula de ARNi se genera por escisión de o unión a un ARNm que codifica un polipéptido. Una molécula de ARNi se genera por cualquier medio adecuado, incluyendo por ARN de interferencia pequeño (ARNip), microARN (miARN), ARN bicatenario (ARNbc) o ARN de horquilla pequeña (ARNhp). En determinadas realizaciones, un agente que interfiere con la expresión de un agente que antagoniza la actividad de una proteína que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular es una molécula pequeña, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña.

En otras realizaciones, el agente inhibe la actividad o el nivel de una proteína que antagoniza la supervivencia y/o la proliferación celular. En algunas realizaciones, el agente actúa directamente sobre la proteína que antagoniza la supervivencia y/o la proliferación celular. Por ejemplo, el agente puede unirse e inhibir la actividad de la proteína que antagoniza la supervivencia y/o la proliferación celular. En consecuencia, en determinadas realizaciones, el agente es un anticuerpo o molécula pequeña que se une y desorganiza la función natural de una proteína que antagoniza la supervivencia y/o la proliferación celular.

En otras realizaciones, la proteína que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular incluye adicionalmente un dominio de transducción de proteínas (PTD).

En algunas realizaciones, la proteína que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular se proporciona en forma de un bolo. Como se usa en el presente documento, un "bolo" se refiere a una cantidad o concentración de una proteína que se proporciona a un sujeto para aumentar la concentración de la proteína en la sangre del sujeto a un nivel eficaz. Un bolo se puede administrar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el bolo se proporciona aproximadamente cada 12 horas, aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente cada 36 horas, aproximadamente cada 48 horas, aproximadamente cada 60 horas o aproximadamente cada 72 horas.

La proteína recombinante que promueve la supervivencia celular y/o la proliferación celular es un polipéptido MYC, un homólogo del mismo o un fragmento biológicamente activo del mismo. En algunas realizaciones, la proteína recombinante adicional que promueve la supervivencia celular y/o la proliferación celular es un polipéptido ICN-1, un homólogo del mismo o un fragmento biológicamente activo del mismo. La proteína recombinante que promueve la supervivencia celular y/o la proliferación celular es una proteína de fusión PTD-MYC. En determinadas realizaciones, la proteína recombinante adicional que promueve la supervivencia celular y/o la proliferación celular es una proteína de fusión PTD-ICN-1.

MYC

Un polipéptido MYC de la presente invención incluye, sin limitación, cualquier polipéptido o fragmento del mismo, que tenga la actividad de una proteína MYC.

Como se usa en el presente documento, "MYC" y "proteína MYC" se usan indistintamente y se refieren a una proteína que es un miembro de la familia MYC de factores de transcripción bHLH (hélice-bucle-hélice básico). Las proteínas MYC de la presente divulgación son factores de transcripción que regulan la expresión de genes sensibles a MYC y como tales entran en el núcleo de una célula para actuar. La actividad de MYC puede activar la expresión de determinados genes sensibles a MYC, mientras que reprime la expresión de otros genes sensibles a MYC. La actividad de MYC puede regular diversas funciones celulares incluyendo, sin limitación, la proliferación celular, el crecimiento celular, la supervivencia celular y la apoptosis.

Como se describe en el presente documento, la expresión transitoria de MYC, proporcionada por una fuente exógena o endógena, durante la producción de glóbulos rojos a partir de HSC puede aumentar el rendimiento de glóbulos rojos maduros, puede disminuir el tiempo de producción de glóbulos rojos maduros, puede aumentar el porcentaje de glóbulos rojos maduros en una población y/o puede aumentar la tasa de producción de glóbulos rojos maduros en comparación con la producción en ausencia de MYC. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se cree que es la expresión transitoria de niveles bajos de MYC que promueve la diferenciación de HSC a glóbulos rojos maduros, ya que se ha demostrado que la expresión prolongada de MYC en células madre embrionarias promueve la autorenovación mediante la inhibición de la diferenciación (por ejemplo, Cartwright et al., *Development*, mayo de 2005; 132(5):885-96). Por otra parte, la capacidad de la expresión transitoria de MYC a niveles bajos para potenciar la producción de glóbulos rojos maduros a partir de HSC es sorprendente dado el reciente descubrimiento de que niveles altos ectópicos de expresión de MYC inhibieron la diferenciación de células progenitoras eritroides a glóbulos rojos anucleados (Jayapal et al., *J Biol Chem*, 17 de diciembre de 2010; 285(51):40252-65).

Las proteínas de fusión PTD-MYC de la presente divulgación permiten un aumento de la actividad de MYC en las HSC mediante la adición exógena de MYC, sin la necesidad de sobreexpresar MYC endógena en las HSC o expresar de forma recombinante MYC a través de la manipulación genética de las HSC.

Los polipéptidos MYC de la presente divulgación incluyen, sin limitación, proteínas MYC de longitud completa, fragmentos que conservan la actividad de una proteína MYC de longitud completa, homólogos de los mismos y análogos de los mismos. Los polipéptidos MYC de la presente divulgación pueden producirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido MYC puede purificarse a partir de una fuente nativa, puede expresarse de forma recombinante o puede sintetizarse químicamente.

Proteínas MYC

Los ejemplos de proteínas MYC de longitud completa adecuadas para su uso en cualquiera de los métodos de la presente divulgación incluyen, sin limitación, c-Myc, N-Myc, L-Myc, v-MYC y S-Myc.

En determinadas realizaciones preferidas, el polipéptido MYC es un polipéptido c-Myc de longitud completa. El polipéptido c-Myc puede tener una o más de las siguientes características: el polipéptido puede ser un polímero de 439 aminoácidos, el polipéptido puede tener un peso molecular de 48.804 kDa, el polipéptido puede contener un dominio Hélice-Bucle-Hélice Cremallera de Leucina (bHLH/IZ) básico o el polipéptido puede unirse a una secuencia que contenga CACGTG (es decir, una secuencia de caja E). Preferentemente, el polipéptido c-Myc es el polipéptido c-Myc humano que tiene el Número de Acceso de NCBI NP_002458.2. Por otra parte, un polipéptido c-Myc de la presente divulgación puede ser un polipéptido c-Myc que no ha experimentado ninguna modificación postraducciona. Como alternativa, un polipéptido c-Myc de la presente divulgación puede ser un polipéptido c-Myc

que ha experimentado modificaciones postraduccionales.

Fragmentos de MYC biológicamente activos

- 5 En otras realizaciones, un polipéptido MYC de la presente divulgación es un fragmento biológicamente activo de una proteína MYC de longitud completa que conserva al menos una actividad de una proteína MYC de longitud completa. El polipéptido MYC puede ser un fragmento de c-Myc, N-Myc, L-Myc o S-Myc.

10 Un fragmento de MYC de la presente divulgación puede contener al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400 o más restos de aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de una proteína MYC.

15 *Homólogos y análogos de MYC*

En otras realizaciones, un polipéptido MYC de la presente divulgación es un homólogo o análogo de una proteína MYC o un fragmento de la misma, que conserva al menos una actividad de una proteína MYC de longitud completa.

- 20 Por ejemplo, un polipéptido MYC de la presente divulgación puede incluir una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en al menos del 40 % al 100 %, por ejemplo, al menos el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o idéntica en cualquier otro porcentaje de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % a una proteína MYC o fragmentos de la misma. En determinadas realizaciones, el polipéptido MYC es un homólogo o
- 25 un análogo de c-Myc, N-Myc, L-Myc, S-Myc o fragmentos de los mismos.

Los polipéptidos MYC de la presente divulgación también incluyen homólogos funcionales o análogos del polipéptido c-Myc humano que tiene un Número de Acceso de NCBI NP_002458.2 o un fragmento del mismo. En determinadas realizaciones, el homólogo o análogo de c-Myc contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos

30 del 40 % al 100 %, por ejemplo, al menos el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, o idéntica en cualquier otro porcentaje de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % a la secuencia del polipéptido c-Myc del Número de Acceso de NCBI NP_002458.2 o fragmento del mismo.

35 En otras realizaciones, el homólogo o análogo de c-Myc contiene una secuencia polipeptídica de al menos 10 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, al menos 200 aminoácidos, al menos 250 aminoácidos, al menos 300 aminoácidos, al menos 350 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos o más de longitud

40 que es idéntica en al menos el 50 % al 100 %, por ejemplo, al menos el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, o idéntica en cualquier otro porcentaje de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 % a la secuencia del polipéptido c-Myc del Número de Acceso de NPBI NP_002458.2 o fragmento del mismo.

45 Como se usa en el presente documento, un "homólogo" se refiere a una proteína o polipéptido que tiene una similitud de secuencia de aminoácidos entre una secuencia de referencia y al menos un fragmento de una segunda secuencia. Los homólogos pueden identificarse mediante cualquier método conocido en la técnica, preferentemente, mediante el uso de la herramienta BLAST para comparar una secuencia de referencia con una segunda secuencia o

50 fragmento de una secuencia o con una base de datos de secuencias. Como se describe a continuación, BLAST comparará secuencias basándose en el porcentaje de identidad y similitud.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de aminoácidos), se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Dos secuencias son sustancialmente idénticas si dos secuencias tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o

55 nucleótidos que son iguales (es decir, una identidad del 29 %, opcionalmente una identidad del 30 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % en una región específica o, cuando no se especifica, en toda la secuencia), cuando se comparan y se alinean para obtener una correspondencia máxima en una ventana de comparación o región designada tal como se determina utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias, o mediante alineación manual e

60 inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe en una región que tiene al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud o más preferentemente en una región que tiene 20, 50, 200 o más aminoácidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, normalmente, una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las

65 secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se

pueden usar parámetros de programa por defecto, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias luego calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Cuando se comparan dos secuencias para determinar su identidad, no es necesario que las secuencias sean contiguas, pero cualquier hueco conllevaría una penalización que reduciría el porcentaje de identidad global. Para blastp, los parámetros predeterminados son Penalización de apertura de hueco = 11 y Penalización de prolongación de hueco = 1. Para blastn, los parámetros predeterminados son Penalización de apertura de hueco = 5 y Penalización de prolongación de hueco = 2.

Como se usa en el presente documento, una "ventana de comparación" incluye una referencia a un segmento de una cualquiera del número de posiciones contiguas incluyendo, pero sin limitación, de 20 a 600, por lo general, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente, de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas una vez alineadas las dos secuencias de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. Se puede realizar la alineación óptima de las secuencias para la comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J Mol Biol* 48(3):443-453, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85(8):2444-2448, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual [véase, por ejemplo, Brent et al., (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Rिंगbou Ed)].

Son dos ejemplos preferidos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res* 25(17):3389-3402 y Altschul et al. (1990) *J. Mol Biol* 215(3):403-410, respectivamente. El software para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de puntuación alta (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valores positivos T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra adyacente (Altschul et al., citado anteriormente). Estos aciertos de palabra adyacente iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra se prolongan en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos con emparejamiento incorrecto; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La prolongación de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada va a cero o inferior, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 [véase Henikoff y Henikoff, (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89(22): 10915-10919] alineaciones (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de nucleótidos, el programa BLASTN usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90(12):5873-5877). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,2, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01 y mucho más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

Aparte del porcentaje de identidad de secuencia indicado anteriormente, otra indicación de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el primer polipéptido tiene reactividad cruzada inmunitaria con anticuerpos generados contra el segundo polipéptido. Por tanto, un polipéptido es normalmente prácticamente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solo por sustituciones conservativas.

Como se desvela en el presente documento, los polipéptidos MYC adecuados también incluyen variantes modificadas de forma conservadora de los polipéptidos MYC de la presente divulgación. "Variantes modificadas de forma conservadora" como se usa en el presente documento incluye sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de aminoácidos codificada que dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos

funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los ocho grupos siguientes contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

Proteínas corriente abajo de MYC

Una proteína adecuada de la presente divulgación que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular puede ser una proteína que promueva la supervivencia y/o la proliferación celular y que esté corriente abajo de MYC en una vía de MYC. Cualquier proteína corriente abajo conocida en la técnica puede ser adecuada para su uso con los métodos de la presente divulgación. Los ejemplos de proteínas adecuadas que promueven la supervivencia y/o la proliferación celular y que están corriente abajo de MYC incluyen, sin limitación, AKT y proteínas relacionadas con AKT, tales como PDK-1, mTORC2, PI3K- δ . La proteína corriente abajo de MYC que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular puede ser adicionalmente una proteína de fusión con PTD. En consecuencia, en determinadas realizaciones, la proteína corriente abajo de MYC que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular es una proteína de fusión AKT-PTD, una proteína de fusión PTD-PDK-1, una proteína de fusión PTD-mTORC2 o una proteína de fusión PTD-PI3K- δ .

En otras realizaciones, la supervivencia y/o la proliferación celular se promueve en las HSC de la presente divulgación mediante la inhibición de una proteína que antagoniza la supervivencia y/o la proliferación celular y que está corriente abajo de MYC en una vía de MYC. Los ejemplos de proteínas que antagonizan la supervivencia y/o la proliferación celular y que están corriente abajo de MYC incluyen, sin limitación, de pTEN, PP2A, PHLPP, CTMP. En consecuencia, en determinadas realizaciones, la supervivencia y/o la proliferación celular se promueve en las HSC de la presente divulgación mediante la inhibición de pTEN, PP2A, PHLPP y/o CTMP. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para inhibir la expresión, actividad y/o función de proteínas y/o genes, incluyendo sin limitación los métodos que se desvelan en el presente documento. Los ejemplos no limitantes incluyen inhibidores genéticos, inhibidores de molécula pequeña, ARN de interferencia y anticuerpos.

Actividades de proteínas MYC de longitud completa

En otras realizaciones, una proteína MYC o proteína de fusión PTD-MYC de la presente divulgación contiene un polipéptido MYC de longitud completa que tiene al menos una actividad MYC, un fragmento de una proteína MYC que conserva al menos una actividad de una proteína MYC de longitud completa, un homólogo de una proteína MYC que conserva al menos una actividad de una proteína MYC de longitud completa o un análogo de una proteína MYC que conserva al menos una actividad de una proteína MYC de longitud completa.

Las proteínas MYC de longitud completa de la presente divulgación tienen numerosas actividades. Los ejemplos de dichas actividades incluyen, sin limitación, actividad de factor de transcripción, actividad de unión a proteínas, actividad de unión a ácido nucleico, actividad de regulación de la proliferación celular, actividad de regulación del crecimiento celular, actividad de regulación de la apoptosis, actividad de regulación de la morfogénesis, actividad de regulación del desarrollo y actividad de reconstitución del compartimento hematopoyético potenciada.

En algunas realizaciones, una proteína MYC o proteína de fusión PTD-MYC de la presente divulgación tiene una actividad MYC que, junto con EPO y, opcionalmente, IL-3, produce glóbulos rojos maduros a partir de las HSC. En otras realizaciones, una proteína MYC o proteína de fusión PTD-MYC de la presente divulgación tiene una actividad MYC que immortaliza de forma condicional las HSC. De forma ventajosa, la administración de MYC en forma de una proteína de fusión PTD-MYC da como resultado una actividad MYC transitoria en las HSC. En algunas realizaciones, el nivel de actividad transitoria de MYC es suficiente para potenciar la diferenciación de HSC a glóbulos rojos maduros. Adicionalmente, una proteína de fusión PTD-MYC de la presente divulgación puede aumentar los niveles intracelulares de MYC en las HSC, dando como resultado una expansión de las HSC. Esta actividad MYC transitoria evita los efectos potencialmente negativos de la actividad MYC prolongada en las células, tal como el crecimiento celular descontrolado y la transformación oncogénica. Por otra parte, el uso de una proteína de fusión PTD-MYC permite la inducción de la actividad MYC en las HSC sin modificar genéticamente las células.

Proteínas exógenas que inhiben la apoptosis

Determinados aspectos de la presente divulgación se relacionan con el mantenimiento *in vitro* de glóbulos rojos o una población de glóbulos rojos de la presente divulgación mediante el cultivo de los glóbulos rojos o la población de glóbulos rojos en presencia de medio que incluye una o más proteínas recombinantes (tales como una proteína exógena) que inhibe la apoptosis. La invención también se refiere al cultivo de HSC de la presente divulgación en presencia de medio que incluye una o más proteínas exógenas que inhiben la apoptosis. Como se usa en el presente documento, una proteína o polipéptido que "inhibe la apoptosis" se refiere a una proteína o polipéptido cuya función, directa o indirectamente, reduce, evita o disminuye un proceso asociado a la apoptosis (es decir, la muerte celular programada).

Puede usarse cualquier proteína adecuada conocida en la técnica que inhiba la apoptosis. En algunas realizaciones, la proteína que inhibe la apoptosis es una proteína que contiene uno o más dominios de homología Bcl-2. Los ejemplos de proteínas que contienen uno o más dominios de homología Bcl-2 incluyen, sin limitación, Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Mcl-1, CED-9, A1, Bfl-1 y Bcl-w.

En algunas realizaciones, una proteína que inhibe la apoptosis es una proteína que inhibe cualquier proteína y/o gen endógenos conocidos en la técnica que promueven la apoptosis. Los ejemplos de proteínas que promueven la apoptosis incluyen, sin limitación, miembros de la familia Bcl-2, caspasas y proteínas de la familia del receptor de TNF.

En otras realizaciones, la inhibición de la apoptosis se consigue mediante un agente que inhibe una proteína y/o gen endógenos conocidos en la técnica que promueven la apoptosis. Por ejemplo, el agente puede ser un inhibidor genético o un inhibidor de molécula pequeña (tal como un antagonista). Puede usarse cualquier inhibidor genético o inhibidor de molécula pequeña conocido en la técnica para inhibir la apoptosis. En algunas realizaciones, el agente interfiere con la expresión de una proteína que promueve la apoptosis. Por ejemplo, el agente puede interferir con la expresión de una proteína que promueve la apoptosis a nivel de la traducción o a nivel de la transcripción. En algunas realizaciones, se usa ARN de interferencia para interferir con la expresión de una proteína que promueve la apoptosis. En otras realizaciones, el agente inhibe la actividad o el nivel de una proteína que promueve la apoptosis. En algunas realizaciones, el agente actúa directamente sobre la proteína que promueve la apoptosis. Por ejemplo, el agente puede unirse e inhibir la actividad de una proteína que promueve la apoptosis. En consecuencia, en determinadas realizaciones, el agente es un anticuerpo o molécula pequeña que se une y desorganiza la función natural de una proteína que inhibe la apoptosis.

En algunas realizaciones, la una o más proteínas exógenas que inhiben la apoptosis son una o más proteínas que contienen uno o más dominios de homología Bcl-2. En algunas realizaciones, la una o más proteínas exógenas que inhiben la apoptosis incluyen adicionalmente un dominio de transducción de proteínas (PTD). En algunas realizaciones, las una o más proteínas exógenas que inhiben la apoptosis son una proteína de fusión PTD-Bcl-2.

Bcl-2

Un polipéptido Bcl-2 de la presente divulgación incluye, sin limitación, cualquier polipéptido o fragmento del mismo, que tenga la actividad de una proteína Bcl-2.

Como se usa en el presente documento, "Bcl-2", "polipéptido Bcl-2", y "proteína Bcl-2" se usan indistintamente y se refieren a una proteína que es miembro de la familia de proteínas Bcl-2 que tiene uno o más y/o todos los dominios de homología Bcl-2 (BH), tales como, pero sin limitación, BH1, BH2, BH3 y BH4. Los miembros de la familia de proteínas bcl-2 normalmente forman heterodímeros u homodímeros y funcionan como reguladores de la apoptosis. En determinadas realizaciones preferidas, los polipéptidos Bcl-2 de la presente divulgación tienen actividad antiapoptótica y/o una actividad útil en el proceso de immortalización condicional de las HSC.

Como se describe en el presente documento, la adición de Bcl-2 exógena a una población de glóbulos rojos puede aumentar el tiempo durante el cual los glóbulos rojos permanecen viables *in vitro*, puede aumentar el porcentaje de glóbulos rojos que permanecen viables a lo largo del tiempo y/o puede retrasar y/o reducir la pérdida de una o más características funcionales de los glóbulos rojos a lo largo del tiempo *in vitro*, en comparación con una población correspondiente de glóbulos rojos que se mantiene en ausencia de Bcl-2. En algunas realizaciones, la adición de Bcl-2 exógeno es a los medios de almacenamiento de glóbulos rojos. La una o más características funcionales pueden incluir, pero sin limitación, una o más de entre la capacidad de transporte de oxígeno, la cantidad de hemoglobina, el tipo de hemoglobina expresada (adulto frente a fetal), el nivel de receptor de transferrina expresado en la superficie o uno o más marcadores de glóbulos rojos maduros.

En otra realización, la regulación positiva transitoria de Bcl-2, proporcionada por una fuente exógena o endógena durante las etapas finales de la producción de glóbulos rojos a partir de HSC, puede aumentar la cantidad de tiempo que los glóbulos rojos permanecen viables *in vitro*, puede aumentar el porcentaje de glóbulos rojos que permanecen viables a lo largo del tiempo y/o pueden retrasar y/o reducir la pérdida de una o más características funcionales de los glóbulos rojos con el tiempo *in vitro*, en comparación con el mantenimiento en ausencia de Bcl-2. En algunas realizaciones, la regulación positiva transitoria de Bcl-2, proporcionada por una fuente exógena o endógena durante las etapas finales de la producción de glóbulos rojos a partir de HSC, se diseña para potenciar el mantenimiento de los glóbulos rojos en los medios de almacenamiento de glóbulos rojos.

En otra realización, la presente divulgación se basa en medios de almacenamiento de glóbulos rojos que contienen Bcl-2.

Las proteínas de fusión PTD-Bcl-2 de la presente divulgación permiten un aumento de la actividad Bcl-2 en las HSC mediante la adición exógena de Bcl-2, sin la necesidad de sobreexpresar Bcl-2 endógeno en las HSC o la expresión recombinante de Bcl-2 a través de manipulación genética de las HSC.

Los polipéptidos Bcl-2 de la presente divulgación incluyen, sin limitación, proteínas Bcl-2 de longitud completa, fragmentos que conservan la actividad de una proteína Bcl-2 de longitud completa, homólogos de los mismos y análogos de los mismos. En algunas realizaciones, los fragmentos de Bcl-2 que conservan la actividad de una proteína Bcl-2 de longitud completa incluyen una forma truncada de Bcl-2 que se ha suprimido del dominio de bucle no estructurado (Anderson, M., et al. (1999). *Refolding, purification and characterization of a loop deletion mutant of human Bcl-2 from bacterial inclusion bodies*. *Prot Expr. Purif.* 15, 162-70). Los polipéptidos Bcl-2 de la presente divulgación pueden producirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido Bcl-2 puede purificarse a partir de una fuente nativa, puede expresarse de forma recombinante o puede sintetizarse químicamente.

Proteínas Bcl-2

Los ejemplos de proteínas Bcl-2 de longitud completa adecuadas para su uso en cualquiera de los métodos de la presente divulgación incluyen, sin limitación, Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Mcl-1, CED-9, proteína A1 relacionada con Bcl-2, Bfl-1 y Bcl-w.

En determinadas realizaciones preferidas, el polipéptido Bcl-2 es un polipéptido Bcl-2 humano de longitud completa que se ha suprimido del dominio de bucle no estructurado. El polipéptido Bcl-2 humano puede tener una o más de las siguientes características: el polipéptido puede ser un polímero de 239 aminoácidos, el polipéptido puede tener un peso molecular de aproximadamente 26,3 kDa o el polipéptido puede contener al menos un dominio de homología Bcl-2 (BH), tal como BH1, BH2, BH3 y BH4. Preferentemente, el polipéptido Bcl-2 humano es el polipéptido Bcl-2 que tiene un Número de Acceso de NCBI NP_000624.2. Por otra parte, un polipéptido Bcl-2 de la presente divulgación puede ser un polipéptido Bcl-2 que no ha experimentado ninguna modificación postraduccional. Como alternativa, un polipéptido Bcl-2 de la presente divulgación puede ser un polipéptido Bcl-2 que ha experimentado modificaciones postraducionales.

Fragmentos de Bcl-2 biológicamente activos

En otras realizaciones, un polipéptido Bcl-2 de la presente divulgación es un fragmento biológicamente activo de una proteína Bcl-2 de longitud completa que conserva al menos una actividad de una proteína Bcl-2 de longitud completa. El polipéptido Bcl-2 puede ser un fragmento de Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Mcl-1, CED-9, proteína A1 relacionada con Bcl-2, Bfl-1 o Bcl-w.

Un fragmento Bcl-2 de la presente divulgación puede contener al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 160, al menos 170, al menos 180, al menos 190, al menos 200, al menos 210, al menos 220, al menos 230 o más restos de aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de una proteína Bcl-2.

Homólogos y análogos de Bcl-2

En otras realizaciones, un polipéptido Bcl-2 de la presente divulgación es un homólogo o análogo de una proteína Bcl-2 o un fragmento de la misma. Por ejemplo, un polipéptido Bcl-2 de la presente divulgación puede incluir una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en al menos el 40 % al 100 %, por ejemplo, al menos el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o idéntica en cualquier otro porcentaje de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % a una proteína Bcl-2 o fragmentos de la misma. En determinadas realizaciones, el polipéptido Bcl-2 es un homólogo o análogo de Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Mcl-1, CED-9, proteína A1 relacionada con Bcl-2, Bfl-1, Bcl-w o fragmentos de las mismas.

Los polipéptidos Bcl-2 de la presente divulgación también incluyen homólogos funcionales o análogos del polipéptido Bcl-2 humano que tienen un Número de Acceso de NCBI NP_00624.2 o un fragmento del mismo. En determinadas realizaciones, el homólogo o análogo de Bcl-2 contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 40 % al 100 %, por ejemplo, al menos el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o idéntica en cualquier otro porcentaje de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % a la secuencia del polipéptido Bcl-2 del Número de Acceso de NCBI NP_00624.2 o fragmento del mismo.

En otras realizaciones, el homólogo o análogo de Bcl-2 contiene una secuencia polipeptídica de al menos 10 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 110 aminoácidos, al menos 120 aminoácidos, al menos 130 aminoácidos, al menos 140 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, al menos 160 aminoácidos, al menos 170 aminoácidos, al menos 180 aminoácidos, al menos 190 aminoácidos, al menos 200 aminoácidos, al menos 210 aminoácidos, al menos 220 aminoácidos, al menos 230 aminoácidos o más de longitud que es idéntica en al menos

del 50 % al 100 %, por ejemplo, al menos el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o idéntica en cualquier otro porcentaje de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 % a la secuencia del polipéptido Bcl 2 de Número de Acceso de NCBI NP_00624.2 o fragmento del mismo.

Como se desvela en el presente documento, los polipéptidos Bcl-2 adecuados también incluyen variantes modificadas de forma conservadora de los polipéptidos Bcl-2 de la presente divulgación.

Homólogos de Bcl-2 que promueven la apoptosis

En algunas realizaciones, la apoptosis se inhibe mediante la inhibición de una proteína que contiene uno o más dominios BH y que promueve la apoptosis. Los ejemplos de proteínas que contienen dominio BH que promueven la apoptosis incluyen, sin limitación, Bcl-Xs, BIM, PUMA, NOXA, NOXA-2, DIVA, BAK, BAX, BIK, BAD, BID y EGL-1. En consecuencia, en determinadas realizaciones, la apoptosis se inhibe mediante la inhibición de Bcl-X, BIM, PUMA, NOXA, NOXA-2, DIVA, BAK, BAX, BIK, BAD, BID y/o EGL-1. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para inhibir la expresión, la actividad y/o la función de proteínas y/o genes, incluyendo, sin limitación, los métodos que se desvelan en el presente documento. Los ejemplos no limitantes incluyen inhibidores genéticos, inhibidores de molécula pequeña, ARN de interferencia y anticuerpos.

Actividades de proteínas Bcl-2 de longitud completa

En otras realizaciones, una proteína Bcl-2 o una proteína de fusión PTD-Bcl-2 de la presente divulgación contiene un polipéptido Bcl-2 de longitud completa que tiene al menos una actividad Bcl-2, un fragmento de una proteína Bcl-2 que conserva al menos una actividad de una proteína Bcl-2 de longitud completa, un homólogo de una proteína Bcl-2 que conserva al menos una actividad de una proteína Bcl-2 de longitud completa o un análogo de una proteína Bcl-2 que conserva al menos una actividad de una proteína Bcl-2 de longitud completa.

Las proteínas Bcl-2 de longitud completa de la presente divulgación tienen numerosas actividades. Los ejemplos de dichas actividades incluyen, sin limitación, actividad de regulación de la apoptosis, actividad de regulación de la supervivencia celular, actividad de unión a proteínas, actividad de regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, actividad de regulación de la caspasa, actividad de regulación del canal aniónico dependiente del voltaje, actividad de regulación del punto de control G2, actividad de regulación del canal de la membrana mitocondrial externa (VDAC), actividad de regulación del potencial de la membrana mitocondrial, actividad de canal de proteína y actividad de regulación del citocromo C.

En algunas realizaciones, una proteína Bcl-2 o una proteína de fusión PTD-Bcl-2 de la presente divulgación tiene una actividad Bcl-2 que ayuda en la producción de glóbulos rojos maduros a partir de HSC, en el mantenimiento de glóbulos rojos o una población de glóbulos rojos y/o en la inmortalización de las HSC. De forma ventajosa, la administración de Bcl-2 en forma de una proteína de fusión PTD-Bcl-2 da como resultado una actividad transitoria de Bcl-2 en las HSC. Esta actividad transitoria de Bcl-2 evita cualquier efecto potencialmente negativo de la actividad prolongada de Bcl-2 en las células. Por otra parte, el uso de una proteína de fusión PTD-Bcl-2 permite la inducción de la actividad de Bcl-2 en los glóbulos rojos y/o las HSC sin modificar genéticamente las células y permite el mantenimiento *in vitro* de glóbulos rojos maduros anucleados.

Proteínas de interés

Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren a la producción *in vitro* de una población de glóbulos rojos a partir de las HSC; el mantenimiento *in vitro* de glóbulos rojos o una población de glóbulos rojos y/o la administración de glóbulos rojos a un sujeto que lo necesite, donde los glóbulos rojos o la población de glóbulos rojos incluyen una o más proteínas de interés. Los aspectos de la presente divulgación también incluyen una población de glóbulos rojos que incluye una o más proteínas de interés y composiciones farmacéuticas que incluyen dicha población de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la o más proteínas de interés incluyen adicionalmente un dominio de transducción de proteínas (PTD). En algunas realizaciones, la proteína de interés es una proteína de fusión PTD-proteína de interés.

Las proteínas de interés pueden incluir, pero sin limitación, uno o más factores de crecimiento, hormonas u otros polipéptidos útiles para la prevención, el diagnóstico y/o el tratamiento de una o más enfermedades o trastornos. El uso de glóbulos rojos o poblaciones de glóbulos rojos de la presente divulgación que contienen una o más proteínas de interés es ventajoso por una diversidad de razones, incluyendo, pero sin limitación, una o más de entre la naturaleza transitoria de los glóbulos rojos y las proteínas codificada que entregarán; la falta de material genético en las células completamente maduras y anucleadas; y el uso de un "auto" vaso que es tolerado por el compartimento linfóide de la ontogenia.

En algunas realizaciones, las proteínas de interés se asocian a membranas de glóbulos rojos *in vitro* antes de la administración, por ejemplo, por transfusión, en un sujeto. En algunas realizaciones, dicha asociación está mediada por un enlace covalente o no covalente. Los ejemplos no limitantes de dichas asociaciones incluyen los enlaces

sulphidrido y la unión anticuerpo-epítipo, entre otros.

En algunas realizaciones, las proteínas de interés se configuran para su administración a través de la incorporación en la membrana de la superficie externa de glóbulos rojos producidos *in vitro*. En algunas realizaciones, la HSC utilizada en el proceso de producción del glóbulo rojo se modifica por ingeniería genética para expresar y/o sobreexpresar una o más proteínas de interés. Opcionalmente, la proteína de interés puede modificarse por ingeniería genética con uno o más de entre una secuencia de exportación, un elemento de retención de la membrana plasmática o un sitio de escisión de la proteasa.

En algunas realizaciones, las proteínas de interés se configuran para la administración a través de la incorporación en un glóbulo rojo o HSC de la presente divulgación usando una proteína de fusión que incluye un dominio de transducción de proteínas. Los métodos de fabricación y uso de dichas proteínas de fusión PTD-proteína de interés son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento, e incluyen métodos similares a los utilizados para Myc y Bcl-2, entre otros.

En algunas realizaciones, las HSC son HSC inmortalizadas de forma condicional. En algunas realizaciones, las HSC inmortalizadas de forma condicional son proteínas HSC transducidas, se inmortalizan de forma condicional a través del uso de transgenes inducibles y/o se inmortalizan mediante la sobreexpresión transitoria de uno o más genes endógenos y/o exógenos que promueven la inmortalización. Los genes que promueven la inmortalización son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º US 2007/0116691).

En algunas realizaciones, las HSC inmortalizadas de forma condicional son HSC de donantes universales. En algunas realizaciones, las HSC inmortalizadas de forma condicional provienen de un tipo sanguíneo raro o de un individuo que necesita tratamiento. En algunas realizaciones, el individuo puede padecer una enfermedad rara, tener un fenotipo sanguíneo raro o un fenotipo sanguíneo para el que es difícil encontrar una coincidencia de alotipo.

Construcción de vectores que codifican proteínas de interés

En algunos aspectos de la presente divulgación, las proteínas de interés se incorporan a las HSC de la presente divulgación usando cualquier método adecuado de modificación transgénica de las HSC conocidas en la técnica (por ejemplo, Riviere et al., *Blood*. 2 de febrero de 2012; 119(5):1107-16), incluyendo sin limitación, las que se describen en el presente documento. Por ejemplo, pueden incorporarse una o más proteínas de interés en las HSC utilizando métodos similares a los que se describen en el presente documento para generar HSC transgénicas inmortalizadas de forma condicional (por ejemplo, véase la sección "estirpe celular HSC" y los Ejemplos a continuación).

En algunas realizaciones, las proteínas de interés estarán codificadas por un ADNc en el contexto de un vector, tal como un vector vírico. Los métodos para incorporar ADNc que codifican proteínas de interés en un vector vírico son conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, los que se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, una población de glóbulos rojos de la presente divulgación incluye una o más proteínas de interés diseñadas para liberarse de la superficie de los glóbulos rojos después de la transfusión *in vivo*. En algunas realizaciones, el vector también incluirá uno o más de entre una secuencia de exportación, un elemento de conservación de membrana plasmática o un sitio de escisión de proteasa unido y/o fusionado con la proteína de interés.

Las secuencias de exportación de proteínas son bien conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la proteína de interés incluirá adicionalmente una secuencia señal del retículo endoplásmico, opcionalmente en el extremo N-terminal. En algunas realizaciones, la proteína de interés es Bcl-2.

Los elementos de conservación de la membrana plasmática son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, una o más de entre la región citoplásmica de una proteína unida a GPI y, opcionalmente, una o más proteínas transmembrana de glóbulos rojos tales como CD40, CD25, IgG, FcRN, CD8 y/o CD16.

Los sitios de escisión de proteasas son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, un elemento de conservación de plasma puede incluir porciones transmembrana de IgG unidas a la proteína de interés, donde la porción transmembrana y/o enlazadora de IgG incluye uno o más sitios de escisión de IgG, opcionalmente reconocidos por proteasas de mamíferos. El sitio de escisión de proteasas puede seleccionarse para facilitar la liberación de la proteína de interés *in vivo*, opcionalmente a través de la selección de un sustrato de proteasas de suero normales (endógenas).

En algunas realizaciones, la población de glóbulos rojos incluye una o más proteínas de interés diseñadas para mantenerse en la superficie de los glóbulos rojos después de la transfusión *in vivo*. En consecuencia, en algunas realizaciones, el vector incluye una o más de entre una secuencia de exportación y un elemento de conservación de membrana plasmática. En algunas realizaciones, las porciones citoplásmicas y/o transmembrana de la proteína de fusión pueden derivar de una fuente tal como, pero sin limitación, ADNc que codifica una o más proteínas transmembrana de glóbulos rojos tales como, pero sin limitación, CD40, CD25, IgG, FcRN, CD8 y/o CD16, entre

otros.

En algunas realizaciones, la población de glóbulos rojos incluye una o más proteínas de interés diseñadas para mantenerse en la superficie de los glóbulos rojos y configuradas para unirse a proteínas u otros compuestos durante la carga útil antes de la transfusión *in vivo*. Esto permite una mayor flexibilidad en cuanto a las opciones de carga útil para los glóbulos rojos, incluyendo evitar posibles problemas de toxicidad y/o dificultades con la modificación por ingeniería genética de las HSC utilizadas para producir los glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el vector también incluirá uno o más de entre una secuencia de exportación, un elemento de conservación de membrana plasmática o un sitio de unión o un resto de enlace. En algunas realizaciones, los sitios de unión o grupos de enlace pueden incluir, pero sin limitación, restos sulfhidrilo, una porción de un enlace biotina-avidina, así como agentes de reticulación reversibles y no reversibles (por ejemplo, DSS, DSST, PEG, etc.).

En algunas realizaciones, se contempla explícitamente incluir una o más proteínas de interés en glóbulos rojos o poblaciones de glóbulos rojos de la presente divulgación. Por ejemplo, las HSC pueden modificarse para incorporar moléculas de direccionamiento, receptores señuelo y/o cargas útiles de proteínas, entre otros.

Proteínas de interés de ejemplo

Aunque no pretende ser limitante, se proporciona una diversidad de ejemplos de proteínas de interés y su uso. En algunas realizaciones, las proteínas de interés asociadas a glóbulos rojos permiten la administración transitoria de factores de crecimiento hematopoyéticos y factores de diferenciación incluyendo, pero sin limitación, EPO, TPO y GM-CSF; o factores que pueden usarse para movilizar las HSC, tales como G-CSF. En algunas realizaciones, las proteínas de interés con dianas en el compartimento hematopoyético pueden incorporarse en los glóbulos rojos usando métodos transgénicos que dan como resultado el mantenimiento de la proteína de interés en la superficie de los glóbulos rojos, lo que limita la captación de la proteína de interés en otros compartimentos de tejido y permitiendo un aclaramiento más rápido del sistema.

En algunas realizaciones, las proteínas de interés asociadas a glóbulos rojos permiten la entrega de receptores señuelo que afectan a las vías inflamatorias en pacientes con afecciones inflamatorias agudas, incluyendo, pero sin limitación, IL-R-Fc, IL6R-Fc, TNFaR-Fc, IFNaR-Fc y BAFFR-Fc. Los glóbulos rojos pueden diseñarse con uno o más de estos receptores incorporados en sus membranas plasmáticas. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, los receptores pueden ser capaces de unirse a sus ligandos afines y retirar los ligandos de la circulación, disminuyendo de este modo estos mediadores inflamatorios circulantes y mejorando la afección inflamatoria aguda. En algunas realizaciones, puede usarse un enfoque de receptor señuelo similar para retirar otros restos de la sangre, incluyendo, por ejemplo, partículas víricas.

En algunas realizaciones, las proteínas de interés asociadas a glóbulos rojos permiten la entrega de ligandos señuelo que pueden unirse competitivamente a receptores asociados a tormentas de citocinas, incluyendo, pero sin limitación, IL-R-Fc, IL6R-Fc, TNFaR-Fc, IFNaR-Fc y BAFFR-Fc y alivian los signos clínicos asociados a una tormenta de citocinas usando un enfoque similar.

En algunas realizaciones, las proteínas asociadas a glóbulos rojos de interés permiten la entrega de toxinas codificadas por proteínas, incluyendo, pero sin limitación, toxina colérica, toxina de Shigella, ricina y toxina diftérica. Dichas cargas útiles tóxicas pueden diseñarse para el tratamiento de cánceres, tales como tumores sólidos que están altamente vascularizados. En algunas realizaciones, las proteínas de interés pueden modificarse por ingeniería genérica para que se expresen en estos glóbulos rojos. En algunas realizaciones, las HSC se modifican por ingeniería genética para expresar proteínas transmembrana que tienen una parte externa configurada con un sitio de unión covalente o no covalente. Por ejemplo, la porción externa puede tener restos sulfhidrilo diseñados para formar enlaces disulfuro, enlaces avidina-biotina o cualquier otro enlace que permita la asociación posterior de la carga útil deseada (por ejemplo, toxinas codificadas por proteínas y, opcionalmente, otras cargas útiles deseadas). Por ejemplo, los glóbulos rojos también pueden modificarse por ingeniería genética usando uno o más de estos enfoques para entregar inhibidores angiogénicos unidos a la membrana a los sitios de los tumores.

En algunas realizaciones, las proteínas de interés asociadas a glóbulos rojos permiten el direccionamiento de los glóbulos rojos a los tejidos y/o células de interés. Por ejemplo, el direccionamiento puede ser útil para llevar glóbulos rojos a tumores o a células tumorales, entre otros usos. En algunas realizaciones, el direccionamiento puede ser conseguirse a través de una diversidad de métodos incluyendo, pero sin limitación, la expresión de marcadores, receptores, ligandos y anticuerpos en la superficie de los glóbulos rojos o a través de la unión de uno o más de estos restos en la superficie de los glóbulos rojos.

En algunas realizaciones, las proteínas de interés asociadas a glóbulos rojos permiten la entrega de factores proangiogénicos y/o linfoangiogénicos a los tejidos afectados por la desregulación vascular tal como, pero sin limitación, los sabañones, la vasoconstricción relacionada con el cáncer o las articulaciones reumáticas, etc.

En algunas realizaciones, las proteínas de interés asociadas a glóbulos rojos permiten la entrega de péptidos vasodilatadores en casos agudos que implican vasoconstricción, incluyendo, pero sin limitación, vasoconstricción

durante infartos cardíacos agudos, usos obstétricos durante el parto y migrañas agudas y/o persistentes, entre otros.

En algunas realizaciones, las proteínas de interés asociadas a glóbulos rojos permiten la entrega de antígenos para estimular la inmunidad de por vida. El antígeno puede administrarse a través de un glóbulo rojo genéticamente modificado genéticamente diseñado para presentar el antígeno de interés (proteína) junto con un ligando TLR en el glóbulo rojo.

En algunas realizaciones, las proteínas de interés asociadas a glóbulos rojos permiten la entrega de una o más proteínas de interés para aliviar la formación de coágulos en pacientes con alto riesgo de formar coágulos. En algunas realizaciones, una transfusión de sangre a un paciente con alto riesgo de formar coágulos puede incluir glóbulos rojos que tengan proteasas unidas a la membrana que sean específicas de los tejidos fibróticos en masas embolíticas y, opcionalmente, tengan moléculas de direccionamiento para dichas ubicaciones. Un enfoque similar puede ser útil para pacientes con riesgo elevado de embolia pulmonar.

En algunas realizaciones, las proteínas de interés no incluyen Myc o Bcl-2.

Dominios de transducción de proteínas

Como se usa en el presente documento, las expresiones "dominio de transducción de péptidos", "dominio de transducción de proteínas" y "PTD" se usan indistintamente y se refieren a una secuencia peptídica o dominio de una proteína que promueve la penetración de proteínas en una célula de mamífero y/o uno o más compartimentos dentro de una célula de mamífero. En un ejemplo no limitante, un PTD promueve la penetración de un péptido y/o proteína acoplados en el núcleo de una célula.

Los PTD de la presente divulgación pueden aislarse de una proteína que contiene PTD mediante cualquier método de aislamiento de un dominio de proteína conocido en la técnica, tal como biología molecular y técnicas bioquímicas convencionales. Como alternativa, los PTD de la presente divulgación pueden sintetizarse. Los PTD adecuados de la presente divulgación pueden tener una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 30 restos de aminoácidos y pueden estar enriquecidos en restos de aminoácidos básicos, tales como arginina (Arg) y lisina (Lys). En algunas realizaciones, el PTD pueden tener una secuencia peptídica corta enriquecida en aminoácidos básicos (arginina y lisina), opcionalmente dispuestos en una estructura α -helicoidal.

Como se desvela en el presente documento, los PTD de la presente divulgación están acoplados (por ejemplo, fusionados, conjugados, entrecruzados, etc.) con un péptido y/o proteína con el fin de facilitar la penetración del péptido y/o proteína en una célula y/o compartimento de mamífero dentro de una célula de mamífero. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un PTD de la presente divulgación está acoplado a una proteína MYC y/o una proteína Bcl-2 y/o una proteína de interés.

Los dominios de transducción de proteínas adecuados para su uso en cualquiera de los métodos de la presente divulgación incluyen cualquier PTD conocido en la técnica (por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º US 2007/0116691 y US 2010/0055129). Por ejemplo, los PTD adecuados pueden obtenerse o derivar de proteínas incluyendo, sin limitación, proteínas TAT (trans-activadoras de la transcripción) lentivíricas, proteínas VPR lentivíricas, proteínas VP22 de herpesvirus y homeoproteínas.

Los ejemplos de PTD adecuados obtenidos o derivados de proteínas TAT lentivíricas incluyen, sin limitación, el PTD de una proteína TAT de un virus que contiene proteína TAT, el PTD de una proteína TAT de un lentivirus que contiene proteína TAT, el PTD de la proteína TAT del VIH 1, el PTD de la proteína TAT del VIH-2, el PTD de la proteína TAT del VIS, el PTD de la proteína TAT de un lentivirus de primate, el PTD de la proteína TAT de un lentivirus ovino, el PTD de la proteína TAT de un lentivirus bovino, el PTD de la proteína TAT de un lentivirus equino, el PTD de la proteína TAT de un lentivirus felino, un PTD de la proteína TAT de una subvariante del VIH, VIS, lentivirus de primate, lentivirus ovino, lentivirus bovino, lentivirus equino o lentivirus felino y homólogos de los mismos. En determinadas realizaciones, el PTD son los restos de aminoácidos 48-57 de la proteína TAT del VIH (TAT_[48-57]). En otras realizaciones, el PTD son los restos de aminoácidos 57-48 de la proteína TAT del VIH (TAT_[57-48]).

Los ejemplos de PTD adecuados que pueden obtenerse o derivar de proteínas VPR lentivíricas incluyen, sin limitación, el PTD de una proteína VPR de un virus que contiene proteína VPR, el PTD de una proteína VPR de un lentivirus que contiene proteína VPR, el PTD de la proteína VPR del VIH-1, el PTD de la proteína VPR del VIH-2, el PTD de la proteína VPR del VIS, el PTD de la proteína VPR de un lentivirus de primate, el PTD de la proteína VPR de un lentivirus ovino, el PTD de la proteína VPR de un lentivirus bovino, el PTD de la proteína VPR de un lentivirus equino, el PTD de la proteína VPR de un lentivirus felino, un PTD de la proteína VPR de una subvariante del VIH, VIS, lentivirus de primate, lentivirus ovino, lentivirus bovino, lentivirus equino o lentivirus felino y homólogos de los mismos.

Los ejemplos de PTD adecuados que pueden obtenerse o derivar de las proteínas VP22 de herpesvirus incluyen, sin limitación, el PTD de la proteína VP22 del herpesvirus 1 (VHS-1) humano, el PTD de la proteína VP22 del

herpesvirus 2 (VHS-2) humano, el PTD de la proteína VP22 del BHV-1, el PTD de la proteína 1VP22 del herpesvirus Psittacid, el PTD de la proteína VP22 del herpesvirus 1 equino, el PTD de la proteína VP22 del herpesvirus 4 equino, el PTD de la proteína VP22 del herpesvirus 2 Gallid, el PTD de la proteína VP22 del virus Varicela-zóster y homólogos de los mismos.

Los ejemplos de PTD adecuados que pueden obtenerse o derivarse de los factores de transcripción del homeodominio incluyen, sin limitación, el homeodominio (HD) de la proteína Antennapedia (Antp) de *Drosophila*, el HD de la proteína Fushi tarazu (Ftz) de *Drosophila*, el HD de la proteína Engrailed (En) de *Drosophila*, el HD de la proteína Engrailed-2 de polluelo, el HD de homeoproteínas de mamíferos, el HD de homeoproteínas humanas, el HD de homeoproteína Hox-A5 humana, el HD de homeoproteína Hox-A4 humana, el HD de homeoproteína Hox-B5 humana, el HD de homeoproteína Hox-B6 humana, el HD de homeoproteína Hox-B7 humana, el HD de homeoproteína HOX-D3 humana, el HD de homeoproteína GOX humana, el HD de homeoproteína MOX-2 humana, el HD de homeoproteína Hoxc-8 humana, el HD de homeoproteína Isl-1 (Isl-1) humana y homólogos de los mismos.

Adicionalmente, los PTD adecuados incluyen, sin limitación, el PTD derivado de Kaposi-FGF (K-FGF o FGF-4), el PTD derivado de FGF-2, el PTD derivado de FGF-1 y el PTD de otros miembros del FGF-familia de proteínas.

Otros PTD adecuados incluyen PTD sintéticos (por ejemplo, Beerens, AMJ et al. *Curr Gene Ther.* octubre de 2003; 3(5):486-94). En algunas realizaciones, un PTD sintético puede incluir EPTD, un dominio de transducción de proteínas optimizado (YARAAARQARA) (Ho, A. et al., *Cancer Res.* (2001) 61:474-477).

Otros PTD adecuados incluyen, sin limitación, un péptido CHARIOT™ (Active Motif, Carlsbad, CA).

En algunas realizaciones, los PTD de la presente divulgación se producen de forma recombinante, mientras que en otros los PTD se producen de forma sintética o se purifican a partir de una fuente nativa.

Modificaciones de proteínas de fusión de PTD

En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de PTD de la presente divulgación contienen una o más moléculas que unen el PTD a un polipéptido, tal como una proteína recombinante de la presente divulgación que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular, una proteína exógena de la presente divulgación que inhibe la apoptosis o una proteína de interés de la presente divulgación. En realizaciones adicionales, la una o más moléculas enlazadoras son péptidos de aminoácidos.

Las proteínas de fusión de PTD de la presente divulgación pueden contener adicionalmente al menos una secuencia de aminoácidos que facilita la purificación de las proteínas de fusión. Por ejemplo, las proteínas de fusión de PTD pueden contener un marcador de proteína, tal como un marcador de polihistidina. Como alternativa, o además, las proteínas de fusión PTD-MYC pueden contener un marcador de epítipo, tal como un marcador de epítipo V5.

En consecuencia, en determinadas realizaciones, las proteínas de fusión de PTD de la presente divulgación contienen adicionalmente un marcador de polihistidina. En algunas realizaciones, el marcador de polihistidina es un marcador de 6-histidina. En algunas realizaciones, el marcador de histidina contiene la secuencia HHHHHH. Adicionalmente, el marcador de histidina puede añadirse a una proteína de fusión de PTD de la presente divulgación mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, una secuencia de proteína de fusión de PTD puede clonarse en un vector de expresión que codifique un marcador de polihistidina. Como alternativa, puede añadirse un marcador de polihistidina por PCR (es decir, los cebadores de PCR contienen una secuencia de polihistidina).

Por otra parte, una proteína de fusión de PTD de la presente divulgación también puede contener al menos un marcador de proteína. En algunas realizaciones, el al menos un marcador de proteína es un marcador de epítipo. Preferentemente, el marcador de epítipo es un marcador de epítipo V5. En algunas realizaciones, el marcador del epítipo V5 contiene la secuencia de aminoácidos: GKPIPNLLGLDST, mientras que en otras realizaciones el marcador del epítipo V5 contiene la secuencia de aminoácidos: IPNPLLGLD. Los aminoácidos pueden estar en la formación D o en la formación L. En algunas realizaciones, una primera pluralidad de aminoácidos está en la formación D y una segunda pluralidad está en la formación L. Adicionalmente, puede añadirse un marcador del epítipo V5 de la presente divulgación a una proteína de fusión PTD de la presente divulgación mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, puede clonarse una secuencia de proteína de fusión de PTD en un vector de expresión que codifica un marcador de epítipo V5. Como alternativa, puede añadirse un marcador de epítipo V5 por PCR (es decir, los cebadores de PCR contienen una secuencia de epítipo V5).

En determinadas realizaciones preferidas, una proteína de fusión de PTD de la presente divulgación contiene adicionalmente un marcador de polihistidina y un marcador de epítipo. Preferentemente, la proteína de fusión de PTD contiene un marcador de 6-histidina y un marcador de epítipo V5.

Construcción de proteínas de fusión de PTD

En algunas realizaciones, una proteína de fusión de PTD de la presente divulgación puede construirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica (por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º US 2010/0055129).

En un ejemplo no limitante, una secuencia de ácido nucleico que codifica un PTD-proteína recombinante que promueve la supervivencia celular y/o la proliferación de la presente divulgación (por ejemplo, una proteína de fusión PTD-MYC, una proteína de fusión PTD-ICN-1, etc.) puede generarse por PCR. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PTD-MYC se genera por PCR. Esto puede lograrse diseñando un cebador directo para una secuencia MYC que contenga una secuencia PTD en fase de lectura, tal como la secuencia de 9 aminoácidos RATRQRRRR de TAT y un cebador inverso para la secuencia MYC que se diseña para retirar el codón de parada. El producto de PCR de una reacción de PCR que usa dichos cebadores puede clonarse después en cualquier vector de expresión adecuado conocido en la técnica.

En un ejemplo no limitante, una secuencia de ácido nucleico que codifica un PTD-proteína exógena que inhibe la apoptosis de la presente divulgación (por ejemplo, una proteína de fusión PTD-Bcl-2, una proteína de fusión PTD-Bcl-w, una proteína de fusión PTD-Bcl-X, una proteína de fusión PTD-Bcl-XI, una proteína de fusión PTD-Mcl-1, etc.) puede generarse por PCR. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PTD-Bcl-2 se genera por PCR. Esto puede lograrse diseñando un cebador directo para una secuencia de Bcl-2 que contenga una secuencia de PTD en fase de lectura, tal como la secuencia de 9 aminoácidos RKKRRQRRRR de TAT y un cebador inverso para la secuencia de Bcl-2 que se diseña para retirar el codón de parada. El producto de PCR de una reacción de PCR que usa dichos cebadores puede clonarse después en cualquier vector de expresión adecuado conocido en la técnica. El bucle no estructurado Bcl-2 puede retirarse de la secuencia codificante BCL-2 usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio.

En un ejemplo no limitante, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PTD-proteína de interés de la presente divulgación puede generarse por PCR. Esto puede lograrse diseñando un cebador directo para una secuencia de proteína de interés que contenga una secuencia de PTD en fase de lectura, tal como la secuencia de 9 aminoácidos RATRQRRRR de TAT y un cebador inverso para la secuencia de proteína de interés que se diseña para retirar el codón de parada. El producto de PCR de una reacción de PCR que usa dichos cebadores puede clonarse después en cualquier vector de expresión adecuado conocido en la técnica.

Células madre hematopoyéticas

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a la producción *in vitro* de una población de glóbulos rojos mediante el cultivo de células madre hematopoyéticas (HSC), opcionalmente inmortalizadas de forma condicional y/o modificadas genéticamente para incluir una o más proteínas de interés, con EPO y, opcionalmente, IL-3, y una o más proteínas recombinantes o fragmentos biológicamente activos de las mismas, que promueven la supervivencia y/o la proliferación celular. Este proceso puede realizarse en presencia o ausencia de células alimentadoras y suero. En determinadas realizaciones preferidas, el proceso se realiza en ausencia de células alimentadoras y/o suero.

Las HSC adecuadas para su uso con los métodos de la presente divulgación pueden producirse a partir de células madre embrionarias (ES) y/o células madre pluripotentes inducidas (iPS). Puede usarse cualquier método para producir HSC a partir de células ES y/o células iPS conocido (por ejemplo, Keller, *G. Genes Dev.* 2005 19: 1129-1155; y Papapetrou Sadelain, *F1000 Med Rep.* 16 de junio de 2010; 2). Por ejemplo, las HSC pueden producirse a partir de células ES mediante modelado del desarrollo hematopoyético del cultivo de células ES en el compromiso hematopoyético en el embrión temprano (por ejemplo, Keller, *G. Genes Dev.* 2005 19: 1129-1155).

Adicionalmente, las HSC adecuadas para su uso con los métodos de la presente divulgación pueden obtenerse mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, las HSC pueden encontrarse en la médula ósea de un donante, que incluye fémures, cadera, costillas, esternón y otros huesos. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para extraer o recoger células de médula ósea. En un ejemplo no limitante, las HSC pueden obtenerse directamente de la cavidad medular de la cadera usando una aguja y una jeringa para aspirar células de la cavidad medular. Se puede obtener médula ósea rica de la cadera realizando múltiples aspiraciones pequeñas.

Como alternativa, las HSC adecuadas pueden obtenerse a partir de células de sangre periférica que se encuentran en la sangre de un donante, opcionalmente después del tratamiento previo con citocinas, tales como G-CSF (factores estimulantes de colonias de granulocitos), que inducen la liberación de las HSC desde el compartimento de la médula ósea del donante. Las HSC también pueden obtenerse a partir de sangre periférica que se haya sometido a un procedimiento de aféresis para enriquecer en HSC. Puede usarse cualquier procedimiento de aféresis conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, el procedimiento de aféresis es un procedimiento de leucoféresis.

Adicionalmente, las HSC adecuadas pueden obtenerse de sangre de cordón umbilical, placenta y sangre periférica movilizada. Para fines experimentales, el hígado fetal, el bazo fetal y la AGM (aorta-gónada-mesonefronas) de animales también son fuentes útiles de HSC. Adicionalmente, las HSC pueden obtenerse de una fuente que obtuvo

HSC de la médula ósea, sangre periférica, cordón umbilical o tejido fetal de un donante.

En algunas realizaciones, las HSC se obtienen de un cordón umbilical o una placenta humanos. Otra fuente de HSC que puede usarse es el desarrollo de tejidos productores de sangre de animales fetales. En los seres humanos, las HSC pueden encontrarse en la sangre circulante de un feto humano en aproximadamente 12 a 18 semanas. En algunas realizaciones, las HSC humanas se obtienen de cualquier fuente, por ejemplo, la médula ósea, el cordón umbilical, la sangre periférica o el tejido sanguíneo fetal, de donantes de tipo A+, A-, B+, B-, O+, O-, AB+ y AB. En otras realizaciones, las HSC humanas se obtienen de cualquier fuente, por ejemplo, la médula ósea, el cordón umbilical, la sangre periférica o el tejido sanguíneo fetal, de donantes universales o de donantes que tienen un tipo sanguíneo raro. Los tipos sanguíneos raros son conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, Oh, CDE/CDE, CdE/CdE, C^wD-/C^wD-, -D/-D-, Rh_{null}, Rh:-51, LW(a-b+), LW(a-b-), S-s-U-, S-s-U(+), pp, Pk, Lu(a+b-), Lu(a-b-), Kp(a+b-), Kp(a-b-), Js(a+b-), Ko, K:-11, Fy(a-b-), Jk(a-b-), Di(b-), I-, Yt(a-), Sc:-1, Co(a-), Co(a-b-), Do(a-), Vel-, Ge-, Lan-, Lan(+), Gy(a-), Hy-, At(a-), Jr(a-), In(b-), Tc(a-), Cr(a-), Er(a-), Ok(a-), JMH- y En(a-).

En otras realizaciones, las HSC humanas se obtienen de cualquier fuente, por ejemplo, la médula ósea, el cordón umbilical, la sangre periférica o el tejido sanguíneo fetal, de donantes que tienen un trastorno autoinmunitario, deficiencia inmunitaria o cualquier otra enfermedad o trastorno que se beneficie de un trasplante de HSC y/o transfusión de sangre. Dichos donantes también pueden ser los receptores. De forma ventajosa, las HSC obtenidas de dicho donante pueden usarse para terapia personalizada con HSC y/o sangre.

En un ejemplo no limitante, las HSC humanas pueden obtenerse anestesiando al donante de células madre, punzando la cresta ilíaca superior posterior con una aguja y realizando una aspiración de células de médula ósea con una jeringa. En otro ejemplo no limitante, las HSC pueden obtenerse de la sangre periférica de un donante, donde unos pocos días antes de recolectar las células madre de la sangre periférica, se inyecta el donante con G-CSF con el fin de movilizar las células madre a la sangre periférica.

En consecuencia, en algunas realizaciones, las HSC se obtienen de un donante autólogo, es decir, el donante también será el receptor de las HSC y/o los glóbulos rojos derivados de dichas HSC. Cualquier método conocido en la técnica y que se describa en el presente documento puede usarse para obtener HSC del donante autólogo. Las HSC y/o cualquier producto terapéutico derivado o producido a partir de las mismas, tales como los glóbulos rojos, después se trasplantan, se administran o se transfunden de vuelta al donante original. De forma similar, las HSC pueden obtenerse de un donante alogéneo, tal como un hermano, padre u otro familiar de un sujeto que necesite un trasplante de HSC y/o una transfusión de sangre. En un ejemplo no limitante, las HSC alogénas se obtienen mediante la recogida de HSC de fuentes compatibles de diferentes grupos sanguíneos o complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o antígeno leucocitario humano (HLA). El trasplante autólogo y/o alogéneo de HSC y/o la transfusión de sangre pueden ocurrir en cualquier momento después de la donación, tal como días más tarde, meses más tarde o incluso años más tarde. La donación autóloga puede ser particularmente útil en los casos en los que el sujeto que necesita HSC y/o trasplante y/o transfusión de sangre tenga una reacción negativa, perjudicial o tóxica al trasplante y/o transfusión de HSC y/o sangre de cualquier otro donante, incluyendo donantes alogénos y/o universales. Los ejemplos de pacientes que pueden beneficiarse de una donación autóloga y/o alogénea son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, aquellos que padecen un trastorno autoinmunitario, enfermedad o trastorno de la sangre, enfermedad o trastorno inmunitario u otras enfermedades o afecciones relacionadas.

Las células obtenidas de, por ejemplo, médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical, generalmente se procesan después de la extracción o recogida. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para procesar células extraídas o recogidas. Los ejemplos de etapas de procesamiento incluyen, sin limitación, filtración, centrifugación, detección de hematopatologías, detección de infecciones víricas y/o microbianas, agotamiento de eritrocitos, agotamiento de linfocitos T para reducir la incidencia de la enfermedad de injerto contra hospedador en receptores de trasplantes alogénos de células madre, reducción de volumen, separación celular, resuspensión de células en medio de cultivo o un tampón adecuado para el procesamiento posterior, separación de células madre de células no madre (por ejemplo, enriquecimiento de células madre), expansión de células madre *ex vivo* o *in vitro* con factores de crecimiento, citocinas y/u hormonas y crioconservación.

Puede usarse cualquier método adecuado para el enriquecimiento de células madre conocido en la técnica. Los ejemplos de métodos de enriquecimiento de células madre incluyen, sin limitación, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y clasificación de células activadas magnéticamente (MACS).

En consecuencia, en determinadas realizaciones, las HSC adecuadas para su uso en los métodos de la presente divulgación son HSC humanas.

Las HSC obtenidas de un donante pueden identificarse y/o enriquecerse mediante cualquier método adecuado de identificación y enriquecimiento de células madre conocido en la técnica, tal como utilizando determinados marcadores fenotípicos o genotípicos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la identificación de HSC incluye el uso de marcadores de superficie celular asociados a HSC o específicamente asociados a células del sistema diferenciadas terminalmente. Los marcadores de superficie adecuados pueden incluir, sin limitación, uno o más de entre c-kit, Sca-1, CD4, CD34, CD38, Thyl, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD43, CD45, CD59, CD90, CD105, CD133,

CD135, ABCG2, NK1.1, B220, Ter-119, Flk-2, CD34, CD45, CD59, CD90, CD105, CD133, ABCG2, NK1.1, B220, Ter-119, Flk-2, CD34, CD45, CD59, CD90, CD105, CD133, ABCG2, NK1.1, B220, Ter-119 y Gr-1 se conjugan con perlas magnéticas. Las células que expresan CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, Ter-119 o Gr-1 se conservan en la columna equipada para atrapar perlas magnéticas y células unidas a anticuerpos conjugados con perlas magnéticas. Las células que no son capturadas por la columna MACS se someten a análisis por FACS. Los anticuerpos contra c-kit, Sca-1, CD34, CD38, Thyl, se conjugan con materiales fluorescentes conocidos en la técnica. Las células que son CD34+, CD38^{low/-}, c-kit^{-low}, Thy1+ se separan del resto de la muestra en virtud de los tipos de anticuerpos fluorescentes asociados a las células. Estas células se proporcionan como HSC de largo plazo humanas adecuadas para su uso con cualquiera de los métodos de la presente divulgación.

Adicionalmente, las HSC obtenidas de un donante pueden separarse de las células no madre mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y clasificación de células activadas magnéticamente (MACS).

En un ejemplo no limitante, se incuban células de sangre periférica humana con anticuerpos que reconocen c-kit, Sca-1, CD34, CD38, Thyl, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD43, CD45, CD59, CD90, CD105, CD133, ABCG2, NK1.1, B220, Ter-119, Flk-2, CD34, CD45, CD59, CD90, CD105, CD133, ABCG2, NK1.1, B220, Ter-119 y Gr-1 se conjugan con perlas magnéticas. Las células que expresan CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, Ter-119 o Gr-1 se conservan en la columna equipada para atrapar perlas magnéticas y células unidas a anticuerpos conjugados con perlas magnéticas. Las células que no son capturadas por la columna MACS se someten a análisis por FACS. Los anticuerpos contra c-kit, Sca-1, CD34, CD38, Thyl, se conjugan con materiales fluorescentes conocidos en la técnica. Las células que son CD34+, CD38^{low/-}, c-kit^{-low}, Thy1+ se separan del resto de la muestra en virtud de los tipos de anticuerpos fluorescentes asociados a las células. Estas células se proporcionan como HSC de largo plazo humanas adecuadas para su uso con cualquiera de los métodos de la presente divulgación.

En otro ejemplo no limitante, las células obtenidas de un sujeto se marcan con el mismo conjunto de anticuerpos conjugados con perlas magnéticas que se ha descrito anteriormente (anticuerpos contra uno o más de entre CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, Ter-119 o Gr-1) y anticuerpos CD150, CD244 y/o CD48 conjugados con fluorescencia. Después de retirar las células capturadas por los anticuerpos conjugados con perlas magnéticas de la muestra, la muestra se analiza mediante FACS y las células CD150+, CD244+ y CD48+ se conservan como HSC de largo plazo.

En algunas realizaciones, las HSC utilizadas en los métodos de la presente divulgación contienen uno o más de los marcadores: c-kit+, Sca-1+, CD34^{low/-}, CD38+, Thy1^{+/low}, CD34+, CD38^{low/-}, c-kit^{-low} y/o Thy1+. En algunas realizaciones, las HSC utilizadas en los métodos de la presente divulgación carecen de uno o más de los marcadores: CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, Ter-119 y/o Gr-1. En determinadas realizaciones, las HSC utilizadas en los métodos de la presente divulgación son de tipo A+, A-, B+, B-, O+, O-, AB+ o AB-.

Como alternativa, las HSC adecuadas pueden obtenerse de una fuente no humana. Las HSC no humanas adecuadas pueden aislarse de fémures, cadera, costillas, esternón y otros huesos de un animal no humano, incluyendo, sin limitación, animales de laboratorio/investigación, roedores, mascotas, ganado, animales de granja, animales de trabajo, animales de carga, especies raras o en peligro de extinción, animales de carreras y animales de zoológico. Otros ejemplos de animales no humanos adecuados incluyen, sin limitación, monos, primates, ratones, ratas, cobayas, hámsteres, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras y pollos. Por ejemplo, las HSC pueden obtenerse a partir de células de médula ósea murinas, mediante la incubación de células de médula ósea con anticuerpos que reconocen moléculas de la superficie celular, tales como uno o más de entre c-kit, Sca-1, CD34, CD38, Thyl, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD43, CD45, CD59, CD90, CD105, CD133, ABCG2, NK1.1, B220, Ter-119, Flk-2, CD34, CD45, CD59, CD90, CD105, CD133, ABCG2, NK1.1, B220, Ter-119 y Gr-1 se conjugan con perlas magnéticas. En el equipo de MACS, las células que albergan CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, Ter-119 o Gr-1 en su superficie se conservan en la columna equipada para atrapar perlas magnéticas y las células se unen a anticuerpos conjugados con perlas magnéticas. Las células que no son capturadas por la columna de MACS se someten a análisis por FACS. Para el análisis por FACS, los anticuerpos para moléculas de superficie tales como c-kit, Sca-1, CD34, CD38, Thyl, se conjugan con materiales fluorescentes. Las células que son c-kit+, Sca-1+, CD34^{low/-}, CD38+, Thy1^{+/low} se separan del resto de la muestra en virtud de los tipos de anticuerpos fluorescentes asociados a las células. Estas células se proporcionan como HSC de largo plazo murinas adecuadas para su uso con cualquiera de los métodos de la presente divulgación. En otras realizaciones, se usan diferentes conjuntos de marcadores para separar las HSC de largo plazo murinas de las células de médula ósea, sangre de cordón umbilical, tejido fetal y sangre periférica.

En algunas realizaciones, la obtención de HSC a partir de médula ósea incluye inyectar primero el donante de HSC, tal como un ratón u otro animal no humano, con 5-fluorouracilo (5-FU) para inducir la proliferación de las HSC con el fin de enriquecer en HSC la médula ósea del donante.

Por otra parte, las HSC adecuadas para su uso con cualquiera de los métodos de la presente divulgación, ya sea obtenidas o presentes en sangre de cordón umbilical, médula ósea, sangre periférica u otra fuente, pueden cultivarse o expandirse en cualquier medio adecuado, disponible en el mercado o definido por el cliente (por ejemplo, Hartshorn et al., *Cell Technology for Cell Products*, páginas 221-224, R. Smith, Editor; Springer Netherlands, 2007). Por ejemplo, el medio sin suero puede usar albúmina y/o transferrina, que se ha demostrado que son útiles para el crecimiento y la expansión de células CD34+ en medio sin suero. Además, pueden incluirse citocinas, tales como el ligando de Flt-3, el factor de células madre (SCF) y la trombopoyetina (TPO), entre otros. Las HSC también pueden cultivarse en recipientes tales como biorreactores (por ejemplo, Liu et al., *Journal of Biotechnology* 124:592-601,

2006). Un medio adecuado para la expansión *ex vivo* de HSC también puede contener células de soporte de HSC, tales como células estromales (por ejemplo, células estromales linforeticulares), que pueden derivar, por ejemplo, de la desagregación de tejido linfoide y que se ha demostrado que soportan el mantenimiento, el crecimiento y la diferenciación *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de las HSC, así como su progenie.

El crecimiento o expansión de HSC puede medirse *in vitro* o *in vivo* de acuerdo con técnicas habituales conocidas en la técnica. Por ejemplo, el documento WO 2008/073748, describe métodos para medir la expansión *in vivo* e *in vitro* de las HSC y para distinguir entre el crecimiento/expansión de las HSC y el crecimiento/expansión de otras células en una población potencialmente heterogénea (por ejemplo, médula ósea), incluyendo por ejemplo, células progenitoras intermedias.

Estirpes de células HSC

En otras realizaciones, las HSC adecuadas para su uso en cualquiera de los métodos de la presente divulgación también pueden derivar de una estirpe de células HSC. Las estirpes de células HSC adecuadas incluyen cualquier estirpe de células madre hematopoyéticas cultivadas conocida en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen las estirpes de células madre inmortalizadas de forma condicional de largo plazo que se describen en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º US 2007/0116691 y US 2010/0047217.

En determinadas realizaciones, las HSC adecuadas para su uso en los métodos de la presente divulgación se immortalizan de forma condicional antes de diferenciarse en glóbulos rojos. En algunas realizaciones, las HSC adecuadas para su uso en los métodos de la presente divulgación también pueden modificarse para incluir una o más proteínas de interés antes de diferenciarse en glóbulos rojos. En algunas realizaciones, immortalización condicional y/o la inclusión de una o más proteínas de interés pueden conseguirse a través de cualquier método conocido en la técnica y que se describa en el presente documento, tal como uno o más de entre un enfoque transgénico, un enfoque de transducción con proteínas o un enfoque que potencia la expresión de proteínas endógenas.

Proteínas útiles para la immortalización de forma condicional de las HSC

En algunas realizaciones, las HSC utilizadas en los métodos de la presente divulgación para la producción de glóbulos rojos se immortalizaron de forma condicional poniendo en contacto las HSC con una composición que contiene una o más proteínas recombinantes que promuevan la supervivencia celular y/o la proliferación celular y, opcionalmente, una o más proteínas exógenas que inhiban la apoptosis. En algunas realizaciones, la una o más proteínas recombinantes que promueven la supervivencia y/o la proliferación celular también inhiben opcionalmente la apoptosis. La una o más proteínas recombinantes que promueven la supervivencia y/o la proliferación celular son un polipéptido MYC, un fragmento biológicamente activo del mismo o un homólogo del mismo, de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la una o más proteínas recombinantes que promueven la supervivencia y/o la proliferación celular incluyen adicionalmente un dominio de transducción de proteínas (PTD). En algunas realizaciones, la una o más proteínas recombinantes que promueven la supervivencia y/o la proliferación celular son una proteína de fusión PTD-MYC. En algunas realizaciones, la proteína exógena que inhibe la apoptosis es una proteína que incluye un dominio de homología Bcl-2. En algunas realizaciones, la una o más proteínas exógenas que inhiben la apoptosis incluyen adicionalmente un dominio de transducción de proteínas (PDT). En algunas realizaciones, las una o más proteínas exógenas que inhiben la apoptosis son una proteína de fusión PTD-Bcl-2.

Las proteínas de fusión PTD-MYC y PTD-Bcl-2 de la presente divulgación permiten un aumento en la actividad de MYC y Bcl-2 en las HSC mediante la adición exógena de MYC y Bcl-2, sin la necesidad de sobreexpresar los genes endógenos que codifican MYC y Bcl-2 o expresar de forma recombinante MYC y Bcl-2 mediante manipulación genética. Sin embargo, la manipulación de las HSC para inducir la sobreexpresión de dichos genes endógenos, opcionalmente, a través de la creación de HSC transgénicas, así como otras técnicas para crear células madre immortalizadas de forma condicional, se contempla expresamente en el presente documento.

En algunas realizaciones, las HSC que se han de diferenciar en glóbulos rojos (y/o los glóbulos rojos) se transducen adicionalmente con una o más proteínas de interés desveladas. En algunas realizaciones, estas una o más proteínas de interés son distintas de Myc o Bcl-2. En algunas realizaciones, las proteínas de interés son proteínas de fusión que incluyen un dominio PTD de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el dominio PTD es TAT.

Enfoque transgénico

También se desvelan HSC immortalizadas de forma condicional para su uso en los métodos de la presente invención establecidos usando cualquier enfoque transgénico conocido en la técnica (por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º US 2007/0116691 y US 2010/0047217. Por ejemplo, las HSC pueden immortalizarse obteniendo una población expandida de HSC, transfectando (transduciendo) las HSC con un vector que codifique una proteína recombinante que promueva la supervivencia y/o la proliferación celular que sea regulable (por ejemplo, inducible y/o controlable), transfectando (transduciendo) las HSC con un vector que codifique una proteína recombinante que inhiba la apoptosis y expandiendo las HSC transfectadas en presencia de una

combinación de factores de crecimiento de células madre en condiciones en las que se induzca y/o se active la proteína recombinante que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular.

La proteína recombinante que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular es regulable (por ejemplo, inducible o controlable), por lo que la proteína recombinante puede activarse y desactivarse (es decir, encenderse o apagarse) según se desee para mantener las HSC en un estado inmortalizado o para permitir que se diferencie en un tipo de célula deseada, tal como un glóbulo rojo. La proteína recombinante que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular es MYC. De forma similar, la proteína recombinante que inhibe la apoptosis puede ser cualquier proteína de la presente divulgación que inhiba la apoptosis. En determinadas realizaciones preferidas, la proteína que inhibe la apoptosis es Bcl-2.

En algunas realizaciones, la proteína recombinante que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular y/o la proteína recombinante que inhibe la apoptosis se ha modificado de manera que la actividad es inducible o reprimible. Por ejemplo, las proteínas recombinantes pueden contener adicionalmente un receptor inducible. En determinadas realizaciones, las proteínas recombinantes contienen un receptor de estrógeno (ER). En determinadas realizaciones, la proteína recombinante que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular y que contiene un receptor de estrógeno es un polipéptido MYC-ER. En determinadas realizaciones, la proteína recombinante que inhibe la apoptosis y que contiene un receptor de estrógeno es un polipéptido Bcl-2-ER. En determinadas realizaciones, las proteínas recombinantes que contienen un receptor de estrógeno son inducidas por 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT). Como alternativa, las proteínas recombinantes pueden contener un receptor de glucocorticoides (GR), por ejemplo, un receptor de glucocorticoides que sea sensible a la mifepristona (MIFEPREX). En determinadas realizaciones, la proteína recombinante que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular y que contiene un receptor de glucocorticoides es un polipéptido MYC-GR. En determinadas realizaciones, la proteína recombinante que inhibe la apoptosis y que contiene un receptor de glucocorticoides es un polipéptido Bcl-2-GR.

Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para obtener una población expandida de HSC conocido en la técnica. Por ejemplo, las HSC pueden cultivarse con uno o más factores de crecimiento que promuevan la proliferación celular y/o la división celular.

Preferentemente, los vectores son un vector integrador, que tiene la capacidad de integrarse en el genoma de una célula (por ejemplo, un vector retroviral). Las HSC pueden transfectarse y/o transducirse con los vectores usando cualquier método adecuado de transfección de células y, en particular, de células de mamíferos, incluso usando combinaciones de técnicas. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen sin limitación, vectores retrovirales, vectores de lentivirus, vectores de parvovirus, vectores de virus de la vacuna, vectores de coronavirus, vectores de calicivirus, vectores del virus del papiloma, vectores de flavivirus, vectores de ortomixovirus, vectores de tigavirus, vectores de picornavirus, vectores adenovirales y vectores de herpesvirus modificados y atenuados. Cualquier vector vírico de este tipo puede modificarse adicionalmente con moléculas específicas expresadas en la superficie que se dirigen a las HSC, tales como el SCF unido a la membrana u otros ligandos del factor de crecimiento específico de células madre. Otros métodos de transfección de células de mamífero incluyen, pero sin limitación, la electroporación directa de vectores de expresión de mamíferos, tales como mediante el uso de la tecnología NUCLEOFECTOR™ (AMAXA Biosystems). Esta tecnología es un método de transferencia de genes no vírico altamente eficiente para la mayoría de las células primarias y para estirpes celulares difíciles de transfectar, lo que es una mejora en el método de electroporación conocido desde hace mucho tiempo, basado en el uso de combinaciones específicas de tipo celular de corriente eléctrica y soluciones para transferir macromoléculas polianiónicas directamente al núcleo. Adicionalmente, los métodos adecuados de transfección pueden incluir cualquier método bacteriano, de levadura u otro método artificial de entrega de genes que se conozcan en la técnica.

En algunas realizaciones, una o más de las proteínas de interés se incorporan en una o más HSC adecuadas para su uso en los métodos de la presente divulgación (por ejemplo, estirpes celulares primarias o estirpes celulares inmortalizadas de forma condicional) usando enfoques similares a los descritos para la producción de HSC inmortalizadas de forma condicional.

Potenciación de la expresión endógena

También se desvelan HSC inmortalizadas de forma condicional para su uso en los métodos de la presente divulgación que pueden establecerse mediante la potenciación de la expresión de proteínas endógenas que promueven la supervivencia y/o la proliferación celular, incluyendo, sin limitación, cualquier proteína de la presente divulgación que promueva la supervivencia y/o la proliferación celular. Por ejemplo, puede potenciarse la expresión de un oncopéptido endógeno de la presente divulgación, polipéptido MYC, polipéptido ICN-1, homólogo de los mismos y/o análogo de los mismos. Adicionalmente, las HSC inmortalizadas de forma condicional para su uso en los métodos de la presente divulgación pueden establecerse potenciando también la expresión de proteínas endógenas que inhiban la apoptosis, incluyendo, sin limitación, cualquier proteína de la presente divulgación que inhiba la apoptosis. Por ejemplo, puede potenciarse la expresión de una proteína endógena de la presente divulgación que contiene uno o más dominios de homología Bcl-2 de la presente divulgación, polipéptido Bcl-2, polipéptido Bcl-x, polipéptido Bcl-XL, polipéptido Mcl-1, polipéptido CED-9, polipéptido de proteína A1 relacionado con Bcl-2, polipéptido Bfl-1, polipéptido Bcl-w, homólogo de los mismos y/o análogo de los mismos.

También se desvela que la expresión de una o más de las proteínas de interés aumenta en una o más de las HSC adecuadas para su uso en los métodos de la presente divulgación (por ejemplo, estirpes celulares primarias o estirpes celulares inmortalizadas de forma condicional) usando enfoques similares a los descritos para la producción potenciada de, por ejemplo, MYC y/o Bcl-2.

Enfoque de transducción de proteínas

En algunas realizaciones, las HSC obtenidas y/o producidas mediante cualquier método desvelado en el presente documento pueden tratarse con un producto génico que promueva la supervivencia y/o la proliferación celular, incluyendo, pero sin limitación, cualquier proteína recombinante de la presente divulgación que promueva la supervivencia y/o la proliferación celular (por ejemplo, oncopéptido, MYC, homólogos de los mismos, análogos de los mismos y fragmentos biológicamente activos de los mismos) y/o con una proteína de la presente divulgación que inhiba la apoptosis de las HSC (por ejemplo, proteínas que contengan uno o más dominios de homología Bcl-2, Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Mcl-1, CED-9, proteína A1 relacionada con Bcl-2, Bfl-1, Bcl-w, homólogos de las mismas, análogos de las mismas y fragmentos biológicamente activos de las mismas) (por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º US 2007/0116691). En algunas realizaciones, la proteína que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular es una proteína de fusión que contiene un PTD. En algunas realizaciones, la proteína que inhibe la apoptosis es una proteína de fusión que contiene un PTD. En algunas realizaciones, las HSC obtenidas y/o producidas mediante cualquier método que se desvela en el presente documento pueden tratarse con uno o más compuestos (opcionalmente una proteína exógena) que permitan la regulación positiva transitoria de al menos una función de una proteína recombinante de la presente divulgación que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular en una célula. En algunas realizaciones, la proteína recombinante que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular es una proteína de fusión PTD-MYC. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión PTD-MYC es una proteína de fusión TAT-MYC.

En algunas realizaciones, las HSC obtenidas mediante cualquier método que se desvela en el presente documento pueden tratarse con uno o más compuestos (opcionalmente una proteína exógena) que permitan la regulación positiva transitoria de al menos una función de una proteína recombinante de la presente divulgación que inhibe la apoptosis en una célula. En algunas realizaciones, la proteína exógena que inhibe la apoptosis de las HSC es una proteína de fusión PTD-Bcl-2. En algunas realizaciones, la proteína de fusión PTD-Bcl-2 es una proteína de fusión TAT-Bcl-2.

En algunas realizaciones, una o más de las proteínas de interés se incorporan en una o más HSC adecuadas para su uso en los métodos de la presente divulgación (por ejemplo, estirpes celulares primarias o estirpes celulares inmortalizadas de forma condicional) usando enfoques similares a los que se describen para la producción de HSC inmortalizadas de forma condicional usando proteínas de fusión de PTD.

En otras realizaciones, las HSC adecuadas para su uso en cualquiera de los métodos de la presente divulgación se ponen en contacto con una composición que contiene una proteína de fusión que contiene una proteína de la presente divulgación que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular fusionada con un PTD (por ejemplo, una proteína de fusión PTD-MYC). En realizaciones adicionales, la composición contiene adicionalmente una proteína de fusión que contiene una proteína de la presente divulgación que inhibe la apoptosis fusionada con un PTD (por ejemplo, una proteína de fusión PTD-Bcl-2). En algunas realizaciones, las HSC se ponen en contacto con una composición que contiene una proteína de fusión PTD-MYC y una segunda composición que contiene una proteína de fusión PTD-Bcl-2.

En otras realizaciones, las HSC adecuadas para su uso en cualquiera de los métodos de la presente divulgación se expanden en presencia de una proteína de fusión que contiene una proteína de la presente divulgación que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular fusionada a un PTD (por ejemplo, una proteína de fusión TAT-MYC) antes de diferenciarse en glóbulos rojos. En realizaciones adicionales, las HSC también se expanden en presencia de una proteína de fusión que contiene una proteína de la presente divulgación que inhibe la apoptosis fusionada con un PTD (por ejemplo, una proteína de fusión TAT-Bcl-2). Por ejemplo, las HSC pueden expandirse cultivando las células en presencia de una proteína de fusión PTD-MYC y, opcionalmente, en presencia de una proteína de fusión PTD-Bcl-2 y citocinas y/o factores de crecimiento adicionales, durante al menos un día, al menos dos días, al menos tres días, al menos cuatro días, al menos cinco días, al menos seis días, al menos siete días, al menos ocho días, al menos nueve días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días, al menos 14 días o más.

En consecuencia, las HSC adecuadas para su uso en cualquiera de los métodos de la presente divulgación pueden obtenerse a partir de células madre embrionarias (células ES), células madre fetales, células madre pluripotentes inducidas (células iPS), médula ósea, de un procedimiento de aféresis, de células de sangre periférica, de células de sangre periférica que han experimentado leucaféresis, de sangre de cordón umbilical, de líquido amniótico, de placenta, de células HSC cultivadas, de una estirpe de células HSC inmortalizada o de una estirpe de células HSC inmortalizada de forma condicional.

Producción de glóbulos rojos

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una población de glóbulos rojos maduros a partir de HSC, comprendiendo el método el cultivo de las HSC en un medio de cultivo que comprende EPO y una o más proteínas recombinantes que promueven la supervivencia y la proliferación celular en condiciones que inducen la diferenciación de las HSC a glóbulos rojos maduros, produciendo de este modo la población de glóbulos rojos maduros, en la que la primera proteína recombinante comprende un polipéptido MYC o un fragmento biológicamente activo del mismo. La proteína recombinante puede proporcionarse exógenamente o proporcionarse a través de la manipulación transgénica de las HSC. Como alternativa, la proteína que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular puede ser una proteína endógena que se induce para que se sobreexpresa. En algunas realizaciones, la proteína recombinante, inducida y/o exógena es un oncopéptido de la presente divulgación, MYC, homólogos del mismo, análogos del mismo y/o fragmentos biológicamente activos del mismo. Opcionalmente, la proteína que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular puede formar parte de una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la proteína de fusión incluye uno o más de entre un PTD, un marcador de epítipo o un marcador de purificación de proteínas. En algunas realizaciones, las HSC se modifican para incluir una o más proteínas de interés antes de diferenciarse en glóbulos rojos. En algunas realizaciones, immortalización condicional y/o la inclusión de una o más proteínas de interés pueden conseguirse a través de cualquier método conocido en la técnica y que se describa en el presente documento, tal como uno o más de entre un enfoque transgénico, un enfoque de transducción con proteínas o un enfoque que potencia la expresión de proteínas endógenas.

En algunas realizaciones de los métodos de la presente divulgación, una composición que contiene una proteína de fusión que contiene una proteína de la presente divulgación que promueve la supervivencia y/o la proliferación celular fusionada a un PTD (por ejemplo, una proteína de fusión PTD-MYC) se administra durante la etapa de cultivo de las HSC immortalizadas de forma condicional en presencia de EPO y, opcionalmente, IL-3 y otros componentes. En algunas realizaciones, las HSC se cultivan en presencia o en ausencia de células alimentadoras y/o suero. En determinadas realizaciones preferidas, las HSC se cultivan en ausencia de células alimentadoras y/o suero.

En algunas realizaciones, las HSC se cultivan en presencia de al menos 0,5 µ/ml, al menos 0,6 µ/ml, al menos 0,7 µ/ml, al menos 0,8 µ/ml, al menos 0,9 µ/ml, al menos 1 µ/ml, al menos 2 µ/ml, al menos 3 µ/ml, al menos 4 µ/ml, al menos 5 µ/ml, al menos 6 µ/ml, al menos 7 µ/ml, al menos 8 µ/ml, al menos 9 µ/ml, al menos 10 µ/ml, al menos 15 µ/ml, al menos 20 µ/ml, al menos 25 µ/ml, al menos 30 µ/ml, al menos 35 µ/ml, al menos 40 µ/ml, al menos 45 µ/ml, al menos 50 µ/ml, al menos 55 µ/ml, al menos 60 µ/ml, al menos 65 µ/ml, al menos 70 µ/ml, al menos 75 µ/ml, al menos 80 µ/ml, al menos 85 µ/ml, al menos 90 µ/ml, al menos 95 µ/ml o al menos 100 µ/ml de proteína recombinante que promueve la supervivencia y/o proliferación celular (por ejemplo, MYC, homólogos de la misma, análogos de la misma y/o fragmentos biológicamente activos de la misma).

En algunas realizaciones, las HSC se cultivan en presencia de al menos 0,5 µ/ml, al menos 0,6 µ/ml, al menos 0,7 µ/ml, al menos 0,8 µ/ml, al menos 0,9 µ/ml, al menos 1 µ/ml, al menos 2 µ/ml, al menos 3 µ/ml, al menos 4 µ/ml, al menos 5 µ/ml, al menos 6 µ/ml, al menos 7 µ/ml, al menos 8 µ/ml, al menos 9 µ/ml, al menos 10 µ/ml, al menos 15 µ/ml, al menos 20 µ/ml, al menos 25 µ/ml, al menos 30 µ/ml, al menos 35 µ/ml, al menos 40 µ/ml, al menos 45 µ/ml, al menos 50 µ/ml, al menos 55 µ/ml, al menos 60 µ/ml, al menos 65 µ/ml, al menos 70 µ/ml, al menos 75 µ/ml, al menos 80 µ/ml, al menos 85 µ/ml, al menos 90 µ/ml, al menos 95 µ/ml o al menos 100 µ/ml de MYC.

En determinadas realizaciones, las HSC, opcionalmente HSC immortalizadas de forma condicional, se cultivan adicionalmente en presencia de al menos 0,5 µ/ml, al menos 0,6 µ/ml, al menos 0,7 µ/ml, al menos 0,8 µ/ml, al menos 0,9 µ/ml, al menos 1 µ/ml, al menos 2 µ/ml, al menos 3 µ/ml, al menos 4 µ/ml, al menos 5 µ/ml, al menos 6 µ/ml, al menos 7 µ/ml, al menos 8 µ/ml, al menos 9 µ/ml, al menos 10 µ/ml, al menos 15 µ/ml, al menos 20 µ/ml, al menos 25 µ/ml, al menos 30 µ/ml, al menos 35 µ/ml, al menos 40 µ/ml, al menos 45 µ/ml, al menos 50 µ/ml, al menos 55 µ/ml, al menos 60 µ/ml, al menos 65 µ/ml, al menos 70 µ/ml, al menos 75 µ/ml, al menos 80 µ/ml, al menos 85 µ/ml, al menos 90 µ/ml, al menos 95 µ/ml o al menos 100 µ/ml de ICN-1.

En determinadas realizaciones, las HSC, opcionalmente HSC immortalizadas de forma condicional, se cultivan en presencia de al menos 1,0 unidad/ml de EPO, al menos 1,2 unidades/ml de EPO, al menos 1,4 unidades/ml de EPO, al menos 1,6 unidades/ml de EPO, al menos 1,8 unidades/ml de EPO, al menos 2,0 unidades/ml de EPO, al menos 2,2 unidades/ml de EPO, al menos 2,4 unidades/ml de EPO, al menos 2,6 unidades/ml de EPO, al menos 2,8 unidades/ml de EPO, al menos 3,0 unidades/ml de EPO, al menos 3,2 unidades/ml de EPO, al menos 3,4 unidades/ml de EPO, al menos 3,6 unidades/ml de EPO, al menos 3,8 unidades/ml de EPO, al menos 4,0 unidades/ml de EPO o más EPO.

En determinadas realizaciones, las HSC, opcionalmente HSC immortalizadas de forma condicional, se cultivan adicionalmente en presencia de al menos 1 ng/ml de IL-3, al menos 2 ng/ml de IL-3, al menos 3 ng/ml de IL-3, al menos 4 ng/ml de IL-3, al menos 5 ng/ml de IL-3, al menos 6 ng/ml de IL-3, al menos 7 ng/ml de IL-3, al menos 8 ng/ml de IL-3, al menos 9 ng/ml de IL-3, al menos 10 ng/ml de IL-3, al menos 11 ng/ml de IL-3, al menos 12 ng/ml de IL-3, al menos 13 ng/ml de IL-3, al menos 14 ng/ml de IL-3, al menos 15 ng/ml de IL-3, al menos 16 ng/ml de IL-3, al menos 17 ng/ml de IL-3, al menos 18 ng/ml de IL-3, al menos 19 ng/ml de IL-3, al menos 20 ng/ml de IL-3, al menos 21 ng/ml de IL-3, al menos 22 ng/ml de IL-3, al menos 23 ng/ml de IL-3, al menos 24 ng/ml de IL-3, al menos

25 ng/ml de IL-3 o más IL-3.

En determinadas realizaciones, las HSC, opcionalmente HSC inmortalizadas de forma condicional, se cultivan en presencia de al menos 1 ng/ml de IL-3, al menos 2 ng/ml de IL-3, al menos 3 ng/ml de IL-3, al menos 4 ng/ml de IL-3, al menos 5 ng/ml de IL-3, al menos 6 ng/ml de IL-3, al menos 7 ng/ml de IL-3, al menos 8 ng/ml de IL-3, al menos 9 ng/ml de IL-3, al menos 10 ng/ml de IL-3, al menos 11 ng/ml de IL-3, al menos 12 ng/ml de IL-3, al menos 13 ng/ml de IL-3, al menos 14 ng/ml de IL-3, al menos 15 ng/ml de IL-3, al menos 16 ng/ml de IL-3, al menos 17 ng/ml de IL-3, al menos 18 ng/ml de IL-3, al menos 19 ng/ml de IL-3, al menos 20 ng/ml de IL-3, al menos 21 ng/ml de IL-3, al menos 22 ng/ml de IL-3, al menos 23 ng/ml de IL-3, al menos 24 ng/ml de IL-3, al menos 25 ng/ml de IL-3 o más IL-3; y al menos 1,0 unidad/ml de EPO, al menos 1,2 unidades/ml de EPO, al menos 1,4 unidades/ml de EPO, al menos 1,6 unidades/ml de EPO, al menos 1,8 unidades/ml de EPO, al menos 2,0 unidades/ml de EPO, al menos 2,2 unidades/ml de EPO, al menos 2,4 unidades/ml de EPO, al menos 2,6 unidades/ml de EPO, al menos 2,8 unidades/ml de EPO, al menos 3,0 unidades/ml de EPO, al menos 3,2 unidades/ml de EPO, al menos 3,4 unidades/ml de EPO, al menos 3,6 unidades/ml de EPO, al menos 3,8 unidades/ml de EPO, al menos 4,0 unidades/ml de EPO o más EPO.

En realizaciones adicionales, las HSC, opcionalmente HSC inmortalizadas de forma condicional, se cultivan en presencia de EPO y, opcionalmente, IL-3, durante al menos un día, al menos dos días, al menos tres días, al menos cuatro días, al menos cinco días, al menos seis días, al menos siete días, al menos ocho días, al menos nueve días, al menos 10 días o más.

En realizaciones adicionales, las HSC, opcionalmente HSC inmortalizadas de forma condicional, se cultivan en presencia de aproximadamente 1-500 ng/ml de FLT-3, aproximadamente 1-500 ng/ml de SCF, aproximadamente 1-500 ng/ml de GM-CSF y/o aproximadamente 1-500 ng/ml de TPO. Las HSC, opcionalmente HSC inmortalizadas de forma condicional, pueden cultivarse adicionalmente en presencia de FLT-3, SCF, GM-CSF y/o TPO durante al menos un día, al menos dos días, al menos tres días, al menos cuatro días, al menos cinco días, al menos seis días, al menos siete días, al menos ocho días, al menos nueve días, al menos 10 días o más. Pueden añadirse FLT-3, SCF, GM-CSF y/o TPO a los medios de cultivo en cualquier momento durante el período de tiempo cuando las HSC se están diferenciando en glóbulos rojos maduros, y/o después de que se han producido los glóbulos rojos maduros.

En realizaciones adicionales, las HSC, opcionalmente HSC inmortalizadas de forma condicional, se cultivan adicionalmente en presencia de al menos 1 ng/ml de FLT-3, al menos 2 ng/ml de FLT-3, al menos 3 ng/ml de FLT-3, al menos 4 ng/ml de FLT-3, al menos 5 ng/ml de FLT-3, al menos 6 ng/ml de FLT-3, al menos 7 ng/ml de FLT-3, al menos 8 ng/ml de FLT-3, al menos 9 ng/ml de FLT-3, al menos 10 ng/ml de FLT-3, al menos 15 ng/ml de FLT-3, al menos 20 ng/ml de FLT-3, al menos 25 ng/ml de FLT-3, al menos 30 ng/ml de FLT-3, al menos 35 ng/ml de FLT-3, al menos 40 ng/ml de FLT-3, al menos 45 ng/ml de FLT-3, al menos 50 ng/ml de FLT-3, al menos 55 ng/ml de FLT-3, al menos 60 ng/ml de FLT-3, al menos 65 ng/ml de FLT-3, al menos 70 ng/ml de FLT-3, al menos 75 ng/ml de FLT-3, al menos 80 ng/ml de FLT-3, al menos 85 ng/ml de FLT-3, al menos 90 ng/ml de FLT-3, al menos 95 ng/ml de FLT-3, al menos 100 ng/ml de FLT-3, al menos 150 ng/ml de FLT-3, al menos 200 ng/ml de FLT-3, al menos 250 ng/ml de FLT-3, al menos 300 ng/ml de FLT-3, al menos 350 ng/ml de FLT-3, al menos 400 ng/ml de FLT-3, al menos 450 ng/ml de FLT-3, al menos 500 ng/ml de FLT-3 o más de FLT-3.

En realizaciones adicionales, las HSC, opcionalmente HSC inmortalizadas de forma condicional, se cultivan adicionalmente en presencia de al menos 1 ng/ml de SCF, al menos 2 ng/ml de SCF, al menos 3 ng/ml de SCF, al menos 4 ng/ml de SCF, al menos 5 ng/ml de SCF, al menos 6 ng/ml de SCF, al menos 7 ng/ml de SCF, al menos 8 ng/ml de SCF, al menos 9 ng/ml de SCF, al menos 10 ng/ml de SCF, al menos 15 ng/ml de SCF, al menos 20 ng/ml de SCF, al menos 25 ng/ml de SCF, al menos 30 ng/ml de SCF, al menos 35 ng/ml de SCF, al menos 40 ng/ml de SCF, al menos 45 ng/ml de SCF, al menos 50 ng/ml de SCF, al menos 55 ng/ml de SCF, al menos 60 ng/ml de SCF, al menos 65 ng/ml de SCF, al menos 70 ng/ml de SCF, al menos 75 ng/ml de SCF, al menos 80 ng/ml de SCF, al menos 85 ng/ml de SCF, al menos 90 ng/ml de SCF, al menos 95 ng/ml de SCF, al menos 100 ng/ml de SCF, al menos 150 ng/ml de SCF, al menos 200 ng/ml de SCF, al menos 250 ng/ml de SCF, al menos 300 ng/ml de SCF, al menos 350 ng/ml de SCF, al menos 400 ng/ml de SCF, al menos 450 ng/ml de SCF, y al menos 500 ng/ml de SCF o más de SCF.

En realizaciones adicionales, las HSC, opcionalmente HSC inmortalizadas de forma condicional, se cultivan adicionalmente en presencia de al menos 1 ng/ml de GM-CSF, al menos 2 ng/ml de GM-CSF, al menos 3 ng/ml de GM-CSF, al menos 4 ng/ml de GM-CSF, al menos 5 ng/ml de GM-CSF, al menos 6 ng/ml de GM-CSF, al menos 7 ng/ml de GM-CSF, al menos 8 ng/ml de GM-CSF, al menos 9 ng/ml de GM-CSF, al menos 10 ng/ml de GM-CSF, al menos 15 ng/ml de GM-CSF, al menos 20 ng/ml de GM-CSF, al menos 25 ng/ml de GM-CSF, al menos 30 ng/ml de GM-CSF, al menos 35 ng/ml de GM-CSF, al menos 40 ng/ml de GM-CSF, al menos 45 ng/ml de GM-CSF, al menos 50 ng/ml de GM-CSF, al menos 55 ng/ml de GM-CSF, al menos 60 ng/ml de GM-CSF, al menos 65 ng/ml de GM-CSF, al menos 70 ng/ml de GM-CSF, al menos 75 ng/ml de GM-CSF, al menos 80 ng/ml de GM-CSF, al menos 85 ng/ml de GM-CSF, al menos 90 ng/ml de GM-CSF, al menos 95 ng/ml de GM-CSF, al menos 100 ng/ml de GM-CSF, al menos 150 ng/ml de GM-CSF, al menos 200 ng/ml de GM-CSF, al menos 250 ng/ml de GM-CSF, al menos 300 ng/ml de GM-CSF, al menos 350 ng/ml de GM-CSF, al menos 400 ng/ml de GM-CSF, al menos 450 ng/ml de GM-CSF, al menos 500 ng/ml de GM-CSF o más de GM-CSF.

En realizaciones adicionales, las HSC, opcionalmente HSC inmortalizadas de forma condicional, se cultivan adicionalmente en presencia de al menos 1 ng/ml de TPO, al menos 2 ng/ml de TPO, al menos 3 ng/ml de TPO, al menos 4 ng/ml de TPO, al menos 5 ng/ml de TPO, al menos 6 ng/ml de TPO, al menos 7 ng/ml de TPO, al menos 8 ng/ml de TPO, al menos 9 ng/ml de TPO, al menos 10 ng/ml de TPO, al menos 15 ng/ml de TPO, al menos 20 ng/ml de TPO, al menos 25 ng/ml de TPO, al menos 30 ng/ml de TPO, al menos 35 ng/ml de TPO, al menos 40 ng/ml de TPO, al menos 45 ng/ml de TPO, al menos 50 ng/ml de TPO, al menos 55 ng/ml de TPO, al menos 60 ng/ml de TPO, al menos 65 ng/ml de TPO, al menos 70 ng/ml de TPO, al menos 75 ng/ml de TPO, al menos 80 ng/ml de TPO, al menos 85 ng/ml de TPO, al menos 90 ng/ml de TPO, al menos 95 ng/ml de TPO, al menos 100 ng/ml de TPO, al menos 150 ng/ml de TPO, al menos 200 ng/ml de TPO, al menos 250 ng/ml de TPO, al menos 300 ng/ml de TPO, al menos 350 ng/ml de TPO, al menos 400 ng/ml de TPO, al menos 450 ng/ml de TPO, y al menos 500 ng/ml de TPO o más de TPO.

Los métodos actuales de producción de glóbulos rojos a partir de HSC primarias, por ejemplo, véase Giarratana et al., (2005) *Nat Biotech* 23, 69-74, requieren al menos tres semanas (21 días) para producir glóbulos rojos. Sin embargo, los métodos de la presente divulgación para la producción de una población de glóbulos rojos a partir de HSC inmortalizadas de forma condicional producen glóbulos rojos en aproximadamente 10 días. En comparación con los al menos 21 días de los métodos actuales, los 10 días de los métodos que se desvelan en el presente documento representan una aceleración de aproximadamente el 52 %. Por tanto, en algunas realizaciones, la producción de la población de glóbulos rojos maduros se acelera en al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 51 %, al menos el 52 %, al menos el 53 %, al menos el 54 %, al menos el 55 %, al menos el 56 %, al menos el 57 %, al menos el 58 %, al menos el 59 %, al menos el 60 %, al menos el 61 %, al menos el 62 %, al menos el 63 %, al menos el 64 %, al menos el 65 %, al menos el 66 %, al menos el 67 %, al menos el 68 %, al menos el 69 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o más en comparación con la producción de una población de glóbulos rojos a partir de una célula madre primaria cultivada en presencia de IL-3 y EPO durante ocho días, después en presencia de células alimentadoras y EPO durante tres días y finalmente en presencia de células alimentadoras solas durante 10 días (véase, Giarratana et al., (2005) *Nat Biotech* 23, 69-74).

En otras realizaciones, la población de glóbulos rojos maduros se produce en aproximadamente de 7 a 14 días. En otras realizaciones, la población de glóbulos rojos maduros se produce en aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días o aproximadamente 14 días.

En otras realizaciones de los métodos de la presente divulgación, la población de glóbulos rojos producida es una población de glóbulos rojos completamente maduros. En otras realizaciones más, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 % de las células de la población de glóbulos rojos maduros están anucleadas. En otras realizaciones más, la población de glóbulos rojos maduros se produce de forma continua a partir de HSC inmortalizadas de forma condicional.

En otras realizaciones de los métodos de la presente divulgación, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 % de las células de la población de glóbulos rojos maduros expresan Glucoforina A (GPA). En realizaciones adicionales, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 % de las células de la población de glóbulos rojos maduros presentan niveles reducidos de expresión de CD71 (receptor de transferrina). En realizaciones adicionales, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 % de las células de la población de glóbulos rojos maduros presentan niveles reducidos de expresión de hemoglobina fetal. En realizaciones adicionales, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 % de las células de la población de glóbulos rojos maduros expresan hemoglobina de adulto.

En otras realizaciones, la población de glóbulos rojos maduros producida es una población de células humanas. En realizaciones adicionales, la población de glóbulos rojos maduros producida es una población de células de animales no humanos, incluyendo, sin limitación, una población de células de animales de laboratorio/investigación, roedores, mascotas, ganado, animales de granja, animales de trabajo, animales de carga, especies raras o en peligro de extinción, animales de carreras, animales de zoológico, monos, primates, ratones, ratas, cobayas, hámsteres, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras y pollos.

Los métodos de la presente divulgación también pueden utilizar HSC, opcionalmente HSC inmortalizadas de forma condicional, derivadas de HSC obtenidas a partir de donantes humanos que tienen una sangre de tipo A+, A-, B+, B-

, O+, O-, AB+ o AB-. En consecuencia, los glóbulos rojos producidos a partir de las HSC serán de tipo sanguíneo A+, A-, B+, B-, O+, O-, AB+ o AB-.

Adicionalmente, los métodos de la presente divulgación también pueden utilizar HSC, opcionalmente HSC
5 inmortalizadas de forma condicional derivadas de HSC obtenidas de donantes que tienen un tipo sanguíneo raro incluyendo, sin limitación, Oh, CDE/CDE, CdE/CdE, C^wD-/C^wD-, -D-/D-, Rh_{null}, Rh:-51, LW(a-b+), LW(a-b-), S-s-U-, S-s-U(+), pp, Pk, Lu(a+b-), Lu(a-b-), Kp(a+b-), Kp(a-b-), Js(a+b-), Ko, K:-11, Fy(a-b-), Jk(a-b-), Di(b-), I-, Yt(a-), Sc:-1, Co(a-), Co(a-b-), Do(a-), Vel-, Ge-, Lan-, Lan(+), Gy(a-), Hy-, At(a-), Jr(a-), In(b-), Tc(a-), Cr(a-), Er(a-), Ok(a-), JMH- y En(a-). En consecuencia, en algunas realizaciones, la población de glóbulos rojos producida a partir de las HSC
10 será de un tipo sanguíneo raro incluyendo, sin limitación, Oh, CDE/CDE, CdE/CdE, C^wD-/C^wD-, -D-/D-, Rh_{null}, Rh:-51, LW(a-b+), LW(a-b-), S-s-U-, S-s-U(+), pp, Pk, Lu(a+b-), Lu(a-b-), Kp(a+b-), Kp(a-b-), Js(a+b-), Ko, K:-11, Fy(a-b-), Jk(a-b-), Di(b-), I-, Yt(a-), Sc:-1, Co(a-), Co(a-b-), Do(a-), Vel-, Ge-, Lan-, Lan(+), Gy(a-), Hy-, At(a-), Jr(a-), In(b-), Tc(a-), Cr(a-), Er(a-), Ok(a-), JMH- y En(a-).

Adicionalmente, los métodos de la presente divulgación también pueden utilizar HSC, opcionalmente HSC
15 inmortalizadas de forma condicional derivadas de donantes que tienen un trastorno autoinmunitario, inmunodeficiencia o cualquier otra enfermedad o trastorno que se beneficiaría de un trasplante de HSC y/o transfusión de sangre para producir una población de glóbulos rojos maduros que pueden usarse para terapias personalizadas. Por ejemplo, la población de glóbulos rojos maduros puede producirse a partir de HSC obtenidas a
20 partir de un donante autólogo o alógeno. De forma ventajosa, los glóbulos rojos autólogos pueden ser particularmente útiles en casos en los que el sujeto que necesita una transfusión de sangre y/o tratamiento con glóbulos rojos podría tener una reacción negativa, perjudicial o tóxica al tratamiento con glóbulos rojos derivados u obtenidos de cualquier otro donante, incluyendo donantes alógenos y/o universales. Se conocen bien en la técnica ejemplos de pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con glóbulos rojos producidos a partir de HSC
25 derivadas de donantes autólogos y/o alógenos e incluyen, sin limitación, aquellos que padecen un trastorno autoinmunitario, enfermedad o trastorno de la sangre, enfermedad o trastorno inmunitario u otras enfermedades o afecciones relacionadas.

En determinadas realizaciones, la población de glóbulos rojos se produce a partir de HSC inmortalizadas de forma
30 condicional con las que pueden hacerse pases indefinidamente *in vitro*, que pueden crioconservarse y recuperarse. En consecuencia, dichas HSC inmortalizadas de forma condicional permiten la producción continua de glóbulos rojos completamente diferenciados a partir de una fuente definida, bien caracterizada.

Los métodos de la presente divulgación pueden utilizar HSC de cualquier fuente, incluyendo, pero sin limitación,
35 células madre hematopoyéticas primarias de sangre de cordón umbilical, placenta, sangre periférica, médula ósea o sangre movilizada. Se contemplan expresamente células madre hematopoyéticas derivadas de células madre embrionarias, células de sangre fetal o células madre pluripotentes inducidas, así como células madre hematopoyéticas inmortalizadas de forma condicional tales como células inmortalizadas de forma condicional transgénicas y transducidas con proteína.

40 Poblaciones de glóbulos rojos

Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren a poblaciones de glóbulos rojos, tales como glóbulos
45 rojos maduros, producidas opcionalmente mediante uno o más métodos de la presente divulgación. Las poblaciones de glóbulos rojos también pueden incluir una o más proteínas de interés de la presente divulgación. Estas proteínas de interés pueden ser útiles en la prevención, el tratamiento y/o el diagnóstico de una o más enfermedades o trastornos que se desvelan en el presente documento.

En algunos aspectos, las poblaciones de glóbulos rojos pueden caracterizarse por una o más características,
50 incluyendo, pero sin limitación, al menos aproximadamente el 40 %, al menos el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % de las células de la población están
55 anucleadas, expresan GPA, expresan hemoglobina de adulto (segunda década o superior por FACS), presentan niveles reducidos de expresión de CD71 (por ejemplo, GPA+/CD71-) y/o presentan niveles reducidos de hemoglobina fetal (primera década; 0-10 por FACS). Las poblaciones de glóbulos rojos también pueden incluir una o más proteínas recombinantes de interés. Estas proteínas de interés pueden ser útiles en la prevención, el tratamiento y/o el diagnóstico de una o más enfermedades o trastornos que se desvelan en el presente documento.

En algunas realizaciones, una población de glóbulos rojos puede incluir adicionalmente una proteína exógena de la
60 presente divulgación que inhibe la apoptosis, tal como una proteína que contiene un dominio de homología Bcl-2. La proteína exógena puede ser también una proteína de fusión que contiene un PTD. En algunas realizaciones, la proteína exógena es Bcl-2, un homólogo de la misma, un análogo de la misma y/o un fragmento biológicamente activo de la misma. En determinadas realizaciones, la proteína exógena es Bcl-2, opcionalmente PTD-Bcl-2. En
65 algunas realizaciones, la población de glóbulos rojos se mantiene en medio de almacenamiento que incluye una

proteína de la presente divulgación que inhibe la apoptosis, tal como una proteína que contiene un dominio de homología Bcl-2. En algunas realizaciones, la proteína exógena en el medio de almacenamiento es Bcl-2, un homólogo de la misma, un análogo de la misma y/o un fragmento biológicamente activo de la misma. En determinadas realizaciones, la proteína exógena en el medio de almacenamiento es Bcl-2, opcionalmente PTD-Bcl-2

Composiciones farmacéuticas

Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren a composiciones farmacéuticas que incluyen una o más poblaciones de glóbulos rojos de la presente divulgación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Puede usarse cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable conocido en la técnica que sea adecuado para su uso con glóbulos rojos. En un ejemplo no limitante, el excipiente farmacéuticamente aceptable es una solución salina de pH equilibrado.

La composición puede incluir adicionalmente una o más proteínas de interés de la presente divulgación.

Las poblaciones de glóbulos rojos se producen opcionalmente mediante uno o más métodos de la presente divulgación y/o presentan una o más de las características de la presente divulgación, incluyendo sin limitación, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población están anucleados, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población expresan hemoglobina de adulto, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan una expresión aumentada de hemoglobina de adulto, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan niveles reducidos de expresión de CD71 y de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan niveles reducidos de expresión de hemoglobina fetal. Adicionalmente, la población de glóbulos rojos puede tener un tipo sanguíneo raro. En algunas realizaciones, los glóbulos rojos son glóbulos rojos humanos. Como alternativa, los glóbulos rojos son glóbulos rojos no humanos derivados de cualquier animal no humano de la presente divulgación.

Las poblaciones de glóbulos rojos también pueden incluir una o más proteínas de interés de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la una o más proteínas de interés se asocian en la superficie de los glóbulos rojos.

Pueden formularse composiciones farmacéuticas de la presente divulgación que contienen una o más poblaciones de glóbulos rojos de la presente divulgación y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, donde los glóbulos rojos contienen opcionalmente una o más proteínas de interés de la presente divulgación para la administración *in vivo*, tal como a través de transfusión. Puede usarse cualquier formulación conocida en la técnica para la administración *in vivo* de una composición farmacéutica que contiene una población de glóbulos rojos.

Usos terapéuticos

Los glóbulos rojos que se describen en el presente documento y/o que se producen de acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente divulgación para la producción de una población de glóbulos rojos maduros a partir de HSC, opcionalmente HSC inmortalizadas de forma condicional, también encuentran uso en aplicaciones terapéuticas.

El uso de transfusiones de glóbulos rojos para que necesiten dicho tratamiento para una diversidad de razones y trastornos es bien conocido en la técnica y los enfoques son la práctica médica de referencia. Los glóbulos rojos que se describen en el presente documento y/o que se producen de acuerdo con los métodos de la presente divulgación pueden usarse para tratar a los pacientes usando los mismos enfoques y condiciones utilizados actualmente para las transfusiones de sangre.

Además, la presente divulgación se refiere a métodos de tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o trastorno caracterizado por una deficiencia de glóbulos rojos mediante la administración de una población de glóbulos rojos de la presente divulgación o preparada de acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente divulgación, a un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por una deficiencia de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población están anucleados, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población expresan hemoglobina de adulto, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan una expresión aumentada de hemoglobina de adulto, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan niveles reducidos de expresión de CD71 y de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 % de los glóbulos rojos de la población presentan niveles reducidos de expresión de hemoglobina fetal.

Como se usa en el presente documento, una "deficiencia de glóbulos rojos", se refiere a un sujeto que tiene una cantidad de glóbulos rojos que es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 900 % inferior a la cantidad de glóbulos rojos en un sujeto que tiene una cantidad normal de glóbulos rojos; o tiene una cantidad de glóbulos rojos que es de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 1000 veces inferior a la cantidad de glóbulos rojos

en un sujeto que tiene una cantidad normal de glóbulos rojos.

- Los trastornos caracterizados por una deficiencia de glóbulos rojos pueden incluir, sin limitación, anemia (por ejemplo, anemia congénita, anemia aplásica, anemia perniciosa, anemia por deficiencia de hierro, anemia drepanocítica, esferocitosis, anemia hemolítica, aceruloplasminemia, aumento de la actividad de la adenosina desaminasa -ADA-, deficiencia de adenilato cinasa, deficiencia de aldolasa, α -talasemia - rasgo o transportador, 5 atransferrinemia, anemia sideroblástica autosómica dominante, anemia sideroblástica autosómica recesiva, β -talasemia - rasgo o transportador, β -talasemia mayor (e intermedia), CDA con trombocitopenia (mutación de GATA I), trastornos drepanocíticos heterocigóticos compuestos, acantocitosis congénita, anemia diseritropoyética 10 congénita de tipo I, anemia diseritropoyética congénita de tipo II, anemia diseritropoyética congénita de tipo III, δ β -talasemia, anemia de Diamond-Blackfan, anemia por deficiencia de DMT1, anemia hipoplásica familiar, anemia de Fanconi, deficiencia de gamma-glutamyl-cisteína sintetasa, anemia sideroblástica relacionada con GLRX5, deficiencia de glucosa fosfato isomerasa, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, deficiencia de glutatión reductasa, deficiencia de glutatión sintetasa, enfermedad de la hemoglobina C, enfermedad de la hemoglobina D, 15 enfermedad de la hemoglobina E, enfermedad de la hemoglobina H, hemoglobina Lepore, hemoglobina M con anemia, eliptocitosis hereditaria, persistencia hereditaria de hemoglobina fetal, esferocitosis hereditaria, estomatocitosis hereditaria, deficiencia de hexocinasa, hidropesía fetal, síndrome de Imlerslund-Grasbeck, hierro - anemia por deficiencia de hierro refractaria, síndrome de Kearns-Sayre, deficiencia de lecitina colesterol aciltransferasa, anemia sideroblástica por miopatía mitocondrial, talasemias, anemia diseritropoyética congénita, 20 pancitopenia con malformaciones, hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome de Pearson, deficiencia de fosfofructocinasa, deficiencia de fosfoglicerato cinasa, deficiencia de pirimidina 5 nucleotidasa, deficiencia de piruvato cinasa, anemia drepanocítica, rasgo drepanocítico, anemia sideroblástica asociada a ataxia, anemia sideroblástica relacionada con SLC25A38, anemia megaloblástica sensible a tiamina, deficiencia de triosa fosfato isomerasa, hemoglobina inestable, síndrome de Wolfram y anemia sideroblástica ligada al cromosoma X), 25 enfermedad de Gaucher, hemólisis, neutropenia, trombocitopenia, granulocitopenia, hemofilia, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma crónico de células B, linfoma de Burkitt, linfoma de tipo folicular, linfoma de células B grandes difuso, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda pre-B, leucemia linfocítica aguda pre-T, leucemia promielocítica aguda, leucemia refractaria o combinaciones de los mismos.
- 30 En determinados casos, el trastorno caracterizado por una deficiencia de glóbulos rojos es resultado (parcialmente o totalmente) de uno o más de entre quimioterapia, exposición química, radioterapia y/o exposición a radiación. En algunas realizaciones, una población de glóbulos rojos producida mediante cualquier método de la presente divulgación se coadministra con quimioterapia y/o radioterapia o uno o más proteínas de interés.
- 35 Una población de glóbulos rojos de la presente divulgación y/o producida de acuerdo con cualquier método de la presente divulgación pueden administrarse a o transfundirse a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, que padece una pérdida de sangre. Una pérdida de sangre puede ser el resultado de, por ejemplo, sangrado interno o externo, hemorragia, traumatismo o cirugía, entre otros.
- 40 El tratamiento con una o más de las poblaciones de glóbulos rojos de la presente divulgación también puede ser útil para algunas enfermedades infecciosas asociadas a hemorragia, tales como, pero sin limitación, familias de virus de ARN (Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae y Flaviviridae) que están vinculados a la fiebre hemorrágica vírica. Los ejemplos de fiebres hemorrágicas víricas incluyen pero sin limitación, fiebre de Lassa, ébola, Marburg, fiebre del Valle del Rift, dengue y fiebre amarilla.
- 45 En los casos donde se necesita una transfusión inmediata, pueden administrarse a un individuo grandes cantidades de glóbulos rojos que se describen en el presente documento y/o se preparan de acuerdo con cualquier método de la presente divulgación. En otras realizaciones, se administra al individuo una transfusión sostenida producido de la población de glóbulos rojos.
- 50 Para el tratamiento de algunas enfermedades, trastornos y/o afecciones es útil administrar glóbulos rojos adaptados para que sean un sistema de entrega para una o más proteínas de interés de la presente divulgación. Puede usarse cualquier método de adaptación de glóbulos rojos para que sean un sistema de entrega para proteínas conocidas en la técnica y que se desvelan en el presente documento. Cualesquier enfermedades, trastornos y/o afecciones 55 conocidos en la técnica y que se desvelan en el presente documento que se beneficiarían del tratamiento con una proteína desvelada de interés pueden tratarse con los métodos de la presente divulgación, incluyendo, sin limitación, sujetos que necesiten factores de crecimiento hematopoyéticos, afecciones inflamatorias agudas, afecciones de tormenta de citocinas, signos clínicos asociados a tormentas de citocinas, cáncer, desregulación vascular (por ejemplo, sabañones, la vasoconstricción relacionada con el cáncer o las articulaciones reumáticas, etc.), infartos 60 cardíacos agudos, usos obstétricos durante el parto, migrañas agudas y/o persistentes, sujetos que necesiten un refuerzo de la inmunidad, sujetos con alto riesgo de formar coágulos, sujetos con riesgo elevado de embolias pulmonares, enfermedades cardiovasculares, enfermedades y/o trastornos inmunitarios y enfermedades y/o trastornos autoinmunitarios.
- 65 Un "sujeto", "paciente" u "hospedador" que se ha de tratar mediante cualquiera de los métodos de la presente divulgación puede ser cualquier ser humano o animal no humano, tal como cualquiera de los animales no humanos

que se describen en el presente documento, que necesite dicho tratamiento. Por ejemplo, el sujeto puede tener una deficiencia de glóbulos rojos, tiene una deficiencia autoinmunitaria, una anemia, cáncer o cualquier otra enfermedad, trastorno o afección conocida en la técnica y desvelada en el presente documento que pueda tratarse mediante glóbulos rojos de la presente divulgación y/o una o más proteínas de interés de la presente divulgación.

La mención de documentos y estudios referidos en el presente documento no pretende ser una admisión de que nada de lo anterior sea técnica anterior pertinente. Todas las declaraciones en cuanto al contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen admisión alguna en cuanto a la exactitud de los contenidos de estos documentos.

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden limitar ningún aspecto de la presente divulgación de ninguna manera.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen los resultados de la diferenciación de estirpes de células madre hematopoyéticas de largo plazo transformadas de forma condicional (clt-HSC) murinas y humanas y estirpes de células madre hematopoyéticas de largo plazo transducidas con proteína (ptlt-HSC) a glóbulos rojos (GR) *in vitro*.

El enfoque que se describe facilita la producción rápida de poblaciones de glóbulos rojos enucleados maduros con carga útil opcional con una o más proteínas de interés. Además, la generación de HSC inmortalizadas de forma condicional como material de partida permite la producción y el mantenimiento de sangre de donante universal o una diversidad de los principales tipos sanguíneos, así como tipos sanguíneos raros e incluso sangre personalizada para resolver el problema de la escasez de sangre continua que los pacientes con tipos sanguíneos raros han encontrado en los últimos años. Además, esta tecnología puede usarse para proporcionar un suministro constante y predecible de GR para transfusiones que derivan de una fuente definida que puede certificarse que está libre de patógenos y tienen una vida de almacenamiento prolongada que permitirá el establecimiento de un suministro de reserva suficiente de GR.

Ejemplo 1: Generación de estirpes de células madre hematopoyéticas de largo plazo transformadas de forma condicional reconstituidas

Se prepararon células de médula ósea (MO) enriquecidas en HSC mediante tratamiento de ratones con 5-fluorouracilo (5FU) para la ablación de células en proliferación. Se enriquecieron adicionalmente en HSC células de MO *ex vivo* de ratones tratados mediante cultivo en medio que contenía IL-3, IL-6 y SCF, como se ha descrito anteriormente (Van Parijs et al., *Immunity* 11, 763-770, 1999). Las células se sometieron después a tres rondas de infección por centrifugación con oncoproteínas codificadas por virus pMIG-MYC-ER y Bcl-2-PMIG, así como proteína verde fluorescente (Fig. 1A) (Refaeli et al., *J. Exp. Med.* 196, 999-1005, 2002). Se generaron variantes de la estructura principal pMSCV para codificar los ADNc para MYC-ER o Bcl-2 humanas, así como un elemento IRES y un gen indicador (EGFP). Los virus resultantes generaron transcripciones bicistrónicas de manera que el nivel de expresión del gen indicador se correlacionaba con el nivel de expresión del primer ADNc.

Este tratamiento produjo una tasa de transducción retroviral de aproximadamente el 33,7 %, como se determina por la frecuencia de células que expresaban proteína verde fluorescente (GFP) 96 horas después de que se establecieron los cultivos iniciales (Fig. 1B). Se trasplantaron 10⁵ HSC transducidas en cohortes de ratones C57/BL6 macho jóvenes, irradiados letalmente, y a estos ratones se les proporcionaron inyecciones semanales de 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) en una cantidad de 1 mg/ratón/semana, comenzando 10 días después del trasplante. Se desarrollaron leucemias en más del 90 % de estos ratones con un período de latencia uniforme de cuatro semanas (Fig. 1C). La curva en la Figura 1C representa el porcentaje de ratones supervivientes en un punto dado en el tiempo después de que comenzarían las inyecciones de 4-OHT (día 0 en el gráfico). Todos los ratones murieron de manera uniforme por una leucemia similar a LMA después de aproximadamente 40 días (Fig. 1C). Los datos que se muestran en la Figura 1 eran de un experimento representativo de 4 experimentos independientes. El desarrollo de las leucemias requirió la administración continua de 4-OHT.

Aunque el ejemplo específico proporcionado se refiere a la inmortalización condicional de HSC usando Myc y Bcl-2, se usaría un enfoque similar para incorporar otras proteínas de interés en las HSC y, opcionalmente, para controlar la expresión de las proteínas de interés. En algunas realizaciones, la HSC incluiría HSC inmortalizadas de forma condicional o HSC transducidas con proteína.

Ejemplo 2: Estirpes de células HSC transformadas de forma condicional que presentan un fenotipo de superficie Lt-HSC

Para evaluar el fenotipo y la homogeneidad de las estirpes celulares desarrolladas en el Ejemplo 1, se analizó la expresión celular de una diversidad de marcadores de superficie. Las células se tiñeron con anticuerpos contra c-kit, Sca-1, CD34 y Flk-2. Adicionalmente, las células se tiñeron para linajes específicos: CD19 y B220 para células de linaje B, Thy1.2 para células de linaje T, Mac-1 para células mieloides, Gr-1 para neutrófilos y Ter-119 para

progenitores de glóbulos rojos. Como se muestra en las Figuras 1D-1F, el fenotipo observado uniformemente era de linaje negativo (CD19⁻, B220⁻), pero Sca-1⁺, c-kit⁺, CD34⁺ y Flk-2⁻. Este patrón de expresión del marcador es coherente con que se publicó anteriormente para Lt-HSC primarias murinas (Cheshier et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 3120-3125, 1999). También se observó que cuando las estirpes de células cKit-HSC se mantuvieron en cultivo durante períodos prolongados de tiempo, la expresión de c-kit celular disminuyó (Fig. 1E). Este cambio no se asocia a cambios detectables en la función *in vivo* o *in vitro*. Por otra parte, también se descubrió que los niveles de c-Kit se restablecieron cuando las células se cultivaron durante la noche sin SCF, lo que sugiere que SCF impulsa la modulación de su receptor.

En particular, la Figura 1D muestra cKit-HSC obtenidas de la médula ósea de ratones leucémicos poco después de la recuperación. En estas muestras, aproximadamente el 42,2 % de las células eran Sca-1⁺ y c-kit⁺; aproximadamente el 100 % de las células eran CD34⁺ y Flk-2⁻; y aproximadamente el 99,8 % de las células eran B220⁻ y CD19⁻ (Fig. 1D).

La Figura 1E muestra estirpes de células cKit-HSC que se mantuvieron en cultivo durante largos períodos de tiempo. En estas muestras, aproximadamente el 7,79 % de las células eran Sca-1⁺ y c-kit⁺; aproximadamente el 51,2 % de las células eran Sca-1⁺, pero no c-kit⁺; aproximadamente el 100 % de las células eran CD34⁺ y Flk-2⁻; y aproximadamente el 99,4 % de las células eran B220⁻ y CD19⁻ (Fig. 1E).

La Figura 1F muestra Lt-HSC normales sin manipular obtenidas de médula ósea de ratones C57/BL6 de tipo silvestre. En estas muestras, solo aproximadamente el 1,84 % de las células eran Sca-1⁺ y c-kit⁺, aproximadamente el 8,03 % de las células eran Sca-1⁺ y c-kit⁺, mientras que la mayoría de las células (aproximadamente el 88,5 %) eran negativas tanto para Sca-1 como para c-kit (Fig. 1F). Adicionalmente, mientras que aproximadamente el 100 % de las células eran CD34⁺, no todas las células eran Flk-2⁻ (Fig. 1F).

Por otra parte, como se muestra en la Figura 1D, en una etapa temprana del proceso de establecer una estirpe de células cKit-HSC, las células expresan predominantemente altos niveles de c-kit y Sca-1 y no expresan Flk-2, CD34 o marcadores de linaje tales como CD19 y B220. El análisis por FACS de una estirpe de células cKit-HSC establecida muestra que una vez que la estirpe de células cKit-HSC se expandió y criopreservó, conservó un fenotipo de superficie estable. Estas células expresaron altos niveles de Sca-1, pero tenían niveles de superficie reducidos de c-Kit y permanecieron negativos para Flk-2, CD34, B220, CD19 y otros marcadores de linaje (Fig. 1E). La reducción de niveles de c-kit de la superficie parece ser resultado de una señalización continua, puesto que requieren que SCF conserve su fenotipo similar a HSC. Los resultados de la estirpe de células cKit-HSC se compararon con las HSC de largo plazo normales y sin manipular de la médula ósea de ratones C57/BL6 de tipo silvestre. Como se muestra en la Figura 1F, las células se tiñeron con anticuerpos contra c-kit, sca-1, Flk-2 y CD34, con el fin de comparar los niveles de expresión de las proteínas marcadoras de HSC normales y de las estirpes de células cKit-HSC.

Ejemplo 3: Rescate de ratones de la irradiación letal mediante trasplante de cKit-HSC

Este ejemplo demuestra la capacidad de las estirpes de células cKit-HSC para originar glóbulos rojos (GR) diferenciados. Esta capacidad, así como la competencia para mantener un compartimento activo de HSC durante largos períodos de tiempo, es fundamental para establecer la identidad de cKit-HSC como Lt-HSC. La capacidad de las estirpes de células cKit-HSC para reconstituir el compartimento hematopoyético de animales letales irradiados se examinó de dos maneras. En primer lugar, se transfirieron 10³ células cKit-HSC con 3x10⁵ células de médula ósea completas de ratones Rag-1^{-/-} a ratones C57/BL6 jóvenes irradiados letalmente. La adición de las células Rag-1^{-/-} "transportadoras" garantizó que los receptores pudieran producir glóbulos rojos durante el período de tiempo necesario para que las HSC transferidas restablezcan la eritropoyesis. La complementación con células de médula ósea "transportadoras" completas se usa generalmente junto con la reconstitución de HSC con el fin de permitir que los receptores de trasplantes sobrevivan a la pérdida de glóbulos rojos existentes que sigue a la irradiación (Uchida et al., *J. Exp. Med.* 175, 175-184, 1992). Por tanto, los experimentos se diseñaron de manera que la única fuente posible de células linfoides maduras fueran las células cKit-HSC trasplantadas. En una variación de este enfoque, se trasplantaron 10³ células cKit-HSC en ratones Rag-1^{-/-} irradiados de forma subletal sin médula ósea transportadora. Los ratones que recibieron cKit-HSC se sacrificaron 6 o 12 semanas después del trasplante y se recogieron tejidos de ganglios linfáticos, bazo, timo y médula ósea para el análisis de la reconstitución. Las suspensiones celulares resultantes se tiñeron con anticuerpos específicos de linaje para determinar el grado de reconstitución. Las células que se desarrollaron a partir de cKit-HSC se rastrearon *in vivo* en virtud del gen informador codificado de forma retroviral, GFP.

Las estirpes de células cKit-HSC originaron tejido de médula ósea, timo, bazo y ganglios linfáticos con una alta frecuencia de células GFP⁺ (un 70-80 % de células viables recuperadas) en médula ósea, timo, bazo y ganglios linfáticos (Fig. 2A). Estos histogramas derivaron de los órganos en un ratón de ejemplo de cada uno dentro de una cohorte de cinco. En particular, aproximadamente el 78 % de las células de médula ósea eran GFP⁺, aproximadamente el 72 % de las células de timo eran GFP⁺, aproximadamente el 80 % de las células de bazo eran GFP⁺ y aproximadamente el 79 % de las células de ganglios linfáticos (LN) eran GFP⁺ (Fig. 2A).

Como se muestra en la Figura 2B, las células obtenidas de médula ósea se tiñeron para Mac-1 y Gr-1. Si bien no

todas las células mieloides encontradas en la médula ósea expresaron GFP, una parte significativa era GFP+ y, por tanto, derivaban de las cttlt-HSC. En particular, aproximadamente el 14,8 % de las células eran Mac-1+, siendo aproximadamente el 24 % de las células GFP+ y Mac-1+. Por tanto, aproximadamente el 61,8 % de las células Mac-1+ derivaron de cttlt-HSC (Fig. 2B). Adicionalmente, aproximadamente el 32 % de las células eran Gr-1+, siendo aproximadamente el 18,7 % de las células tanto GFP+ como Gr-1+. Por tanto, aproximadamente el 58,4 % de las células Mac-1+ derivaron de cttlt-HSC (Fig. 2B).

Como se muestra en la Figura 2C, se analizaron células obtenidas de tejido de bazo de ratones Rag-1^{-/-} quiméricos mediante citometría de flujo para determinar la presencia de linfocitos T y B maduros. Se usaron ratones Rag-1^{-/-} y ratones de tipo silvestre como controles. Las células se tiñeron para detectar la presencia de linfocitos T TCRαβ que fueran positivos solo para CD4 o CD8. Además, las células se tiñeron para determinar la presencia de células B CD19+ que expresasen IgM e IgD en su superficie.

En particular, las muestras de células de bazo de los ratones Rag-1^{-/-} quiméricos tenían aproximadamente un 25,8 % de células TCRαβ+ y CD4+, aproximadamente un 16,8 % de células TCRαβ+ y CD8+ y aproximadamente un 7,8 % de células IgM+ y CD19+ (Fig. 2C). Esto se compara con muestras de células de bazo de ratones Rag-1^{-/-} de control que no tenían células TCRαβ+ y CD4+, células TCRαβ+ y CD8+ ni células IgM+ y CD19+; y muestras de células de bazo de ratones de tipo silvestre que tenían aproximadamente un 24 % de células TCRαβ+ y CD4+, aproximadamente un 16,1 % de células TCRαβ+ y CD8+ y aproximadamente un 28,7 % de células IgM+ y CD19+ (Fig. 2C).

Como puede verse en la Figura 2C, aunque la frecuencia de linfocitos T maduros en el bazo era comparable a la que puede encontrarse en ratones C57/BL6 sin manipular de tipo silvestre, el desarrollo de células B se retrasó.

Después se determinó si las cttlt-HSC eran capaces de producir auto-renovación después del trasplante. Las células de médula ósea obtenidas del primer grupo de ratones receptores de trasplante de cttlt-HSC se trasplantaron en serie en una segunda cohorte de ratones Rag-1^{-/-} irradiados letalmente. La reconstitución se analizó 6 o 12 semanas después.

Como se muestra en la Figura 2D, el trasplante secundario también fue capaz de originar linajes maduros. Se recogieron bazos de la cohorte de los ratones quiméricos y se prepararon suspensiones de células individuales y se usaron para el análisis por FACS. La frecuencia de linfocitos T y B maduros encontrados en receptores, ratones Rag-1^{-/-} de control y ratones C57/BL6 de tipo silvestre de control se compararon. El análisis mostró la presencia de linfocitos T TCRαβ positivos solamente para CD4 y CD8 maduros en los bazos a una frecuencia similar a la de los ratones de tipo silvestre. También había presentes células B CD19+, IgM+ e IgD+, aunque a una frecuencia más baja que en los ratones de tipo silvestre.

En particular, las muestras de células de bazo de ratones Rag-1^{-/-} receptores de trasplante secundario tenían aproximadamente un 41,3 % de células TCRαβ+ y CD4+, aproximadamente un 34,3 % de células TCRαβ+ y CD8+ y aproximadamente un 10,2 % de células IgM+ y CD19+ (Fig. 2D). Esto se compara con muestras de células de bazo de ratones Rag-1^{-/-} de control que tenían aproximadamente un 0,7 % de células TCRαβ+ y CD4+, aproximadamente un 0,4 % de células TCRαβ+ y CD8+ y un 0,5 % de células IgM+ y CD19+; y muestras de células de bazo de ratones de tipo silvestre que tenían aproximadamente un 36,9 % de células TCRαβ+ y CD4+, aproximadamente un 37,7 % de células TCRαβ+ y CD8+ y aproximadamente un 16,9 % de células IgM+ y CD19+ (Fig. 2D).

Posteriormente se realizaron siete trasplantes consecutivos y se observó la reconstitución de linajes maduros de las 10³ cttlt-HSC iniciales sin evidencia de formación de tumores (Tabla 1). Para este experimento, se trasplantó un millón de células de médula ósea completas a ratones Rag-1^{-/-} letalmente irradiados. El trasplante en ratones Rag1^{-/-} (Jackson Laboratory) se realizó como se describe para ratones NSG excepto porque los ratones Rag1^{-/-} recibieron dos dosis posteriores (con un intervalo de 2-3 horas) de 450 rads de radiación justo antes de inyectar las células de MO a través de vena de la cola.

TABLA 1

Trasplante	n.º de repeticiones de ratones	SP % de T promedio	Desv. típica	SP % de B promedio	Desv. típica
1	8	29,300	14,106	15,190	12,834
2	9	48,910	17,396	15,230	16,619
3	4	36,900	7,230	6,955	5,206
4	3	21,560	9,415	7,683	4,657
5	4	32,93 ⁰	13,968	7,140	1,373
6	7	16,051	5,582	0,7629	0,472
7	5	15,174	8,99	0,239	0,156
8	6	0,8	0,341	0,044	0,044

Ejemplo 4: Desarrollo de estirpes de células cttlt-HSC humanas y ratones quiméricos que portan un compartimento hematopoyético humano

5 Se ha desarrollado anteriormente un método para inmortalizar de forma condicional HSC de largo plazo murinas. Este enfoque se prolongó para inmortalizar de forma condicional HSC de largo plazo humanas de manera de determinar si los mecanismos responsables para inmortalizar de forma condicional HSC murinas son aplicables universalmente a cualesquier HSC o si son específicos solo para células murinas. Con el fin de someter a ensayo esta noción, se obtuvo fracción CD34+ de médula ósea de adulto humana o sangre de cordón umbilical (inicialmente de Stem Cell Technologies, Vancouver, BC y después del banco de sangre de cordón umbilical UCHSC). Las células se cultivaron en un medio especializado desarrollado para HSC humanas (medio Stemline II, Sigma, San Luis, MO) complementadas con IL-3, IL-6 y SCF recombinantes humanas. Las HSC humanas después se transdujeron con retrovirus que codificaban MYC-ER o Bcl-2, junto con un indicador GFP. Los retrovirus fueron las mismas variantes de pMSCV que se usaron en el Ejemplo 1. Sin embargo, estos retrovirus se modificaron para la encapsulación con una envoltura anfotrópica con el fin de permitir la transducción en células humanas. Las HSC humanas transducidas se trasplantaron en ratones NOD/SCID/ $\beta 2M^{-/-}$ irradiados de forma subletal o se mantuvieron en cultivos a largo plazo *in vitro* en presencia del cóctel de citocinas IL-3, IL-6 y SCF y 4-OHT. Los dos enfoques diferentes dieron como resultado estirpes de células cttlt-HSC humanas. Un conjunto de estirpes de células cttlt-HSC humanas generadas completamente *in vitro* se han mantenido en cultivo continuo durante 14 meses. Los fenotipos de superficie iniciales de tres estirpes celulares transducidas de forma retroviral mostraron un enriquecimiento significativo de la fracción CD34+. Se realizó un análisis por FACS de las células que tenían un enriquecimiento de más de 10.000 veces la fracción de CD34+ sobre las frecuencias iniciales de las HSC (Fig. 3A-3C) para determinar el fenotipo de superficie de tres estirpes de células cttlt-HSC humanas establecidas.

25 Como se muestra en la Figura 3, las estirpes de células cttlt-HSC humanas expandidas y crioconservadas conservaron un fenotipo de superficie estable que se representa. Se demostró que las células transducidas (es decir, GFP+) expresan altos niveles de CD34 (Fig. 3A-3C). En particular, las 3 estirpes de cttlt-HSC diferentes fueron un 5,23 %, un 5,09 % y un 4,03 % células GFPxCD34 dobles positivas. Estas 3 estirpes de cttlt-HSC también fueron un 25,3 %, un 94,7 y un 92,1 de células doble positivas para cKitxGFP (Fig. 3D-3F). Estas mismas 3 estirpes de cttlt-HSC también se mantuvieron muy bajas para los marcadores de linaje CD45, Flk-2 y CD150. Se muestra la caracterización por citometría de flujo de 1 de las estirpes cttlt-HSC que tenían un 12,3 % de células doble positivas para CD45xGFP (Fig. 3G), un 0,77 % de células doble positivas para Flk-2xGFP (Fig. 3H) y un 0,55 % de células doble positivas para CD150xGFP (Fig. 3I); así como B220, CD19 y otros marcadores de linaje (thy1.2, Gr-1, Mac-1 y Ter-119). Si bien puede existir determinada heterogeneidad en términos de niveles de expresión de marcadores de superficie entre las tres estirpes de células cttlt-HSC humanas diferentes establecidas, se cree que la heterogeneidad es el resultado de la heterogeneidad inherente publicada anteriormente en el compartimento de HSC de adulto (McKenzie et al., *Nat Immunol* 7, 1225-33, 2006).

40 Con el fin de examinar la pluripotencia de las estirpes de células cttlt-HSC humanas establecidas, se usó un modelo de xenotrasplante conocido (Dick et al., *Stem Cells* 15 Supl 1, 199-203, 1997). Este modelo implica la irradiación de ratones NOD/SCID/ $\beta 2M^{-/-}$ y el trasplante de cttlt-HSC en ratones irradiados. Las cohortes de ratones NOD/SCID/ $\beta 2M^{-/-}$ se irradiaron de forma subletal (300 rads) y se trasplantaron 10^4 células cttlt-HSC humanas CD34+ a los ratones. Las células se mantuvieron en cultivo durante 10 semanas antes del trasplante. Los ratones se desangraron a las 6 o 12 semanas después del trasplante. Los linfocitos presentes en la sangre periférica de los ratones NOD/SCID/ $\beta 2M^{-/-}$ quiméricos humanizados se tiñeron con anticuerpos específicos para antígenos de leucocitos humanos. Específicamente, las muestras se tiñeron con anticuerpos contra CD19, CD20 y CD3.

50 Como se muestra en la Figura 4, se detectaron células B humanas (células hlgM+) y linfocitos T CD45+ humanos en la sangre periférica de los ratones quiméricos NOD/SCID/ $\beta 2M^{-/-}$, en comparación con un ratón de control que no recibió trasplante de células madre. En particular, la sangre periférica del ratón de control tenía un 0,075 % de células hlgM+/hCD45+ (Fig. 4A), la sangre periférica de un primer ratón quimérico tenía un 31 % de células hlgM+/hCD45+ (Fig. 4B), la sangre periférica de un segundo ratón quimérico tenía un 77,1 % de células hlgM+/hCD45+ (Fig. 4C) y la sangre periférica de un tercer ratón quimérico tenía un 49,5 % de células hlgM+/hCD45+ (Fig. 4B).

Ejemplo 5: Generación *in vitro* de GR maduros a partir de cttlt-HSC humanas

60 La capacidad de las cttlt-HSC humanas para generar GR maduros *in vitro* se demostró usando los marcadores de superficie bien establecidos del linaje eritroide. Las cttlt-HSC humanas se incubaron en medio líquido (medio Stemline II) y se trataron con EPO e IL-3 durante 12 días. Como se muestra en la Figura 5, el análisis por tinción con H y E 10 días después de sembrar los cultivos con EPO e IL-3 mostró un gran número de células enucleadas en cultivo. El examen de poblaciones de células enucleadas mediante citometría de flujo mostró una población de células que expresaban marcadores de superficie de células eritroides Glicoforina A, CD71 y CD41. Adicionalmente, estas células carecían de la expresión de CD45 o la expresión de otros marcadores de linaje no eritroide.

65 En particular, la Figura 5A muestra la tinción con H y E de sangre periférica de ratón de control. La Figura 5B

muestra la tinción con H y E de sangre primaria de cordón umbilical humano. Las Figuras 5C, 5D y 5E muestran la tinción con H y E de tres estirpes celulares de sangre de cordón umbilical transformadas de forma condicional que se trataron durante 12 días con IL-3 y EPO; y la Figura 5F muestra una vista ampliada de las células de la Figura 5E para mostrar la morfología de los glóbulos rojos.

Ejemplo 6: Caracterización funcional *in vivo* de GR humanos derivados de cttlt-HSC

La funcionalidad de los GR generados *in vitro* a partir de cttlt-HSC se determinó sometiendo a ensayo su capacidad para rescatar ratones de anemias letales. Como se usaban GR humanos, los ratones elegidos para estos experimentos fueron ratones inmunocomprometidos. Se usaron dos cepas diferentes de ratones inmunocomprometidos para estos estudios. Estas dos cepas de ratones se usan generalmente para dichos estudios (Hogan et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 3, 236-46, 1997). Las dos cepas son ratones NOD/SCID y ratones Rag-1^{-/-}/γc^{-/-}. El principio operativo para los estudios funcionales *in vivo* fue inducir alguna forma de anemia que de otro modo sería letal en los ratones, a menos que se les proporcione una población funcional de GR.

Un protocolo que se usó se adaptó de Hiroyama (véase, Hiroyama, *PLoS One* 2, e1544, 2008). Este protocolo usa fenilhidrazina para inducir anemia por hemólisis *in vivo*. Los ratones tratados reciben GR al día siguiente o no reciben tratamiento adicional. Le sigue una segunda inyección de fármaco 4 días después. Si no se proporcionan GR funcionales después de la primera ronda de hemólisis inducida químicamente, los animales mueren poco después de la segunda ronda y la prueba de provocación resulta letal. Si se proporcionan GR funcionales, los ratones se rescatan de la prueba de provocación anémica letal.

Diez días después de la siembra inicial, se derivaron 10⁷ GR humanos *in vitro* de poblaciones de cttlt-HSC humanas usando los métodos que se describen en el presente documento. Se obtuvo una cohorte de ratones NOD/SCID y se trataron con 80 mg/kg de fenilhidrazina el día 0. En el día 1, se transfirieron los 10⁷ GR humanos mediante inyección en la vena de la cola a la mitad de la cohorte de ratones tratados. La segunda prueba de provocación con fenilhidrazina se realizó el día 6. Los ratones se observaron después para determinar la supervivencia durante 9 días después de la segunda prueba de provocación con fenilhidrazina.

Como se muestra en la Figura 6, los GR humanos derivados de cttlt-HSC fueron capaces de rescatar a los ratones de una anemia letal inducida químicamente. En particular, solo aproximadamente el 20 % de los ratones tratados con fenilhidrazina (Fenil) pero no con GR derivados de cttlt-HSC humanas (Sin TA) sobrevivieron, mientras que el 100 % de los ratones tratados con fenilhidrazina (Fenil) y GR derivados de cttlt-HSC humanas (TA) sobrevivieron (Fig. 6). Esto fue comparable a los ratones de tipo silvestre que no fueron tratados con fenilhidrazina (TS).

Otro método que se usó para someter a ensayo la funcionalidad *in vivo* de los GR humanos derivados de cttlt-HSC incluyó un protocolo que normalmente se usa para evaluar la homeostasis de GR. En este caso, los ratones se desangraron exhaustivamente (500 μl o aproximadamente el 17 % del volumen total de sangre) y después se dejaron en el vivero para su observación. Sin embargo, se descubrió que los ratones normales se recuperaron de esta lesión sin intervención adicional. Por tanto, se razonó que con el fin de retrasar la recuperación del compartimento de los GR del choque hemorrágico, los progenitores eritroides tendrían que estar incapacitados.

En consecuencia, con el fin de afectar a la velocidad de recuperación de GR, los ratones inmunocomprometidos se irradiaron de forma subletal con 450 rads antes de 400 μl de sangrado de cola. En este caso, los ratones murieron a las 48 horas a menos que se proporcionara una transfusión de 1x10⁷ células eritroides a través de una inyección en la vena de la cola. Esta forma de anemia letal se indujo en una cohorte de ratones Rag-1^{-/-}/γc^{-/-}, recibiendo la mitad de la cohorte 1x10⁷ células eritroides derivadas *in vitro* de poblaciones de cttlt-HSC humanas usando métodos que se describen en el presente documento. Los ratones se controlaron para determinar la supervivencia durante 9 días después de la inducción de la anemia aguda y el trasplante de células eritroides. Como se muestra en la Figura 7, los GR humanos derivados de cttlt-HSC *in vitro* pudieron rescatar a los ratones Rag-1^{-/-}/γc^{-/-} de la anemia letal inducida por lesión combinada. En particular, solo aproximadamente el 10 % de los ratones Rag-1^{-/-}/γc^{-/-} sobrevivieron a la anemia letal inducida por la lesión combinada (Trauma sin TA), mientras que el 100 % de los ratones rescatados con GR derivados de cttlt-HSC humanas (Trauma TA) sobrevivieron (Fig. 7). Esto fue comparable a los ratones de tipo silvestre que no fueron sometidos a la anemia letal (TS) combinada inducida por lesión.

Ejemplo 7: Transducción directa de proteínas de las proteínas de fusión TAT-MYC y TAT-Bcl-2 en HSC

Uno de los riesgos asociados al enfoque de utilizar MYC-ER y/o Bcl-2-ER para generar estirpes de células cttlt-HSC es la Integración aleatoria de secuencias víricas en el genoma de las células hospedadoras. Esto es preocupante, ya que la persistencia de cualesquier cttlt-HSC nucleadas en las preparaciones de GR para transfusión puede representar un riesgo no deseado para los pacientes que reciben esas células. Los experimentos que se describen en este ejemplo demuestran un enfoque alternativo para generar estirpes de células cttlt-HSC sin introducir secuencias víricas en el genoma de las células hospedadoras.

Para introducir proteínas en las células sin manipulación genética (es decir, transducción vírica), este enfoque alternativo se basa en la capacidad de la proteína TAT del VIH-1 (TAT) para cruzar las membranas biológicas y

entregar una carga de proteína en las células (Schwarze et al., *Trend Pharmacol Sci* 21, 45-8, 2000). Se generaron varios plásmidos que codificaban fragmentos de TAT fusionados con MYC o Bcl-2. Los plásmidos se transformaron después en células bacterianas y las células se indujeron con IPTG durante el crecimiento en fase logarítmica. Las células inducidas se recogieron 3 horas más tarde y las proteínas se purificaron en una columna de níquel. Las fracciones se analizaron después mediante un ensayo de Bradford para determinar el contenido de proteínas y se ejecutaron en un gel SDS-PAGE que se tiñó con azul de Commassie (Fig. 8). Como se muestra en la Figura 8A, las fracciones E2-E11 contenían TAT-MYC, conteniendo las fracciones E3-E5 la mayor cantidad de TAT-MYC. Como se muestra en la Figura 8B, las fracciones E1-E6 contenían TAT-Bcl-2, conteniendo la fracción E2 la mayor cantidad de TAT-Bcl-2.

La noción de usar TAT-MYC y TAT-Bcl-2 para transducir directamente las Lt-HSC murinas se sometió a ensayo con el fin de generar estirpes de células pttt-HSC sin transducción génica retroviral de MYC-ER y Bcl-2. Se recogieron HSC enriquecidas con 5FU de la médula ósea de ratones C57/BL6 y se incubaron en un medio que se complementó con IL-3, IL-6 y SCF recombinantes. Adicionalmente, las células se incubaron con 5 ug/ml de proteínas TAT-MYC y 10 ug/ml de proteínas TAT-Bcl-2 recombinantes purificadas que se prepararon en condiciones de endotoxinas bajas. El medio y las proteínas de fusión de TAT se reemplazaron cada 48 horas y las células se mantuvieron en cultivo durante 21 días. Después se usó una alícuota de la estirpe de células pttt-HSC para caracterizar el fenotipo de la estirpe de células pttt-HSC murinas mediante citometría de flujo. Las células se tiñeron con anticuerpos contra los marcadores de células madre c-kit y sca-1, así como los marcadores de linaje CD3, B220 y Ter119. Como se muestra en la Figura 9, la población de células c-kit⁺, sca-1⁺, lin⁻ en estos cultivos se expandió preferentemente. Este es un fenotipo similar con respecto al que se observa en las LT-HSC murinas primarias (Cheshier et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 3120-3125, 1999). En particular, el 77,5 % de las células eran c-kit⁺ y sca-1⁺ (Fig. 9B), mientras que el 98,1 % eran CD3⁻ y B220⁻ (Fig. 9C) y el 99,4 % de las células eran Ter119⁻ (Fig. 9D).

Para caracterizar la pluripotencia *in vivo* de la estirpe de células pttt-HSC derivadas de TAT-MYC y TAT-Bcl-2, se trasplantaron 10⁴ células en ratones Rag-1^{-/-} irradiados de forma subletal. Cuatro semanas después del trasplante, se extrajo sangre periférica de los ratones receptores mediante venopunción. Las CMSP se evaluaron después por citometría de flujo para determinar los marcadores de células B B220 e IgM y los marcadores de linfocitos T CD4, CD8 y TCRβ. Las células teñidas se compararon con células sin teñir. Como se muestra en la Figura 10, el trasplante de la estirpe de células pttt-HSC murinas en los ratones Rag-1^{-/-} irradiados de forma subletal dio como resultado la reconstitución del compartimento linfóide. En particular, aproximadamente el 10,7 % de las CMSP eran B220⁺ e IgM⁺ en comparación con el 0 % en el ratón Rag-1^{-/-} de control (Fig. 10B); aproximadamente el 13,5 % de las CMSP eran CD4⁺ y TCRβ⁺ en comparación con aproximadamente el 0,09 % en el ratón Rag-1^{-/-} de control (Fig. 10C); y aproximadamente el 6,8 % de las CMSP eran CD8⁺ y TCRβ⁺ en comparación con aproximadamente el 0,011 % en el ratón Rag-1^{-/-} de control (Fig. 10D).

Ejemplo 8: Desarrollo de GR a partir de pttt-HSC murinas transducidas con proteínas de fusión TAT-MYC y TAT-Bcl-2

También se derivaron GR anucleados maduros de estirpes de células pttt-HSC murinas generadas por transducción con proteínas de fusión TAT-MYC y TAT-Bcl-2, de forma similar a lo que se observó con las cttt-HSC humanas (Fig. 5). En este experimento, las pttt-HSC murinas se cultivaron tanto en presencia como en ausencia de IL-3, EPO y TAT-MYC. Después de 10 días de cultivo, se evaluó la diferenciación celular mediante tinción con H y E (Fig. 11). Se descubrió que las pttt-HSC murinas tratadas con IL-3, EPO y TAT-MYC dieron como resultado una gran frecuencia de GR murinos enucleados (Fig. 11B y 11C), mientras que las células de control no se diferenciaron en GR (Fig. 11A). Además, los GR murinos se caracterizaron por citometría de flujo y se descubrió que expresaban niveles aumentados de Glucoforina A y niveles reducidos de CD71.

Ejemplo 9: Generación de glóbulos rojos derivados de pttt-HSC humana

El siguiente ejemplo describe la producción y caracterización *in vitro* de glóbulos rojos enucleados maduros humanos, a partir de una estirpe de células HSC de largo plazo transducidas con proteína (pttt-HSC) humanas. De forma ventajosa, los glóbulos rojos humanos pueden producirse de manera fiable en 10 días en condiciones de cultivo que no requieren el uso de HSC modificadas genéticamente, suero animal o células alimentadoras de animales. Adicionalmente, los glóbulos rojos producidos son glóbulos rojos humanos completamente diferenciados y maduros que están enucleados, expresan Glucoforina A (GPA) y tienen niveles reducidos de CD71 y hemoglobina fetal. El marcador CD71 es el receptor de la transferrina, que normalmente se expresa en niveles altos en las células progenitoras de eritrocitos (es decir, glóbulos rojos), pero está regulado negativamente en los glóbulos rojos maduros. El marcador GPA se expresa habitualmente en niveles altos en eritrocitos maduros como signo de maduración de la membrana.

Producción *in vitro* y expansión de la estirpe de células pttt-HSC

Se han descrito anteriormente células madre hematopoyéticas inmortalizadas de forma condicional transgénicas y transducidas con proteínas (referencias). En este experimento, se produjeron estirpes de células pttt-HSC usando transducción de proteínas con proteínas de fusión TAT-MYC y TAT-Bcl-2 como se ha descrito anteriormente. Estas

proteínas de fusión contienen un péptido TAT derivado de la proteína TAT del VIH-1 (TAT).

Se obtuvo una unidad de sangre de cordón umbilical humano de un banco de sangre de cordón local. La población de células nucleadas de la sangre de cordón umbilical se aisló después diluyendo las células 1:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se superpusieron 20 ml de células de sangre de cordón umbilical diluidas suavemente sobre 20 ml de Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences). Las células se centrifugaron a una gravedad de 900 x durante 60 minutos. Después del centrifugado, la capa leucocítica se retiró con una pipeta de vidrio y se lavó dos veces con PBS. Las células después se volvieron a suspender y se cultivaron en medio de Dulbecco modificado de Iscove complementado con plasma humano al 15 %, Pen/Estrep 100 unidades por ml, IL-3 20 ng/ml, IL-6 50 ng/ml, factor de células madre 50 ng/ml, GM-CSF 20 ng/ml, TPO 20 ng/ml, Flt3-L 20 ng/ml, TAT-MYC 5 µg/ml y TAT-Bcl-2 5 µg/ml.

La población celular inicial (Día 0) fue del 0,12 % de CD34⁺/CD38^{lo}. Después de 3 días en cultivo, la frecuencia de células CD34⁺/CD38^{lo} había aumentado al 1,24 % (Fig. 12A). Después de 14 días en cultivo, el 45,2 % de la población celular era CD34⁺/CD38^{lo} (Fig. 12B). Por otra parte, hubo un aumento neto en el número total de células después de 14 días en cultivo. Las HSC formaron una estirpe celular después de expandirse en cultivo durante 21 días en presencia de TAT-MYC y TAT-Bcl-2. Esta estirpe celular se designó como una estirpe de células HSC de largo plazo transducidas con proteínas (ptlt-HSC). Esta estirpe celular se usó como fuente de células para la diferenciación y caracterización de glóbulos rojos (GR).

Producción *in vitro* de GR derivados de ptlt-HSC

Las ptlt-HSC humanas producidas *in vitro* se usaron para producir GR humanos enucleados y maduros. Después estos GR humanos derivados de ptlt-HSC se caracterizaron. El análisis por FACS se usó para medir los niveles de expresión y los patrones de Glucoforina A (GPA) humana, CD71 (receptor de transferrina) humano y hemoglobina fetal humana.

La diferenciación de los glóbulos rojos se induce mediante el cultivo de ptlt-HSC derivadas de sangre de cordón umbilical en medio DMEM complementado con IL-3 3,2 ng/ml y EPO 100 unidades/ml, así como plasma humano al 15 % y Pen/Estrep 100 unidades por ml. Las células se cultivaron después durante al menos 9 días.

Como se muestra en la Figura 13, tras la transferencia del cultivo de ptlt-HSC a condiciones de diferenciación de GR (IL-3 y EPO), las células comenzaron a expresar GPA y CD71 a niveles altos después de 4 días. Las células mantenidas en medio que contenía TAT-MYC y TAT-Bcl2, pero que carecía de IL-3 y EPO, no mostraron estos cambios (Figura 12). Se usó una muestra del cultivo para el análisis por FACS de la expresión en la superficie celular de Glucoforina A (GPA) y CD71 (receptor de transferrina). Como se muestra en la Figura 13, se tiñeron ptlt-HSC inducidas en el programa de diferenciación de GR mediante el cultivo en presencia de IL-3 y EPO para determinar la expresión de GPA y CD71 y se compararon con células sin teñir y ptlt-HSC cultivadas en un medio neutro que contenía TAT-MYC y TAT-Bcl2, pero que carecía de IL-3 y EPO. Los resultados muestran que el día 4 de cultivo con IL-3 y EPO, aproximadamente el 42 % de las células eran CD71⁺/GPA⁺ (Fig. 13C), en comparación con aproximadamente el 0,366 % de células CD71⁺/GPA⁺ en el control sin teñir (Fig. 13A) y aproximadamente el 0,222 % de células CD71⁺/GPA⁺ que se cultivaron durante 4 días en medio neutros (Fig. 13B).

Adicionalmente, 9 días después de la transición de ptlt-HSC a un cultivo de diferenciación, los GR en desarrollo comenzaron a reducir su expresión del receptor de transferrina (CD71), mientras que conservaban altos niveles de GPA en su superficie (Fig. 14). Este cambio en la expresión de CD71 fue simultáneo a un aumento en la frecuencia de glóbulos rojos enucleados en el cultivo (Fig. 14 y 15). Las células también se tiñeron para determinar la hemoglobina fetal.

La Figura 14 muestra que a medida que los GR en desarrollo cambian de GPA/CD71 doble positivo a GPA⁺/CD71^{lo}, también pasan de expresar niveles altos de hemoglobina fetal humana a niveles bajos de hemoglobina fetal. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se cree que las células GPA⁺/CD71^{lo} que tienen niveles bajos de hemoglobina fetal tienen niveles correspondientemente altos de hemoglobina de adulto.

El análisis por FACS de células de los cultivos de diferenciación de GR se realizó en tres puntos temporales después de la inducción (día 7, día 12 y día 22). El análisis por FACS midió la expresión en la superficie celular de GPA y CD71. Las células también se controlaron para determinar la expresión de hemoglobina fetal y de adulto. Se usaron GR humanos primarios obtenidos de sangre periférica como control positivo (Fig. 14; Fila superior del control). Los resultados muestran que en el día 7, hubo muchas células doble positivas para GPA/CD71 (Fig. 14; primer panel parte superior). Los resultados también muestran que para el día 12, las células habían cambiado principalmente a GPA⁺/CD71^{lo} (Fig. 14; segundo panel parte superior). Las células del día 12 también expresaron niveles altos de hemoglobina fetal (Fig. 14; segundo panel parte inferior). El día 22 en el medio de diferenciación, las células seguían siendo GPA⁺/CD71^{lo}, pero tenían niveles de expresión de hemoglobina fetal regulados negativamente y expresión aumentada de hemoglobina de adulto (Fig. 14; tercer panel parte superior e inferior). Estos cambios dinámicos de la expresión del marcador de maduración fueron coherentes con los cambios observados en la médula ósea durante la diferenciación normal de GR en seres humanos y ratones. En particular, después de 7 días de cultivo de las células

ptlt-HSC en cultivo de inducción (IL-3 y EPO), aproximadamente el 60,9 % de las células eran GPA+/CD71+, aproximadamente el 1 % de las células eran GPA+/CD71- y el 71,4 % de las células expresaban hemoglobina fetal (Fig. 14B). Después de 22 días de cultivo de las células ptlt-HSC en cultivo de inducción (IL-3 y EPO), las GPA+/CD71+ habían cambiado a GPA+/CD71-. Similar al control de sangre, el 76 % de las células positivas para GPA expresaban hemoglobina de adulto y solo el 20,3 % de las células expresaban hemoglobina fetal (Fig. 14; fila inferior del 2º y 3º panel).

Adicionalmente, el análisis histológico de enucleación en cultivo se realizó mediante tinción de muestras de cultivo de diferenciación de GR el día 3 y el día 7 con H y E (Fig. 15). Las células se colocaron en un portaobjetos usando un aparato de citocentrifugación. Los portaobjetos se tiñeron con H y E y se obtuvieron fotografías usando un microscopio invertido y fotografía óptica. La aparición de células pequeñas enucleadas se observa tan pronto como el día 3 (Fig. 15A), observándose un mayor número el día 7 (Fig. 15B).

Ejemplo 10: Producción aumentada a escala de glóbulos rojos derivados de ptlt-HSC

El siguiente ejemplo describe el aumento a escala de la producción *in vitro* de glóbulos rojos derivados de ptlt-HSC humanas a niveles de producción clínicamente pertinentes.

Producción de GR derivados de ptlt-HSC en bolsa permeable a gases

También se usó una bolsa permeable a gases para aumentar a escala la producción de GR derivados de ptlt-HSC humanas *in vitro* (Fig. 16).

Se optimizó una bolsa permeable a gases con un recubrimiento a base de teflón en el lado de contacto con las células para la producción *in vitro* de los GR derivados de ptlt-HSC (Fig. 16A). El cultivo se inició con ptlt-HSC humanas que se incubaron en condiciones neutras, con TAT-MYC y TAT-Bcl-2, durante 5 días en una bolsa permeable a gases (Origene). El cultivo se cambió después a un medio que contenía IL-3 y EPO con el fin de inducir la diferenciación de GR. La foto que se muestra en la Figura 16A se tomó después de 4 días de incubación en el medio de diferenciación de GR. La Figura 16B muestra la maduración y enucleación de GR en las bolsas de cultivo permeables a gases. Se tomaron muestras de células de la bolsa que se muestra en la Figura 16A y se fijaron a un portaobjetos de vidrio con un aparato de citocentrifugación. El portaobjetos se tiñó después con H y E y se obtuvo una fotografía usando un microscopio invertido y fotografía óptica.

Pase en serie de cultivo de diferenciación de ptlt-HSC *in vitro*

Este ejemplo describe la cantidad de tiempo que las ptlt-HSC cultivadas en medio de diferenciación de GR pueden continuar produciendo GR *in vitro*. Este es un factor importante en el desarrollo de un proceso para producir una cantidad clínicamente pertinente de GR para transfusión humana (10^{11} células/unidad).

El primer conjunto de experimentos implica el pase en serie de ptlt-HSC en condiciones de diferenciación eritroide (es decir, cultivadas con IL-3 y EPO) *in vitro*. Las Ctl-HSC se cultivan en placas a densidades de 3×10^6 , 10^6 , 3×10^5 y 10^5 en una placa de 6 pocillos. Las células se cultivan en medio de Dulbecco modificado de Iscove complementado con plasma humano al 10 %, Pen/Estrep 100 unidades por ml, IL-3 20 ng/ml, IL-6 50 ng/ml, factor de células madre 50 ng/ml, GM-CSF 20 ng/ml, TPO 20 ng/ml y Flt3-L 20 ng/ml. La población de ptlt-HSC de partida se tiñe después para determinar HSC humana y marcadores eritroides (GPA, CD71 y hemoglobina fetal). Los cultivos se controlan visualmente y mediante análisis por FACS para determinar el desarrollo de GR maduros. Se retira una parte alícuota de las células 10 días después de que los cultivos iniciales se establezcan y se centrifugan a través de un gradiente de Ficoll con el fin de separar las células vivas nucleadas de los GR. Ambas fracciones de células se analizan por FACS para determinar la expresión de marcadores de superficie celular de HSC y linajes eritroides. Un enfoque similar también se usa para el análisis de los cultivos al final de cada ciclo de 10 días.

Las células nucleadas presentes en la interfase del gradiente de Ficoll se lavan en PBS fresco y medio y se cultivan en placa nuevamente en las mismas condiciones. Se demostró que al menos una estirpe de células cllt-HSC era capaz de generar GR maduros después de tres pases en serie, comenzando con una concentración única de cllt-HSC. En algunas realizaciones, las estirpes de cllt-HSC se expanden y después se exponen a medio de diferenciación de glóbulos rojos en presencia de PTD-Myc. Después, los glóbulos rojos se separan en aproximadamente 9 a 28 días, las células que no son glóbulos rojos restantes se colocan nuevamente en medio de diferenciación y los glóbulos rojos se separan en aproximadamente 9 a 28 días. Este proceso puede repetirse al menos 3 veces y se espera que continúe indefinidamente.

Los resultados sugieren que los progenitores eritroides derivados de ptlt-HSC pueden continuar produciendo GR durante 2-4 pases.

Producción a gran escala de GR derivados de ptlt-HSC en un sistema de biorreactor de cultivo

Este ejemplo describe el ensayo de cuatro sistemas diferentes para la producción *in vitro* a gran escala de GR

humanos enucleados maduros a partir de pttt-HSC.

Se sometieron a ensayo dos sistemas inicialmente (un recipiente de plástico flexible diseñado para cultivo celular y una bolsa permeable a gases). Los resultados con estos sistemas mostraron que la producción de glóbulos rojos humanos a gran escala puede optimizarse mediante cambios de diseño en los vasos de cultivo de tejidos y alteraciones de las condiciones de cultivo.

Con el fin de considerar enfoques más eficientes para la generación de grandes números de GR, el protocolo de una sola etapa descrito anteriormente para producir GR *in vitro* a partir de pttt-HSC humanas se adapta a biorreactores de matraz de agitación (por ejemplo, micro biorreactor Ambr de TAP Biosystems e Integrity PadReactor de ATMI), bolsas permeables a gases (sistema Origene), matraces de cultivo de tejidos permeables a gases (matraces permeables al oxígeno de Wilson Wolf G-rex) o recipientes de plástico flexibles diseñados para el cultivo de células (sistema GE Wave). Estos experimentos determinan la viabilidad de la producción a gran escala de GR humanos *in vitro* a partir de pttt-HSC.

El protocolo básico utilizado para generar GR *in vitro* a partir de pttt-HSC humanas comienza con la obtención de HSC derivadas de sangre de cordón umbilical. La población de células nucleadas de la sangre de cordón umbilical se aísla diluyendo las células 1:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se superpusieron 20 ml de células de sangre de cordón umbilical diluidas suavemente sobre 20 ml de Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences). Las células después se centrifugan a una gravedad de 900 x durante 60 minutos. Después del centrifugado, la capa leucocítica se retira con una pipeta de vidrio y se lava dos veces con PBS. Las células se vuelven a suspender después en medio de Dulbecco modificado de Iscove complementado con albúmina humana al 10 %, Pen/Estrep 100 unidades por ml, IL-3 20 ng/ml, IL-6 50 ng/ml, factor de células madre 50 ng/ml, GM-CSF 20 ng/ml, TPO 20 ng/ml, Flt3-L 20 ng/ml, TAT-MYC 5 µg/ml y TAT-Bcl2 5 µg/ml. Las células se mantienen en estas condiciones de cultivo durante 12-30 días, dependiendo del grado de enriquecimiento deseado para la población CD34+/CD38-, así como el número total de células necesario. La diferenciación de glóbulos rojos se induce cuando el medio se cambia a DMEM complementado con albúmina humana al 15 %, Pen/Estrep 100 unidades por ml, IL-3 20 ng/ml y EPO 3,2 unidades/ml. Las células se cultivan durante 11 días adicionales. Las células se controlan después para determinar la diferenciación de GR mediante FACS usando anticuerpos contra GPA, CD71 y hemoglobina fetal. También se realiza tinción histológica con H y E.

El protocolo de producción de GR *in vitro* se adapta para la producción a gran escala en un biorreactor basado en matraz de agitación que se usó anteriormente para cultivar grandes cantidades de células hematopoyéticas humanas derivadas de unidades de sangre de cordón umbilical. Este sistema implica el uso de dos sistemas diferentes de biorreactores de matraz de agitación. En primer lugar, se usa el sistema de micro biorreactor Ambr (TAP Biosystems). Este es un aparato que lleva cultivos de 10-15 ml en condiciones de matraces de agitación que imitan las características de los biorreactores clásicos, a pequeña escala. Este instrumento usa cámaras de micro reactores desechables y se controla de manera automatizada. Una de las ventajas clave es que permite el cultivo simultáneo de 24 condiciones diferentes (*Genetic Engineering and Biotechnology News*, 1 de noviembre de 2010, Vol. 30, N. 19). Este enfoque permite la rápida optimización y adaptación de las condiciones *in vivo* para el desarrollo de GR a un formato basado en biorreactor. Una vez que se optimizan las condiciones, el proceso pasa a un sistema a gran escala (Integrity PadReactor, ATMI). El sistema Pad-Reactor es un biorreactor de un solo uso que se compone de una unidad de accionamiento, que permite al usuario cultivar simultáneamente células en bolsas de diferentes volúmenes, un tanque móvil, que soporta la bolsa en la que las células crecen y que puede moverse en los espacios de fabricación modular, así como el vaso del biorreactor, que es una bolsa de células de un solo uso que contiene una paleta y permite la mezcla no invasiva a medida que la paleta gira dentro de la bolsa. Este sistema proporciona una mezcla mejorada con fuerzas de cizalla reducidas, es útil para las células en suspensión y puede cultivar las células en un volumen bajo.

50 *Bolsas permeables a gases*

Como se ha descrito anteriormente, se usó una bolsa permeable a gases básica (Origene) para producir GR *in vitro*. Estas bolsas tienen un recubrimiento de teflón interior que también puede intercambiar gas de toda el área de superficie del recipiente. Sin embargo, el sistema puede optimizarse para proporcionar continuamente cambios de medio una vez que las células alcancen una densidad crítica. En consecuencia, puede diseñarse un nuevo sistema que permita el flujo continuo de medio en un sistema de bolsa permeable a gases de dos cámaras. Además de minimizar la pérdida de células, el sistema también puede proporcionar un sistema de flujo continuo donde el medio y los desechos se perfunden a través de la cámara exterior. Este sistema también permite el cambio de cultivos de pttt-HSC a partir de condiciones de crecimiento de HSC a condiciones de diferenciación de GR.

Las pttt-HSC se someten a ensayo para determinar si las células son capaces de propagarse en el sistema de bolsa doble. La bolsa se siembra con 10⁷ pttt-HSC humanas y se mantiene en medio Dulbecco modificado de Iscove complementado con albúmina humana al 10 %, Pen/Estrep 100 unidades por ml, IL-3 20 ng/ml, IL-6 50 ng/ml, factor de células madre 50 ng/ml, GM-CSF 20 ng/ml, TPO 20 ng/ml y Flt3-L 20 ng/ml junto con TAT-MYC y TAT-Bcl-2. Estas son condiciones neutras que permiten a las células pttt-HSC propagarse y conservar su pluripotencia. Las pttt-HSC de inicio después se tiñen con anticuerpos para marcadores de superficie de células madre humanas 10 días

más tarde y la magnitud de la expansión de las pttt-HSC se determina en estas condiciones.

Una vez que se ha sometido a ensayo la bolsa doble en el contexto de soportar la expansión de pttt-HSC en condiciones neutras, se sembrará un sistema de bolsa doble con pttt-HSC para la producción de GR. El tamaño de poro utilizado es del orden de un punto de corte de 5 kDa, para evitar que los GR se salgan durante el ciclo del medio. El sistema de bolsa doble se sembrará con 10^7 cttt-HSC y las células se cultivarán con medio de Dulbecco modificado de Iscove complementado con albúmina humana al 10 %, Pen/Estrep 100 unidades por ml, IL-3 20 ng/ml, IL-6 50 ng/ml, factor de células madre 50 ng/ml, GM-CSF 20 ng/ml, TPO 20 ng/ml y Flt3-L 20 ng/ml junto con TAT-MYC y TAT-Bcl-2. Después de 3 días en cultivo, el medio se cambia al Medio Dulbecco modificado de Iscove complementado con albúmina humana al 10 %, Pen/Estrep 100 unidades por ml, IL-3 20 ng/ml y EPO 50 ng/ml. Las muestras se recogen del biorreactor cada 3 días. Este marco temporal es el resultado de la necesidad de reponer parte del medio con medio que contiene citocinas. Las células recogidas se analizan después mediante recuento por FACS y microscopía como se describe en los Ejemplos anteriores. La producción total de GR se determina durante el período de tiempo (10-12 días) que se indica que el sistema de bolsa doble es compatible con la expansión celular. Además, también se determina el destino de las pttt-HSC que se usaron para inocular el cartucho el día 1. Idealmente, las pttt-HSC permanecen activas durante 2 a 4 rondas de cultivo en el sistema de bolsa doble, de manera que los GR pueden recogerse y las pttt-HSC restantes pueden volverse a sembrar en medio recién preparado para generar GR adicionales. Se usan métodos de centrifugación continua utilizados actualmente para la separación de los GR de la sangre periférica obtenida de pacientes para recoger los GR generados en el sistema de bolsa doble.

Recipientes de bolsa de plástico flexible

Como se ha descrito anteriormente, también se usó un recipiente de bolsa de plástico flexible diseñado para el cultivo celular (GE Wave) para producir GR *in vitro*. Sin embargo, el sistema puede optimizarse para reducir la diferenciación prematura e incontrolada de la población inicial de pttt-HSC.

Una gran cantidad de pttt-HSC obtenidas de cultivos estáticos en matraces de cultivo tisular con ventilación convencionales se transfiere a un medio de diferenciación de GR cuando se coloca en el recipiente de bolsa de plástico flexible. Las tasas de enucleación y cinética de maduración de los GR se examinan usando análisis por FACS para medir los niveles de expresión de CD71, GPA y hemoglobina fetal. También se usa análisis histológico para verificar el estado de maduración. El interior del recipiente de plástico flexible se recubre con una pequeña cantidad de pttt-HSC que se expanden y se cambian a medio de diferenciación de GR en el mismo vaso.

Matraz de cultivo tisular permeable a gases

Además de experimentar con dos sistemas diferentes de biorreactores basados en bolsas y un aparato de matraz de agitación, se somete a ensayo un matraz de cultivo tisular permeable a gases para aumentar a escala la producción de pttt-HSC y GR.

Un matraz permeable a gases (Wilson Wolf) se somete a ensayo tanto la producción a escala de un pequeño número de pttt-HSC en un número clínicamente pertinente de células, como la diferenciación regulada de pttt-HSC en GR. Todo el procedimiento se realiza en un solo matraz. El matraz proporciona a las células un mejor acceso al oxígeno y a los nutrientes que los dispositivos existentes. Además, el matraz es mucho más fácil de usar. El matraz actúa en una incubadora convencional y usa equipo de laboratorio convencional. El fondo del matraz está hecho de una membrana permeable a gases de di-metil silicona única que proporciona una mejor permeabilidad al oxígeno que cualquier dispositivo existente permeable a gases (Laptev y ad Ver, *Stem Cells Int*, Epub 11 de septiembre de 2011). Las células gravitan hacia esta membrana permeable a gases, donde se sumergen a una profundidad de medio muy superior a lo que pueden permitir los dispositivos existentes. En estas condiciones, las células reciben oxígeno y nutrientes a demanda sin ser sometidas a alimentación frecuente ni a ninguna perturbación del equipo de mezcla del medio.

Ejemplo 11: Caracterización *in vitro* e *in vivo* de estirpes de células pttt-HSC humanas

El siguiente ejemplo describe la caracterización de los fenotipos de superficie y la pluripotencia *in vitro* e *in vivo* de las estirpes de células pttt-HSC humanas producidas en el Ejemplo 9. Los experimentos que se describe en esta sección determinan el potencial de linaje *in vitro* usando ensayos convencionales de diferenciación de metilcelulosa e *in vivo* usando modelos de ratón de xenotrasplantes.

Se usa un mínimo de 4 estirpes de células pttt-HSC humanas para los estudios que se analizan en este ejemplo. Las estirpes de células pttt-HSC humanas seleccionadas se eligen de acuerdo con los siguientes cuatro criterios. En primer lugar, las estirpes celulares tienen un fenotipo de superficie que se asemeja a las Lt-HSC primarias humanas (CD34+, CD133+, CD48+, CD150+, lin⁻). En segundo lugar, las pttt-HSC humanas se propagan vigorosamente en cultivo en las condiciones descritas en el Ejemplo 9 y conservan una dependencia de la TAT-MYC añadida exógenamente para la proliferación *in vitro*. En tercer lugar, las pttt-HSC humanas pueden recuperarse de la crioconservación de manera rápida, al tiempo que conservan su fenotipo de superficie y sus características de

crecimiento. En cuarto lugar, se selecciona una estirpe celular de cada uno de los siguientes genotipos: A rh-, B rh-, AB rh-, O rh- con el fin de generar un panel de pttt-HSC humanas que dan origen a las formas principales de los GR que se usan clínicamente.

- 5 Se sembraron diez, 10^2 o 10^3 estirpes de células pttt-HSC humanas en medio de diferenciación de metilcelulosa como se ha descrito anteriormente (Dick et al., *Stem Cells* 15 Supl 1, 199-203, 1997). Se usa específicamente medio que se complementa con citocinas destinadas a forzar la diferenciación de HSC hacia los linajes mieloides (Dick et al., *Stem Cells* 15 Supl 1, 199-203, 1997), linajes mioeritroides o linaje de células pre-B (Cheshier et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 3120-3125, 1999; y Hogan et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 3, 236-46, 1997). Después, las
- 10 placas se evalúan para determinar la formación de colonias en términos de número de colonias, morfología y cinética del desarrollo de colonias como medida de la frecuencia del precursor. Después se identifican estirpes celulares Pttt-HSC que son pluripotentes, según se define por su capacidad para originar colonias específicas en cada una de las diferentes condiciones sometidas a ensayo.
- 15 Una vez que se ha demostrado que las estirpes de células pttt-HSC en cuestión son competentes en su capacidad para originar múltiples linajes hematopoyéticos *in vitro*, se examina su pluripotencia *in vivo*. Estas células pttt-HSC se usan después para el trasplante en cohortes de 10 ratones NOD/SCID irradiados de forma subletal, como se hizo anteriormente con las Lt-HSC primarias humanas (Dick et al., *Stem Cells* 15 Supl 1, 199-203, 1997; y Hogan et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 3, 236-46, 1997). Los ratones irradiados reciben trasplantes de 10^4 pttt-HSC que se
- 20 han mantenido en las condiciones de cultivo descritas en el Ejemplo 9. Después, los ratones se desangran por punción venosa para recoger muestras de sangre periférica para su análisis. Los glóbulos rojos se lisan y las CMSP se tiñen para determinar CD3 y CD19 humanos. Una vez que se detectan células linfoides humanas en la sangre periférica, los ratones se sacrifican por asfixia con CO_2 y dislocación cervical. Después se extraen los ganglios linfáticos, el bazo, el timo y la médula ósea de los ratones. Se generan suspensiones de células individuales a partir
- 25 de los órganos y las células se tiñen con anticuerpos específicos contra CD3, CD19, CD4, CD8, Mac-1, Gr-1 y Ter-119 humanos. La detección de múltiples linajes de células hematopoyéticas humanas confirma la pluripotencia de las estirpes de células pttt-HSC humanas. Se incluyen dos controles. Para el control negativo, se usan ratones sin manipular o ratones que se irradian de forma subletal y a los que no se les proporciona un trasplante de células pttt-HSC humanas. Como control positivo, se usa una cohorte de ratones que se irradian de forma subletal y se
- 30 trasplantan con la estirpe de células cttt-HSC humanas generada en el Ejemplo 4.

Ejemplo 12: Análisis de los tipos de hemoglobina expresados en GR derivados de cttt-HSC

- 35 El siguiente ejemplo describe el estado de diferenciación (por ejemplo, el grado de diferenciación en el linaje eritroide y el estado de desarrollo) de los glóbulos rojos (GR) humanos producidos en el Ejemplo 9, determinando el tipo específico de hemoglobina (fetal, de adulto, etc.) de los GR.

- 40 La naturaleza de las hemoglobinas expresadas en los GR humanos generados en el Ejemplo 11 usando métodos que se describen en el presente documento se determina mediante dos enfoques paralelos. En primer lugar, se obtiene ARNm de los precursores de GR presentes en los cultivos utilizados para generar GR humanos. Además, también se usan GR humanos primarios obtenidos de un voluntario sano y anónimo como control positivo. Se incuban cttt-HSC humanas en medio Stemline II complementado con IL-3 y EPO, como se describe en el Ejemplo 7. Se recogen fracciones de células cada 48 horas durante 10 días. Una fracción de las células se usa para el análisis por citometría de flujo para determinar el fenotipo de la superficie celular y los marcadores de diferenciación
- 45 eritroides. Las células se tiñen para determinar CD71 y GPA humanos. El resto de las células en la muestra se usa para obtener ARNm para generar ADNc. Los ADNc resultantes se usan como moldes para RT-PCR semicuantitativa (Q-PCR) para tres genes de globina (hemoglobina α , β y γ) y dos genes constitutivos (β -actina y GAPDH). Se usan conjuntos de cebadores para amplificar las transcripciones de hemoglobina que normalmente se expresan en GR fetales. También se aísla ARNm del control positivo. Se espera que los GR humanos y sus células progenitoras
- 50 generadas *in vitro* a partir de cttt-HSC expresen genes de globina de adulto. Los resultados de ARNm se confirman usando anticuerpos monoclonales y análisis por FACS.

- 55 La presencia de proteínas de hemoglobina en los GR derivados de cttt-HSC se confirma mediante cromatografía de perfusión y HPLC, como se ha descrito anteriormente (Honig et al., *J Biol Chem* 265, 126-32, 1990). Los GR obtenidos de los cultivos *in vitro* descritos anteriormente se recogen y se lavan 3 veces en NaCl al 0,9 %, después se suspenden en 9 volúmenes de agua, se lisan con saponina y se aclaran por centrifugación a 600 x g. Se obtienen espectros de masas de globina usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF (desorción láser asistida por matriz/tiempo de vuelo de ionización) (Bruker Omnisflex), como se ha descrito anteriormente (Honig et al., *Am. J. Hematol* 34, 199-203, 1990). Se adquiere ZipTips a Millipore y se rellena con resinas C18 y C4 para preparar las
- 60 soluciones para el análisis por EM de péptidos y proteínas, respectivamente. Se usa ácido ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y ácido sinapínico (SA) se usan como matriz para el péptido y la proteína, respectivamente. Se usan alícuotas (1,3 ml) de la solución de matriz (3-10 mg de CHCA o SA en 1 ml de solución acuosa de acetonitrilo al 50 % que contiene TFA al 0,1 %) para eluir el péptido/proteína de ZipTips y aplicarlo puntualmente en el objetivo MALDI-TOF. Se usa un sistema de CL/EM/EM (módulos de HPLC Agilent serie 1200, interfaz Agilent HPLC Chip, espectrómetro de masas de Agilent 6510 Quadrupole Time-of-Flight) equipado con un láser de nitrógeno pulsado a 337 nm para analizar las muestras. La calibración de masa externa se realiza usando los picos de una mezcla de
- 65

citocromo c de paloma a m/z 12362, apomiglobina a m/z 16952 y adolasa (músculo de conejo) a m/z 39212.

Los niveles de ARNm para los genes de globina que normalmente se expresan en los GR fetales también se examinan para compararlos con los genes de globina expresados en los GR humanos derivados de cttlt-HSC.

Ejemplo 13: Análisis de características de unión a oxígeno de los GR humanos derivados de cttlt-HSC

El siguiente ejemplo describe la naturaleza funcional de las proteínas de hemoglobina expresadas en los glóbulos rojos humanos (GR) producidos en el Ejemplo 9, midiendo las curvas de equilibrio de oxígeno en los GR.

Las curvas de equilibrio de oxígeno se miden como se ha descrito anteriormente (Honig et al., *Am. J. Hematol* 34, 199-203, 1990; Maurer et al., *Nature* 227, 388-90, 1970; y Lee et al., *Rapid Commun Mass Spectrom* 19, 2629-35, 2005). El método que se usa es un método continuo que usa un espectrofotómetro de doble longitud de onda (Hemox analyzed, TCS). Los GR se suspenden en un tampón bis-Tris 50 mM que contiene NaCl 140 mM a 37 °C y pH 7,4. Las propiedades de unión de la hemoglobina se estudian mediante fotólisis ultrarrápida de soluciones en cubetas ópticas de 1 mm. En resumen, la cinética de la nueva unión de CO a los tetrámeros de hemoglobina intracelular se analiza a 436 nm después de la fotólisis con un pulso de 10 ns a 532 nm, como se ha descrito anteriormente (Honig et al., *Am. J. Hematol* 34, 199-203, 1990; Maurer et al., *Nature* 227, 388-90, 1970; y Lee et al., *Rapid Commun Mass Spectrom* 19, 2629-35, 2005).

También se analizan las características de unión al oxígeno de los GR humanos derivados de cttlt-HSC.

Ejemplo 14: Análisis de la forma celular y la flexibilidad de los GR humanos derivados de cttlt-HSC

El siguiente ejemplo describe la determinación de si los glóbulos rojos humanos (GR) producidos en el Ejemplo 9 pueden alargarse y actuar en el contexto de la microvasculatura *in vivo* mediante la medición de la flexibilidad de los GR.

La deformabilidad de los GR humanos derivados de cttlt-HSC y los GR primarios obtenidos a partir de sangre periférica se examina como se ha descrito anteriormente (Kaul et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, 2008). En resumen, se obtienen preparaciones de GR a partir de los cultivos de cttlt-HSC *in vitro* descritos en el Ejemplo 9 y de sangre periférica de un adulto sano y se pasan a través de un filtro para retirar leucocitos (Leucolab LCG2, Macopharma). Las células enucleadas después se examinan por ectacitometría. Los GR se suspenden en una solución de polivinilpirrolidina al 4 % y después se exponen a un gradiente osmótico creciente en el ectacitómetro (Technicon, Bayer) (de 60 a 450 mm). Se registra el cambio en la difracción láser de los GR en este escenario. La medición fotométrica produce una señal denominada índice de deformabilidad (ID). El análisis de las curvas de ID proporciona una medida de la deformabilidad dinámica de la membrana celular en función de la osmolaridad a una tensión de cizalla aplicada constante de 170 dines/cm². La ID máx se relaciona con el área de superficie media de las células.

Ejemplo 15: Análisis de la semivida de los GR derivados de cttlt-HSC

El siguiente ejemplo describe la semivida sin lesiones promedio de los glóbulos rojos humanos (GR) producidos en el ejemplo 9 con el fin de determinar si son equivalentes a los GR humanos primarios. La semivida promedio de un GR humano primario se estima en 120 días. La semivida de los concentrados de GR para su uso clínico es generalmente de 28 días, debido a la variación de las edades de los GR recolectados de sangre periférica. Se cree que la capacidad de sincronizar la producción de GR *in vitro* permite un aumento significativo en la semivida de los concentrados de GR para su uso clínico.

En algunas realizaciones, se producen GR usando los métodos que se describen en el presente documento durante de 7 a 30 días. En algunas realizaciones, los glóbulos rojos producidos usando los métodos que se describen en el presente documento se recogen el mismo día o aproximadamente el mismo día, por ejemplo, el día o aproximadamente el Día 9, Día 10, Día 11, Día 12, Día 13, Día 14, Día 15, Día 16, Día 17, Día 18, Día 19, Día 20, Día 21, Día 22, Día 23, Día 24, Día 25, Día 26, Día 27 o Día 28. Después se evalúa la viabilidad de los glóbulos rojos en el tiempo usando métodos conocidos, incluyendo los contenidos en el presente documento.

En algunas realizaciones, los glóbulos rojos se mantendrían en medios de almacenamiento de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el medio de almacenamiento de glóbulos rojos incluye adicionalmente Bcl-2, opcionalmente PTD-Bcl-2. Bcl-2 (opcionalmente, puede proporcionarse PTD-Bcl-2 en forma de un bolo inicial, puede proporcionarse de forma continua o puede proporcionarse en intervalos (por ejemplo, cada 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, etc.). Las concentraciones de Bcl-2 proporcionadas pueden incluir de 0,5 ug/ml a 100 ug/ml o más. En algunas realizaciones, puede proporcionarse 1 ug/ml, 5 ug/ml, 10 ug/ml, 25 ug/ml o 50 ug/ml de Bcl-2 (opcionalmente, TAT-Bcl-2) al medio de almacenamiento. Después se evalúa la viabilidad de los glóbulos rojos en el tiempo usando métodos conocidos, incluyendo los contenidos en el presente documento.

Con el fin de determinar la semivida sin lesiones promedio de los GR humanos derivados de cttlt-HSC, se usan tres

criterios que pueden cuantificarse y medirse mediante citometría de flujo. En primer lugar, el número de GR viables presentes en un cultivo se cuenta durante un período de tiempo, con el fin de medir la tasa de desgaste de un número inicial conocido. En segundo lugar, se miden los niveles de CD47 en la superficie de los GR derivados de cttlt-HSC. En tercer lugar, se miden los niveles de fosfatidilserina (PS) expuesta en la superficie de los GR humanos derivados de cttlt-HSC. Los tres criterios se miden usando un enfoque de citometría de flujo. Las características de dispersión frontal y lateral se usan en combinación con un colorante vital (LDS-751) con el fin de determinar el número de GR viables enucleados presentes en un cultivo en un momento determinado. Los niveles de CD47 presentes en la superficie de los GR se miden usando un anticuerpo monoclonal que se conjuga con el APC fluorocromático. Los niveles de PS expuestos en la superficie de los GR se miden con Anexina V-FITC, como se ha descrito anteriormente (Holovati et al., *Transfusion* 48, 1658-68, 2008).

Los cultivos de cttlt-HSC se establecen en presencia de IL-3 y EPO, como se describe en el Ejemplo 9. Los GR aparecen primero en los días 8-10 del cultivo. Los glóbulos rojos de los cultivos de cttlt-HSC se recogen y pasan a través de un filtro para retirar leucocitos (Leucolab LCG2, Macopharma). Los GR humanos primarios se obtienen de un donante anónimo sano. Ambos conjuntos de células se establecen en cultivo en medio Stemline II y los cultivos se mantienen a 37 °C. Las partes alícuotas de las células también se almacenan a 4 °C en un tampón de citrato que normalmente se usa para almacenar concentrados de GR (Lagerberg et al., *Transfusion* 47, 2242-9, 2007). Cada conjunto de condiciones se establece con 10^{10} células.

Con el fin de determinar la supervivencia sin lesiones de los GR de cualquiera de las fuentes, se retira una alícuota cada 4 días y las células se tiñen con el colorante vital (LDS-751), CD47-APC antihumano y Anexina V FITC. Después, las células se analizan usando un citómetro de flujo BD FACSCalibur. Las alícuotas se analizan de forma continua hasta que no quedan más células viables en las condiciones específicas o durante 120 días, lo que suceda primero. Se renueva el medio de los cultivos de GR mantenidos en medio Stemline II a 37 °C cada 7 días.

Ejemplo 16: Comparación de métodos para la diferenciación de GR a partir de médula ósea tratada con 5-FU

El siguiente ejemplo describe la producción de glóbulos rojos de médula ósea de ratones.

Se inyectan ratones C57BL/6 (Jackson labs n.º 003548) por vía intravenosa con 5 mg de 5-fluorouracilo (Genera Medix n.º de cat NDC 10139-063-11) en 200 µl de PBS de Dulbecco. Cinco días después, se recogen células de médula ósea de la tibia y el fémur de los ratones C57BL/6.

Se recogieron células de la médula ósea y se volvieron a suspender en 5 ml de tampón TAC estéril (NH_4Cl 135 mM, Tris Ph 7,65, 17 mM) para lisar los glóbulos rojos. Permita que las células se depositen en el tampón TAC durante 1-2 minutos y después haga centrifugue las células a 1200 RPM durante 5 minutos. Lave las células con 25 ml de medio D10. Vuelva a suspender el sedimento celular en 10 ml de Medio de MO (botella de 500 ml de DMEM que contiene 90 ml de FBS inactivado por calor, 6 ml de Pen/Estrep (Gibco n.º de cat 15140), 6 ml de MEM NEAA (Gibco n.º de cat 11140), 6 ml de L-glutamina (Gibco n.º de cat 25030), 6 ml de Hepes (Gibco n.º de cat 15630) y 60 ml de cóctel de citocinas (IL3, IL6 y SCF).

Estas células vueltas a suspender se cuentan y se siembran en pocillos de una placa de 24 pocillos con una densidad de 1×10^6 células por pocillo en 1 ml de medio. Nota: si el tratamiento con 5FU funciona, cada ratón debe producir $1-1,2 \times 10^6$ células de MO en comparación con 10×10^6 en un ratón sin tratar.

Cada pocillo que contiene 1 ml de medio se trata con 5 unidades de TAT-MYC y 5 unidades de TAT-Bcl2 diluidas en 20 µl de albúmina de suero humano (Grifols NDC 68516-5216-2). El medio se cambia cada 2 días para renovar las citocinas y las proteínas de fusión TAT. La población de Sca-1 x cKit comenzará a dominar el cultivo aproximadamente los días 14-17.

Siembre 2×10^5 de las células Sca-1xcKit por pocillo de una placa de 6 pocillos. Reemplace el medio de MO con medio de diferenciación de GR n.º 1 (IMDM complementado con FBS inactivado por calor al 15 %, medio que contiene IL3 al 10 % y EPO 100 unidades por ml, dexametasona 100 mM y holo-transferrina 25 µg/ml). Para separar los pocillos de ensayo, añada las siguientes proteínas de fusión de ensayo: 5 unidades por/ml de TAT-MYC, 5 unidades por/ml de TAT-Bcl-2 o 5 unidades por/ml de TAT-MYC y 5 unidades por/ml de TAT-Bcl-2.

El medio de diferenciación de GR n.º 1 y las proteínas de fusión se renuevan cada 2 días durante los primeros 6 días. El medio de GR n.º 1 se reemplaza con medio de GR n.º 2 (IMDM complementado con FBS inactivado por calor al 15 %, medio que contiene IL3 al 10 % y EPO 100 unidades por ml y holo-transferrina 25 µg/ml). Continúe renovando el medio de GR n.º 2 y las proteínas de fusión cada 2 días hasta que aparezcan GR, aproximadamente de 9 a 12 días.

Como se muestra en la Figura 17, la adición de TAT-Myc (Fig. 17C) durante la diferenciación de glóbulos rojos conduce a un mayor número y porcentaje de producción de glóbulos rojos en comparación con los controles sin tratar (Fig. 17A), diferenciación en IL3 y EPO solos (Fig. 17B) o IL3 y EPO con la adición de TAT-Bcl-2 (Fig. 17D) o la combinación de TAT-Bcl-2 y TAT-Myc (Fig. 17E).

Ejemplo 17: Carga útil de glóbulos rojos murinos

- Se recogen HSC derivadas de médula ósea con enriquecidas con 5FU como se ha descrito anteriormente. Las células se recogen 5 días después del tratamiento con 5 FU de ratones, se colocan en cultivo con IL-3, IL-6, SCF y TAT-MYC y TAT-Bcl-2. Las células se transducen de forma retroviral durante los primeros 2 días de cultivo con uno o más de entre pMSCV-hCD122-IRES-GFP o pMSCV-IRES-GFP. Después de la transducción, las células se expanden en medio que contienen IL-3, IL-6, SCF, TAT-MYC y TAT-Bcl-2 durante otros 14 días.
- Las células se caracterizan por FACS para niveles superficiales de c-kit, sca-1, marcadores de linaje (B220, CD3, ter-119, Mac-1, Gr-1), así como la expresión de GFP y hCD122 de superficie. La población de LSK murina expandida que también expresa GFP y hCD122 se cambiará a las condiciones de diferenciación de GR usando medio que contiene IL-3, EPO y bajas concentraciones de TAT-MYC como se ha descrito anteriormente. De 14 a 28 días después, los cultivos se controlarán y caracterizarán de forma continua para determinar la expresión de CD71, GPA, hemoglobina de adulto y fetal, así como GFP y hCD122, como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 18: Generación de proteínas de fusión TAT-Myc y TAT-Bcl-2 biológicamente activas

- Se generaron proteínas de fusión que tenían el dominio de transducción de proteína TAT del VIH-1 (PTD) y el ORF para Myc humano o una forma truncada de Bcl-2 humano que se había suprimido para el dominio de bucle no estructurado (Anderson, M., et al. (1999). *Prot Expr. Purif.* 15, 162-70). Las proteínas recombinantes también codificaron un marcador peptídico V5 y un marcador 6-His, para facilitar la detección y purificación (Fig. 18A). La secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión TAT-MYC se representan en la Figura 24. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión TAT-Bcl-2Δ se representan en la Figura 25.

- pTAT-Myc-V5-6xHis (Amp^R)* y *pTAT-Bcl2Δ-V5-6xHis(Amp^R)*: se generaron plásmidos mediante amplificación por PCR de un ADNc que codificaba cMyc humano o Bcl2 humano usando un cebador directo que codificaba un dominio de transducción de proteínas TAT en fase de lectura del VIH (RKKRRQRRRR). Los productos de la PCR se clonaron en el vector pET101/D-Topo (Invitrogen). El bucle no estructurado (A.A. n.º 27-80) se retiró de la secuencia de codificación de BCL-2 usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio de Cambio Rápido (Stratagene n.º 200521-5).

- Las proteínas se sintetizaron en *E. coli* y se purificaron hasta su homogeneidad. La electroforesis por SDS-PAGE y la tinción con Coomassie revelaron el nivel de pureza del producto final utilizado para los presentes estudios (Fig. 18B). Se transformó pTAT-Myc-V5-6xHis en células BL21-STAR(DE3) (Invitrogen) y se indujo la proteína con IPTG 0,5 mM a 37 °C durante 3 horas. Las células se lisaron en tampón de lisis (urea 8 M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, pH 7,0, imidazol 10 mM, pH 7,2). El lisado se diluyó en urea 6 M y se llevó a NaCl 450 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Tris 5 mM, pH 7,0. El lisado se trató con Benzonase (500 unidades) a temperatura ambiente durante 1 hora, se aclaró por centrifugación a 12.000 RPM durante 60 minutos y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Se purificó Myc-V5-6xHis en una columna de afinidad de níquel (GE) usando un purificador GE AKTA 10 FPLC. Se replegó Myc-V5-6xHis mediante diálisis en un tampón de diálisis (NaCl 450 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Tris 5 mM, pH 7,0, glicerol al 5 %, DTT 1 mM). La endotoxina se redujo haciendo pasar la proteína purificada a través de una columna Acticlean Etox (Sterogen).

- La proteína Bcl2Δ-V5-6xHis se indujo como se desvela anteriormente. Las células se lisaron en 50 ml de tampón de lisis (NaCl 200 mM, KCL 200 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Tris 5 mM pH 7,0, glicerol al 5 %, DTT 1 mM) complementado con 500 unidades de Benzonase, PMSF 1 mM, Leupeptina 2 µg/ml, Aprotinina 0,015 unidades/ml, lisozima de huevo de gallina 5 µM (HEL) por 1 litro de proteína inducida, e inmediatamente se colocan en hielo durante 1 hora. Las células se sometieron a ultrasonido en hielo (ciclo de trabajo = 50 %, salida = 5) durante 2 series de 2 minutos. El lisado se aclaró mediante centrifugación a 12.000 RPM durante 60 minutos y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Se purificó Bcl2Δ-V5-6xHis en una columna de afinidad de níquel (GE) y la endotoxina se retiró como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 19: Confirmación de la localización apropiada de proteínas de fusión de TAT

- Las proteínas de fusión se localizan en el compartimento intracelular apropiado (Fig. 18C). Las células NIH 3T3 se sembraron en cubreobjetos de vidrio en placas de seis pocillos y se cultivaron hasta un 30 a 40 % de confluencia. Cada pocillo se transdujo con 10 µg/ml de TAT-Myc o TAT-Bcl-2 o ningún tratamiento como control negativo. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4 %-PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA) 2 horas después de la transducción de proteínas. Las células se permeabilizaron en PBS complementado con albúmina de suero bovino al 1 % (BSA) y Triton X-100 al 0,1 % a TA durante 3 minutos. Las células se incubaron durante 45 minutos con antisuero monoclonal de ratón V5 (Invitrogen) diluido en PBS-BSA al 1 % (1:1.000). Las células se lavaron y se incubaron durante 30 minutos con anticuerpos secundarios Alexa 488 de cabra anti-ratón (Invitrogen A21121). Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio con una gota de 10 µl de glicerol al 50 % con Hoechst a 1 µg/ml. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Imager Z1.

Se localizó TAT-Myc rápidamente en el núcleo en HSC primarias humanas (Fig. 18D). Las proteínas de fusión TAT se degradan completamente después de 72 horas en las HSC (Fig. 18E). Las células de sangre de cordón umbilical se transdujeron con TAT-Myc y TAT-Bcl2Δ durante 1 hora, seguido de 3 lavados con PBS. Dos horas después de la transducción, se recogieron 5x10⁶ células y se aislaron las fracciones nuclear y citoplásmica. Las células (5x10⁶) se recogieron cada 24 horas durante los siguientes 5 días. Se prepararon proteínas nucleares y citoplásmicas lisando células en HEPES 10 mM (pH 7,6), NaCl₂ 10 mM, CaCl₂ 3 mM y NP40 al 0,5 %. Los núcleos se sedimentaron y la fracción sobrenadante que contenía citoplasma se precipitó con ácido tricloroacético (TCA). Después de SDS-PAGE, se sondaron transferencias de Western con anticuerpo anti-V5 (Invitrogen), β-actina humana (abcam) y IgG-HRP de cabra anti-conejo o IgG-HRP de cabra anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology).

Ejemplo 20: Expansión de HSC derivadas de sangre de cordón umbilical humano con TAT-Myc y TAT-Bcl-2

Se obtuvieron células de sangre de cordón recién preparadas de muestras que se descartaron de un banco de sangre de cordón umbilical local. Todas las células humanas estaban sin identificar y exentas de la supervisión del IRB. La sangre de cordón umbilical incluía O+, O-, A+, A-, B+, B- y AB+, todos los cuales mostraron aproximadamente los mismos perfiles de expansión.

El volumen total del cordón umbilical se dividió en alícuotas de 20 ml y se diluyó 1:1 en PBS. La sangre de cordón umbilical diluida (20 ml) se superpuso suavemente en 20 ml de Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences n.º de cat 17-1440-03). Las células se centrifugaron a 900 x gravedad durante 60 min. La capa leucocítica se retiró con una pipeta de vidrio y se lavó dos veces con PBS. Las células se volvieron a suspender en medio de SCUF (de Iscove (Gibco) complementado con plasma humano al 10 %, Pen/Estrep 100 unidades por ml, 30 ml de medio que contenía SCF, IL3 e IL6 y 30 ml de medio que contenía TPO, FLT3-L y GM-CSF descrito anteriormente. El medio de SCUF se complementó adicionalmente con TAT-Myc recombinante 5 µg/ml y TAT-Bcl-2 10 µg/ml recombinante justo antes de la adición a las células de sangre de cordón umbilical fetal (SCUF). El medio se reemplazó cada 3 días durante el transcurso de la expansión.

El cóctel de citocinas contenía IL3, IL6, TPO, Flt3-L, SCF y GM-CSF, que difiere de los medios indicados anteriormente en la combinación de estas seis citocinas (Suzuki, T., et al. (2006) *Stem Cells* 24, 2456-65), así como mediante la adición de TAT-Myc y TAT-Bcl-2 recombinantes. La evaluación del fenotipo de superficie de las HSC humanas expandidas *in vitro* mostró que las HSC humanas conservan sus características de superficie después de un cultivo prolongado en presencia de TAT-Myc y TAT-Bcl-2 (Fig. 19A). Este conjunto de condiciones dio como resultado un aumento de 86,4 veces del número de células CD34+ en 14 días de cultivo y un aumento de 103,8 veces en el número de células CD34+ humanas derivadas de sangre de cordón umbilical sin fraccionar en 21 días de cultivo (Fig. 19B).

Ejemplo 21: Las HSC de SCU humanas expandidas con TAT-Myc y TAT-Bcl-2 son biológicamente activas *in vitro* e *in vivo*

Las HSC humanas expandidas *in vitro* se sembraron en MethoCult Optimum (StemCell Technologies) y se examinó su capacidad para originar tipos específicos de colonias. Las HSC humanas expandidas *in vitro* son capaces de originar colonias de UFC-G, UFC-M, UFC-GM y UFB-E (Fig. 19C y 19D). Además, mientras que el fenotipo de superficie de las HSC se expandió en presencia de TAT-Myc y TAT-Bcl-2 se conservó en el cultivo, su contenido de unidades formadoras de colonias se enriqueció significativamente en estas condiciones (Fig. 19D). Las células CD34+ expandidas en presencia de TAT-Myc y TAT-Bcl-2 también fueron capaces de originar nuevas colonias de UFB-E, UFC-M, UFC-G y UFC-GM, mientras que las células CD34+ cultivadas en medio solo no generaron nuevas colonias (Fig. 19E).

Se usaron ratones NOD/SCID/gc-/- (NSG) como receptores para experimentos para someter a ensayo la capacidad de las células CD34+ humanas expandidas *in vitro* para originar linajes hematopoyéticos humanos maduros *in vivo*. Este es un modelo de ratón documentado útil para este propósito (Tanaka, S., et al. (2012). *Development of mature and functional human myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2rgKO mice*. *J Immunol* 188, 6145-55).

Se inyectaron células de sangre de cordón umbilical fetal (SCUF) en ratones NOD/SCID/gc-/- (NSG) (Jackson Laboratory) que recibieron 180 rads de radiación justo antes de la inyección. Las células de SCUF expandidas se lavaron 3 veces en PBS y se inyectaron a través de la vena de la cola en 200 µl de PBS. Ocho semanas después del trasplante, los ratones se desangraron a través de la vena de la cola para evaluar la reconstitución por citometría de flujo usando los siguientes anticuerpos: CD3 antihumano (hCD3) (Biolegend n.º de cat 300312), CD19 antihumano (hCD19) (Biolegend n.º de cat 302208) y CD45 antihumano (hCD45) (Biolegend n.º de cat 304028).

Se observó un desarrollo a corto plazo de linfocitos T y B que expresaban CD45+ en ratones quiméricos NSG generados con 1x10⁷ células de sangre de cordón umbilical no fraccionada. Sin embargo, la introducción de 1x10⁶ (ptlt)-HSC de largo plazo transducidas con proteína generadas *in vitro* mediante cultivo con TAT-Myc y TAT-Bcl-2 durante 14 días dio como resultado una mayor frecuencia de células CD45+ humanas en ratones NSG xenoquiméricos. Además, se pudieron observar células CD45+ humanas en la sangre periférica de los ratones hasta

20 semanas después del trasplante (Fig. 20A). Se encontraron HSC CD45+, CD34+ CD38lo humanas en la médula ósea (Fig. 20B), se encontraron CD45+/CD3+ humanas y células linfoides CD45+/CD19+ humanas en el bazo y se encontraron células linfoides CD45+, CD3+ humanas en el timo de ratones xenoquiméricos.

- 5 Las células CD45+CD19+ humanas de los bazos de ratones NSG xenoquiméricos se marcaron con CFSE y se activaron con anticuerpos monoclonales contra CD40 e IgM humanos. Las células se analizaron a las 72 horas mediante citometría de flujo para determinar la dilución de CFSE. La Fig. 20C muestra el perfil de proliferación de las células B humanas que se desarrollaron *in vivo* en ratones NSG xenoquiméricos.
- 10 Se usaron HSC CD45+, CD34+ CD38lo humanas de la médula ósea de ratones NSG xenoquiméricos para sembrar en MethoCult Optimum. Estas células originaron colonias en las placas de MethoCult (Fig. 20D) y algunas de las colonias aún se podían observar después de la vuelta a sembrar en placa en serie (Fig. 20E). El número de colonias en ambos casos fue significativamente mayor para los ratones NSG reconstituidos con células de sangre de cordón umbilical humano cultivadas durante 14 días con TAT-Myc y TAT-Bcl-2 que para las células obtenidas de ratones
- 15 NSG reconstituidos con sangre de cordón umbilical humano recién preparada sin manipular.

Además, se evaluó una cohorte de ratones xenoquiméricos, injertados con 106 células de sangre de cordón umbilical expandidas anteriormente *in vitro* en un cóctel de citocinas complementado con TAT-Myc y TAT-Bcl-2 (cuadrados de color negro), para determinar la diferenciación de células mieloides y linfoides. La población positiva para CD45 de células de médula ósea (Fig. 20F) y la de células de bazo (Fig. 20G) se analizaron para determinar la expresión de CD11b, CD33, CD3 y CD19. Se observó una diferenciación de las células mieloides y linfoides en la médula ósea y el bazo de estos ratones xenoquiméricos.

25 **Ejemplo 22: Expansión de HSC de sangre periférica movilizadas con G-CSF humano con TAT-Myc y TAT-Bcl-2**

Se recibieron células movilizadas con G-CSF en un volumen de 1 ml de sangre elutriada de 5 pacientes que se sometieron a movilización con G-CSF para trasplante de HSC autólogas. Se retiró la identificación de todas las muestras de G-CSF y no se asoció información de identificación adicional a las células utilizadas para estos

- 30 estudios. Las células se añadieron gota a gota a 10 ml de medio de SCUF. Las células se lavaron dos veces en medio de SCUF y se trataron con TAT-Myc recombinante 5 µg/ml y TAT-Bcl-2 recombinante 10 µg/ml en un volumen de 10 ml. Se sembraron células (5×10^6) en el dispositivo de expansión de células G-Rex 100 (Wilson Wolf Manufacturing) de acuerdo con la recomendación del fabricante.
- 35 Las células se expandieron en medios complementados con citocinas más TAT-Myc y TAT-Bcl2 durante 14 días. El perfil de FACS de las HSC expandidas muestra una población distinta de células hCD45+, CD34+, CD38hi, CD133+ (Fig. 21A). La cinética de la expansión celular se ilustra en la Figura 21B.

Las HSC movilizadas por G-CSF de adulto expandidas se colocaron en placas en MethoCult Optimum con el fin de

- 40 caracterizar su potencial de diferenciación *in vitro*. Se obtuvieron cuatro tipos de colonias que normalmente se observan en los medios que soportan la diferenciación mieloeritroide (Fig. 21C) y algunos de estos tipos de colonias también se observaron en la vuelta a cultivar en placa en serie.
- 45 Las HSC de adulto expandidas fueron capaces de reconstituir ratones NSG irradiados de forma subletal. La Fig. 21D muestra un análisis por FACS de la tinción con CD45+ de la médula ósea de ratones NSG trasplantados 12 semanas antes con HSC movilizadas con 106 G-CSF y TAT-Myc/TAT-Bcl-2 expandidas (primer panel) o 5×10^6 células de cordón umbilical recién preparadas sin manipular (segundo panel).

Los ratones xenoquiméricos NSG generados con células movilizadas con G-CSF cultivadas con TAT-Myc y TAT-Bcl-2 se sacrificaron y se recogieron la médula ósea, el bazo y el timo para un análisis adicional. El análisis de órganos linfoides de ratones NSG xenoquiméricos reconstituidos con HSC de adulto expandidas mostró que había células CD45+, CD34+CD38lo humanas en la médula ósea (Fig. 21E; primer panel), células linfoides CD45+, CD3+ humanas en el bazo (Fig. 21E; segundo panel) y timo (Figura 21E; tercer panel) de esos ratones. Conjuntamente, estos datos demuestran que puede expandirse satisfactoriamente la población de HSC obtenida de sangre de adulto

movilizada con G-CSF humano.

Una cohorte de ratones xenoquiméricos injertados con 10^6 células movilizadas con G-CSF expandidas *in vitro* en un cóctel de citocinas complementado con TAT-Myc y TAT-Bcl-2 (cuadrados de color negro) se evaluó para determinar la diferenciación de células mieloides y linfoides. La población CD45 positiva de células de médula ósea (Fig. 21F) y células de bazo (Fig. 21G) se analizó para determinar la expresión de CD11b, CD33, CD3 y CD19. Se observó una diferenciación de las células mieloides y linfoides en la médula ósea y el bazo de estos ratones xenoquiméricos.

Este método es capaz de generar un número suficiente de HSC necesarias para el trasplante de un adulto de tamaño promedio de acuerdo con los enfoques actuales (Sideri, A., et al. (2011). *Hematologica* 96, 1213-20).

65 **Ejemplo 23: Generación de proteínas de fusión Myc biológicamente activas**

Se generaron y purificaron cinco proteínas de fusión de Myc además de la proteína de fusión TAT-Myc descrita en el Ejemplo 18 usando el mismo enfoque descrito en el mismo. Los plásmidos se obtuvieron mediante amplificación por PCR de la región codificante usando un cebador directo que contiene una secuencia de PTD-aminoácido N-terminal en fase de lectura y un cebador inverso que retiró el codón de parada. El producto de la PCR después se clonó en el vector pET101/D-Topo (Invitrogen), que incluye un epítipo V5 C-terminal y un marcador de purificación 6x-histidina. La Figura 22A muestra una representación esquemática de las proteínas de fusión de Myc en comparación con TAT-Myc del Ejemplo 18. En cada uno, una transducción de proteínas (PTD) se fusiona en fase de lectura antes o después del polipéptido Myc.

Los dominios de transducción de proteínas incluían TAT, EPTD y VPR. EPTD es un dominio de transducción de proteínas optimizado (YARAAARQARA) tomado de Ho, A. et al. (*Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo*. *Cancer Res.* (2001) 61:474-477). El dominio de transducción VPR fue identificado por Taguchi, T. et al. (*Nuclear trafficking of macromolecules by an oligopeptide derived from VPR of human immunodeficiency virus type-1*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004) 320 (1):18-26).

Myc fue el ORF del polipéptido que se describe en el Ejemplo 1 o la secuencia de 3AMyc descrita anteriormente por Huang, Z. et al. (*Negative control of the Myc protein by the stress-responsive kinase Pak-2*. *Mol Cell Biol* (2004) 24(4):1582-94). Las proteínas recombinantes también codificaron un marcador peptídico V5 y un marcador 6-His, para facilitar la detección y purificación. (Fig. 22A).

Ejemplo 24: Ensayos de supervivencia de linfocitos T activados

Las proteínas de fusión Myc descritas en el Ejemplo 23 (TAT-Myc, TAT-3AMyc, EPTD-Myc, VPR-Myc y Myc-VPR) se sometieron a ensayo para determinar la actividad biológica de Myc en un ensayo de viabilidad de linfocitos T activados (Fig. 22B). Se recogió un bazo de un ratón C57BL.6j (Jackson) y se disoció mecánicamente a través de una malla de alambre. Se retiraron los glóbulos rojos y se activaron los linfocitos T con 1 ug/ml de anti-CD3 (2c11). Las células se colocaron en una placa de 24 pocillos a 3×10^6 células por pocillo en 1 ml de medio. 48 horas después, las células vivas se capturaron en un cojín de Ficol, se lavaron y se sembraron en placas de 24 pocillos a $1-1,5 \times 10^6$ células por pocillo. Las proteínas PTD-Myc se valoraron en los linfocitos T a 0,5, 1, 5, 10, 25 o 50 ug/ml. 48 horas después del tratamiento con la proteína PTD-Myc, se evaluó la viabilidad de las células mediante citometría de flujo (dispersión de lado x hacia adelante). En la Fig. 22B, los datos presentados son para el tratamiento con proteína 25 ug/ml.

Como se muestra en la Fig. 22B, todas las construcciones sometidas a ensayo, excepto TAT-3AMyc, dieron como resultado una mayor viabilidad de los linfocitos T después de 48 horas que el control sin tratar. Sin embargo, ninguna construcción dio como resultado una mayor viabilidad de los linfocitos T que TAT-Myc descrita en el Ejemplo 1.

En un experimento similar, la actividad de TAT-Myc y TAT-Bcl-2 a diversas concentraciones se muestra en la Tabla 5, a continuación. Los linfocitos T de bazo de ratones C57BL.6j (Jackson) se activan con anti-CD3 1 ug/ml (2c11). Después de la activación (48 horas más tarde), se lavaron las células, se sembraron a aproximadamente $1-1,5 \times 10^6$ células/pocillo y se añadieron proteínas de fusión (TAT-Myc o TAT-Bcl-2) a diversas concentraciones (0,5, 1, 5, 10, 25 o 50 ug/ml). Después de 48 horas, el porcentaje de células vivas se determinó mediante citometría de flujo (dispersión del lado x hacia adelante) como se muestra en la Tabla 5, a continuación.

TABLA 5

Concentración [ug/ml]	TAT-Myc (% viable)	TAT-Bcl2 (% viable)
0	8,5	3,1
0,5	9,5	5
1	11,4	7,68
5	21,1	14,3
10	22,4	24,4
25	31,9	25
50	32,8	19,8

Tanto para TAT-Myc como para TAT-Bcl-2 y en todas las concentraciones analizadas, la viabilidad y/o proliferación celular aumentan en comparación con las células incubadas en ausencia de cualquiera de las proteínas de fusión.

En un experimento separado que usa los mismos métodos, la Figura 23 proporciona los datos de FACS para la estimulación in vivo para linfocitos T activados tratados con 50 ug/ml de proteínas de fusión; TAT-Bcl-2 y TAT-Myc se comparan con el control (TAT-Cre o ningún tratamiento). Como se muestra, los tratamientos con TAT-Myc y TAT-Bcl-2 dan como resultado una supervivencia y/o proliferación de linfocitos T significativamente mejorada.

Ejemplo 25: Evaluación de Bcl-2

Se transdujeron células 3T3 con TAT-Bcl2 durante 1 hora, seguido de 3 lavados con PBS. Dos horas después de la transducción, las células se tripsinizaron, se contaron y se recogieron 5×10^6 . Se aislaron las fracciones nucleares y citoplásmicas. Se recogieron 5×10^6 células cada 24 horas durante los siguientes 5 días. Se prepararon proteínas nucleares y citoplásmicas lisando células en HEPES 10 mM (pH 7,6), NaCl₂ 10 mM, CaCl₂ 3 mM y NP40 al 0,5 %.

Los núcleos se sedimentaron y la fracción sobrenadante que contenía citoplasma se precipitó con ácido tricloroacético (TCA). Se sondaron transferencias de Western con anticuerpo anti-V5 (Invitrogen) y IgG-HRP de cabra anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology).

Se observó TAT-Bcl2 en la fracción citoplásmica a las 24 y 48 horas. La señal comenzó a disminuir 72 horas después de la transducción y ya no se observó en el punto temporal de 96 horas.

Se crearon plásmidos que expresaban TAT-Bcl2, TAT-Bcl2Δ, EPTD-Bcl2, VPR-Bcl2, VPR-Bcl2Δ y VPR-BclXL. *pPTD-Bcl2-V5-6xHis(Amp^R)*: se generaron plásmidos mediante la amplificación por PCR de un ADNc que codifica Bcl2 humano usando un cebador directo que codifica un dominio de transducción de proteínas PTD (TAT, EPTD o VPR) en fase de lectura. Los productos de la PCR se clonaron en el vector pET101/D-Topo (Invitrogen). Para generar el Bcl2Δ, se retiró el bucle no estructurado (A.A. n.º 27-80) se retiró de la secuencia de codificación de BCL-2 usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio de Cambio Rápido (Stratagene n.º 200521-5). VPR-BclXL se fabricó de manera similar a el PTD-Bcl2 descrita anteriormente, pero usando el ADNc de BclXL humano en lugar de Bcl2.

La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico de TAT-Bcl-2Δ se muestran en la Figura 25.

Ejemplo 26: Generación de GR maduros a partir de HSC

Se purificaron células CD34+ a partir de sangre periférica movilizada usando perlas de selección positiva Dynal CD34 de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células CD34+ se trataron durante 1 hora a 37 °C con TAT-MYC 5 ug/ml y TAT-Bcl2 5 ug/ml en medio de Iscove complementado con plasma humano al 15 % y pen/estrep 100 unidades/ml. Después del tratamiento con TAT-MYC y TAT-Bcl2, las células se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos y el medio se retira del sedimento celular. Las células CD34+ primarias tratadas se siembran en medio de diferenciación eritroide (medio de Iscove complementado con plasma humano al 15 %, pen/estrep 100 unidades/ml, EPO 100 unidades/ml y IL3 3,2 ng/ml) cambiando su programación celular para que no sea HSC y hacia las células eritroides debido a la presencia de las citocinas IL3 y EPO en el medio de GR.

El tratamiento de las células CD34+ purificadas con este único bolo TAT-MYC y TAT-Bcl2 mejora estos cultivos de diferenciación de 2 maneras. En primer lugar, las células CD34+ primarias tratadas con proteínas de fusión TAT muestran una viabilidad mejorada durante su diferenciación dando como resultado la producción de un mayor número de glóbulos rojos maduros. En segundo lugar, las células CD34+ primarias tratadas con TAT-MYC y TAT-Bcl2 y sembradas en medios de diferenciación de GR muestran un mejor compromiso para diferenciarse al linaje eritroide en lugar de diferenciarse en otras células mieloides.

Después del tratamiento con TAT-MYC y TAT-Bcl2, las células CD34+ se sembraron en pocillos de una placa de agrupación de 24 pocillos a 5×10^4 células por pocillo en el medio de diferenciación de GR descrito anteriormente. Las células se dejaron diferenciar durante 11 días. En los días 6 y 11, las células se evaluaron para determinar los marcadores de superficie eritroides GPACD71 (Fig. 26A). Las células tratadas con TAT-Myc y TAT-Bcl2 se diferenciaban en células eritroides según lo indicado por el 74 % y el 87,6 % de células doble positivas para GPACD71 (Fig. 26A; días 6 y 11 respectivamente). Adicionalmente, estas células eritroides continúan expresando hemoglobina de adulto sobre hemoglobina fetal indicado por el 78,8 % de las células que expresan únicamente hemoglobina de adulto en comparación con el 19,8 % de las células que expresan hemoglobina fetal (Fig. 26A; día 11 panel hBxfhB).

El día 10, una muestra del cultivo de diferenciación se sometió a citocentrifugado sobre un cubreobjetos para la tinción con H y E. Las imágenes tienen un aumento de 10X y 20X (Fig. 26B). Se observaron células que expresan hemoglobina que se han anucleado, como lo indican las células teñidas de color rojo que carecen de un núcleo de tinción oscura en el centro (Fig. 26B).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TAIGA BIOTECHNOLOGIES, INC.

<120> LA PRODUCCIÓN Y EL USO DE GLÓBULOS ROJOS

<130> 106417-0181

<140> Todavía sin asignar

<141> Simultáneamente con la presente

<150> US 61/776.732

<151> 11-03-2013

<150> US 13/797.648

<151> 12-03-2013

5

<160> 4

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

10

<210> 1

<211> 477

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 1

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

20

Thr	Thr	Ser	Ser	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Gln	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Ile
			260					265					270		
Asp	Val	Val	Ser	Val	Glu	Lys	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Arg	Ser	Glu
		275					280					285			
Ser	Gly	Ser	Pro	Ser	Ala	Gly	Gly	His	Ser	Lys	Pro	Pro	His	Ser	Pro
	290					295					300				
Leu	Val	Leu	Lys	Arg	Cys	His	Val	Ser	Thr	His	Gln	His	Asn	Tyr	Ala
305					310					315					320
Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Arg	Lys	Asp	Tyr	Pro	Ala	Ala	Lys	Arg	Val	Lys
				325					330					335	
Leu	Asp	Ser	Val	Arg	Val	Leu	Arg	Gln	Ile	Ser	Asn	Asn	Arg	Lys	Cys
			340					345					350		
Thr	Ser	Pro	Arg	Ser	Ser	Asp	Thr	Glu	Glu	Asn	Val	Lys	Arg	Arg	Thr
		355					360						365		
His	Asn	Val	Leu	Glu	Arg	Gln	Arg	Arg	Asn	Glu	Leu	Lys	Arg	Ser	Phe
	370					375					380				
Phe	Ala	Leu	Arg	Asp	Gln	Ile	Pro	Glu	Leu	Glu	Asn	Asn	Glu	Lys	Ala
385					390					395					400
Pro	Lys	Val	Val	Ile	Leu	Lys	Lys	Ala	Thr	Ala	Tyr	Ile	Leu	Ser	Val
				405					410					415	
Gln	Ala	Glu	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Leu	Arg	Lys
			420					425					430		
Arg	Arg	Glu	Gln	Leu	Lys	His	Lys	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Lys	Gly	Glu
		435					440					445			
Leu	Asn	Ser	Lys	Leu	Glu	Gly	Lys	Pro	Ile	Pro	Asn	Pro	Leu	Leu	Gly
	450					455					460				
Leu	Asp	Ser	Thr	Arg	Thr	Gly	His	His	His	His	His	His			
465					470						475				

<210> 2
 <211> 1434
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 2

```

atgaggaaga agcggagaca gcgacgaaga atgcccctca acgttagctt caccaacagg 60
aactatgacc tcgactacga ctcggtgcag ccgtatttct actgcgacga ggaggagaac 120
ttctaccagc agcagcagca gagcgagctg cagcccccg cgcccagcga ggatatctgg 180
aagaaattcg agctgctgcc caccgcccc ctgtccccta gccgcccgtc cgggctctgc 240
tcgcccctct acgttgcggt cacacccttc tcccttcggg gagacaacga cggcggtggc 300
gggagcttct ccacggccga ccagctggag atggtgaccg agctgctggg aggagacatg 360
gtgaaccaga gtttcatctg cgacccggac gacgagacct tcatcaaaaa catcatcatc 420
caggactgta tgtggagcgg cttctcgcc gccgccaagc tcgtctcaga gaagctggcc 480
tcctaccagg ctgcgcgcaa agacagcggc agcccgaacc ccgcccgcgg ccacagcgctc 540
tgctccacct ccagcttgta cctgcaggat ctgagcgccg ccgcctcaga gtgcatcgac 600
ccctcggtgg tcttccccta ccctctcaac gacagcagct cgcccaagtc ctgcgctcgc 660
caagactcca gcgccttctc tccgtcctcg gattctctgc tctcctcgac ggagtcctcc 720
ccgcagggca gccccgagcc cctggtgctc catgaggaga caccgcccac caccagcagc 780
gactctgagg aggaacaaga agatgaggaa gaaatcgatg ttgtttctgt ggaaaagagg 840
caggctcctg gcaaaaggct agagtctgga tcaccttctg ctggaggcca cagcaaacct 900
cctcacagcc cactggtcct caagaggtgc cacgtctcca cacatcagca caactacgca 960
gcgcctccct ccactcgga ggactatcct gctgccaaga gggccaagtt ggacagtgtc 1020
agagtcctga gacagatcag caacaaccga aaatgcacca gccccaggtc ctcggaacac 1080
gaggagaatg tcaagaggcg aacacacaac gtcttgagc gccagaggag gaacgagcta 1140
aaacggagct tttttgccct gcgtgaccag atcccggagt tggaaaacaa tgaaaaggcc 1200
cccaaggtag ttatccttaa aaaagccaca gcatacatcc tgtccgtcca agcagaggag 1260
caaaagctca tttctgaaga ggacttggtg cggaacgac gagaacagtt gaaacacaaa 1320
cttgaacagc tacggaagg cgagctcaat tcgaagcttg aaggtaagcc tatccctaac 1380
cctctcctcg gtctcgattc tacgcgtacc ggtcatcatc accatcacca ttga 1434

```

<210> 3
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 708
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

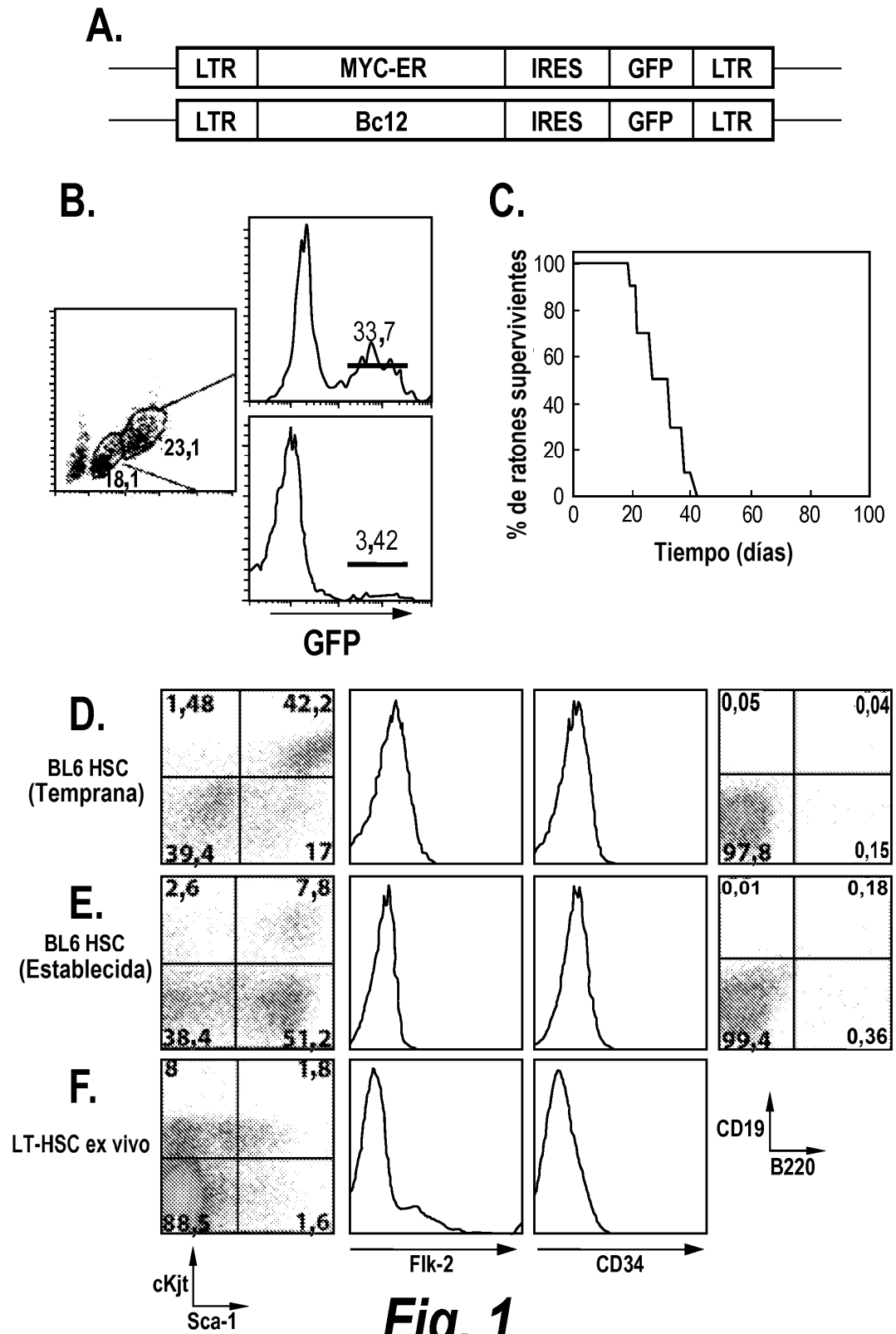
<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

atgaggaaga	agcggagaca	gcgacgaaga	atggcgacacg	ctggggagaag	tggttacgat	60
aaccgggaga	tagtgatgaa	gtacatccat	tataagctgt	cgcagagggc	tacgagtggg	120
atctcgatcg	aggccgcggg	gcctgcgctc	agcccggtgc	cacctgtggt	ccacctgacc	180
ctccgccagg	ccggcgacga	cttctcccgc	cgctaccgcc	gcgacttcgc	cgagatgtcc	240
agccagctgc	acctgacgcc	cttcaccgcg	cggggatgct	ttgccacggt	ggtggaggag	300
ctcttcaggg	acgggggtgaa	ctgggggagg	attgtggcct	tctttgagtt	cggtgggggtc	360
atgtgtgtgg	agagcgtcaa	ccgggagatg	tcgcccctgg	tggacaacat	cgccctgtgg	420
atgactgagt	acctgaaccg	gcacctgcac	acctggatcc	aggataacgg	aggctgggat	480
gcctttgtgg	aactgtacgg	ccccagcatg	cggcctctgt	ttgatttctc	ctggctgtct	540
ctgaagactc	tgctcagttt	ggccctggtg	ggagcttgca	tcaccctggg	tgccatctctg	600
agccacaaga	agggcgagct	caattcgaag	cttgaaggta	agcctatccc	taaccctctc	660
ctcgggtctcg	attctacgcg	taccggtcat	catcaccatc	accattga		708

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una población de glóbulos rojos maduros a partir de células madre hematopoyéticas, que comprende:
 - 5 cultivar células madre hematopoyéticas en un medio de cultivo que comprende EPO y una o más primeras proteínas recombinantes que promueven la supervivencia y la proliferación celular en condiciones que inducen la diferenciación de las células madre hematopoyéticas a glóbulos rojos maduros, produciendo de este modo una población de glóbulos rojos maduros, en la que la primera proteína recombinante comprende un polipéptido MYC o un fragmento biológicamente activo del mismo.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el polipéptido MYC o un fragmento biológicamente activo del mismo, es TAT-MYC.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende adicionalmente cultivar la población de glóbulos rojos maduros en presencia de una o más segundas proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, que inhiben la apoptosis.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la una o más segundas proteínas recombinantes, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, comprenden uno o más dominios de homología Bcl2 seleccionados entre el grupo que consiste en BH1, BH2, BH3 y BH4.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células madre hematopoyéticas comprenden adicionalmente una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las células madre hematopoyéticas comprenden uno o más transgenes que codifican una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que la expresión o función de una o más proteínas recombinantes de interés, o un fragmento biológicamente activo de las mismas, es controlable o inducible.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la población de glóbulos rojos maduros se produce en 7 a 14 días.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la población de glóbulos rojos maduros presenta una o más características seleccionadas entre el grupo que consiste en una población de glóbulos rojos maduros, en la que del 40 % al 100 % de las células están anucleadas; una población de glóbulos rojos maduros, en la que del 40 % al 100 % de las células expresan GPA; una población de glóbulos rojos maduros, en la que del 40 % al 100 % de las células expresan hemoglobina de adulto; una población de glóbulos rojos maduros, en la que del 40 % al 100 % de las células presentan niveles reducidos de expresión de CD71; una población de glóbulos rojos maduros, en la que del 40 % al 100 % de las células presentan niveles reducidos de expresión de hemoglobina fetal.



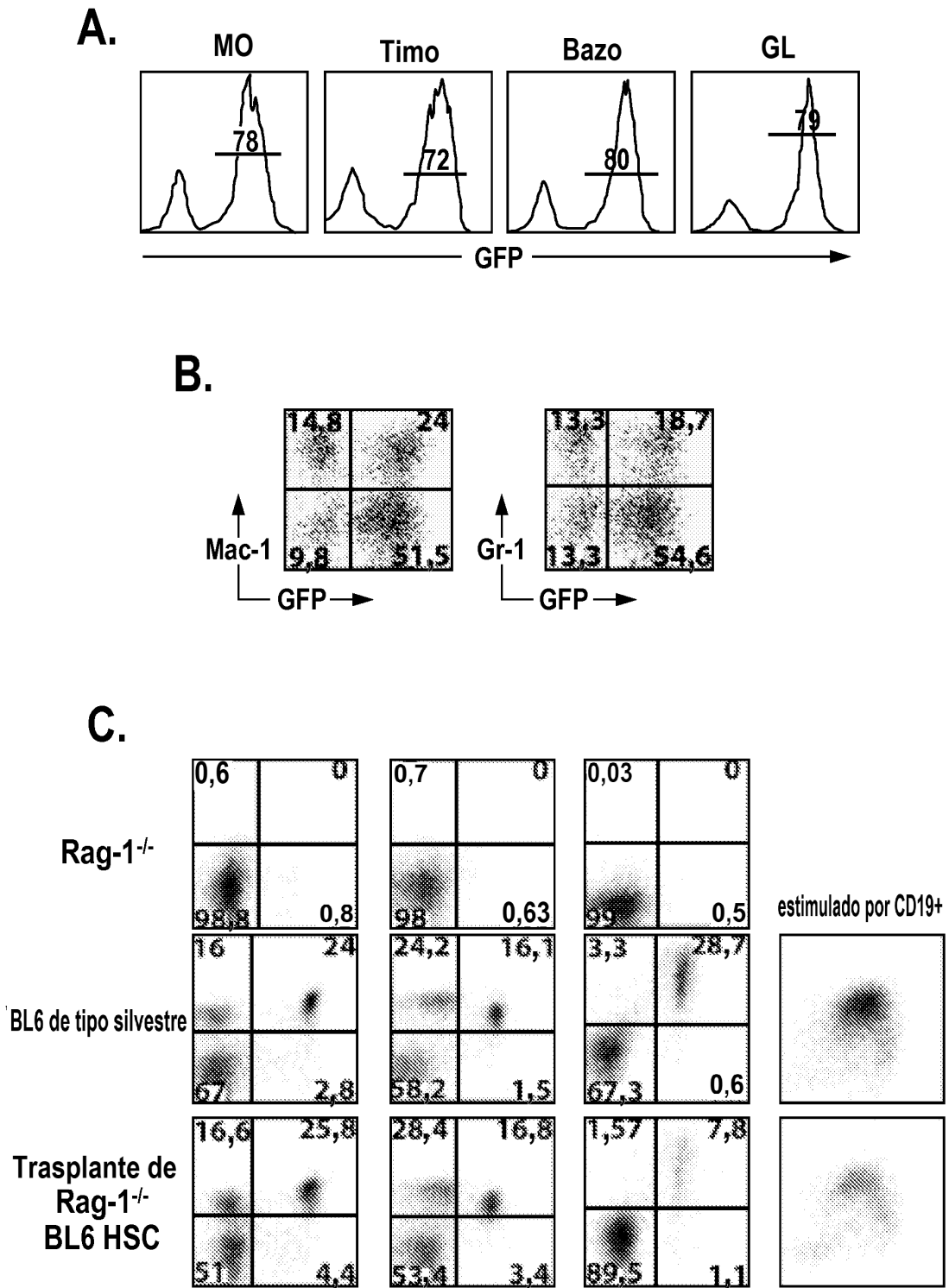


Fig. 2

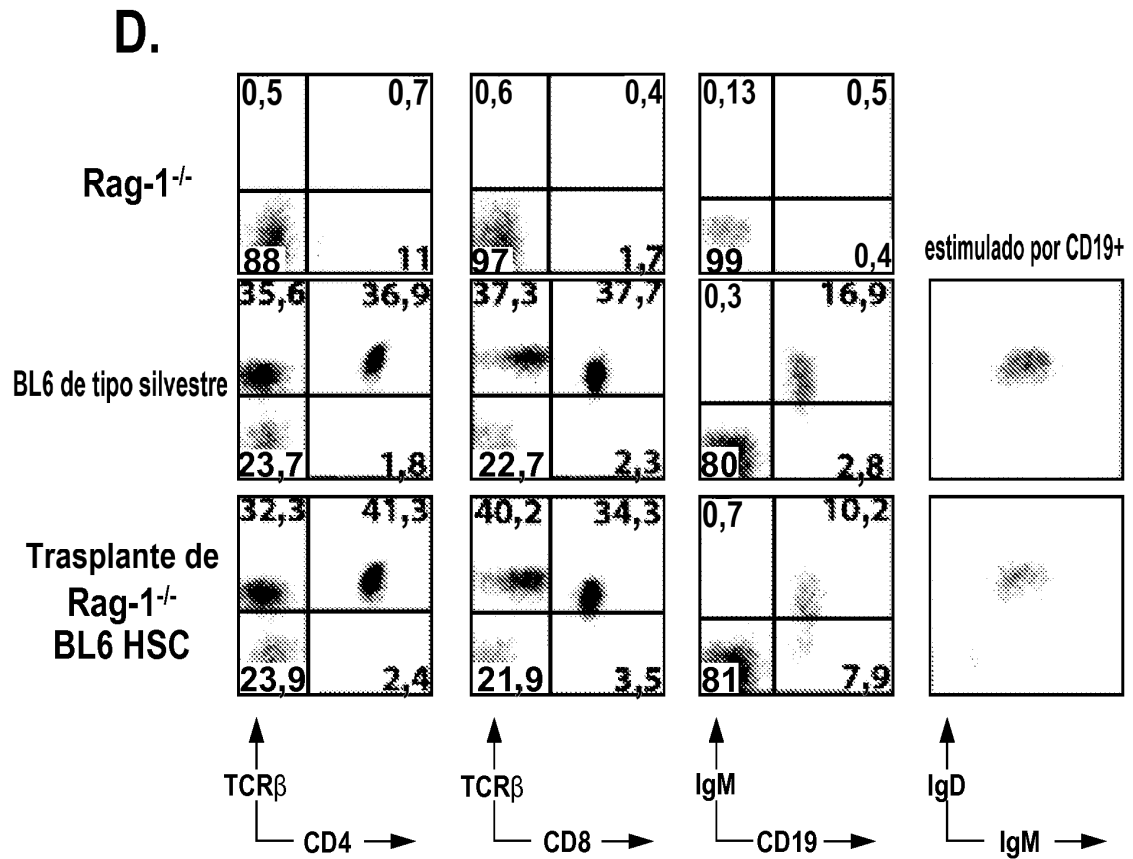


Fig. 2
(Continuación)

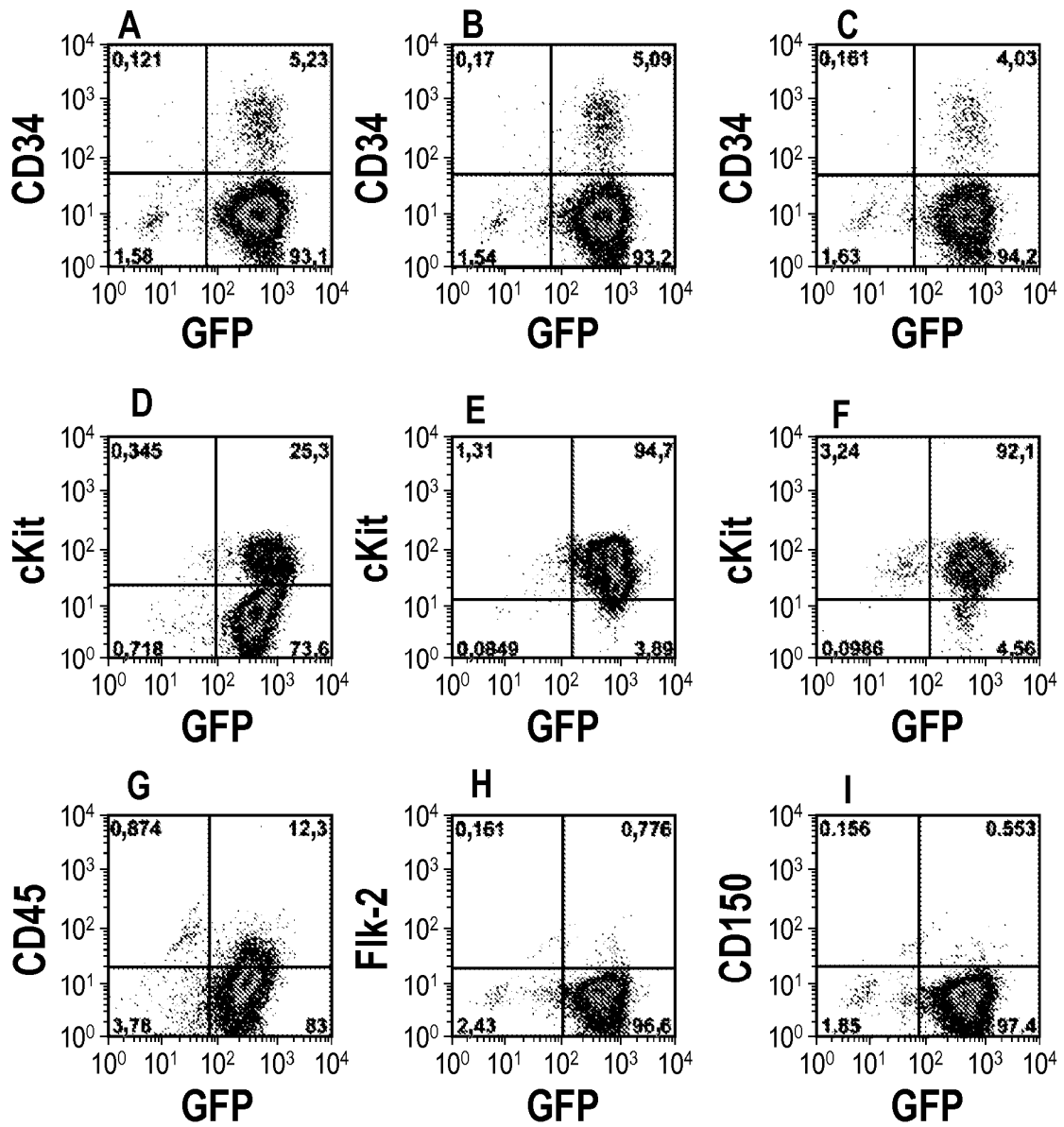


Fig. 3

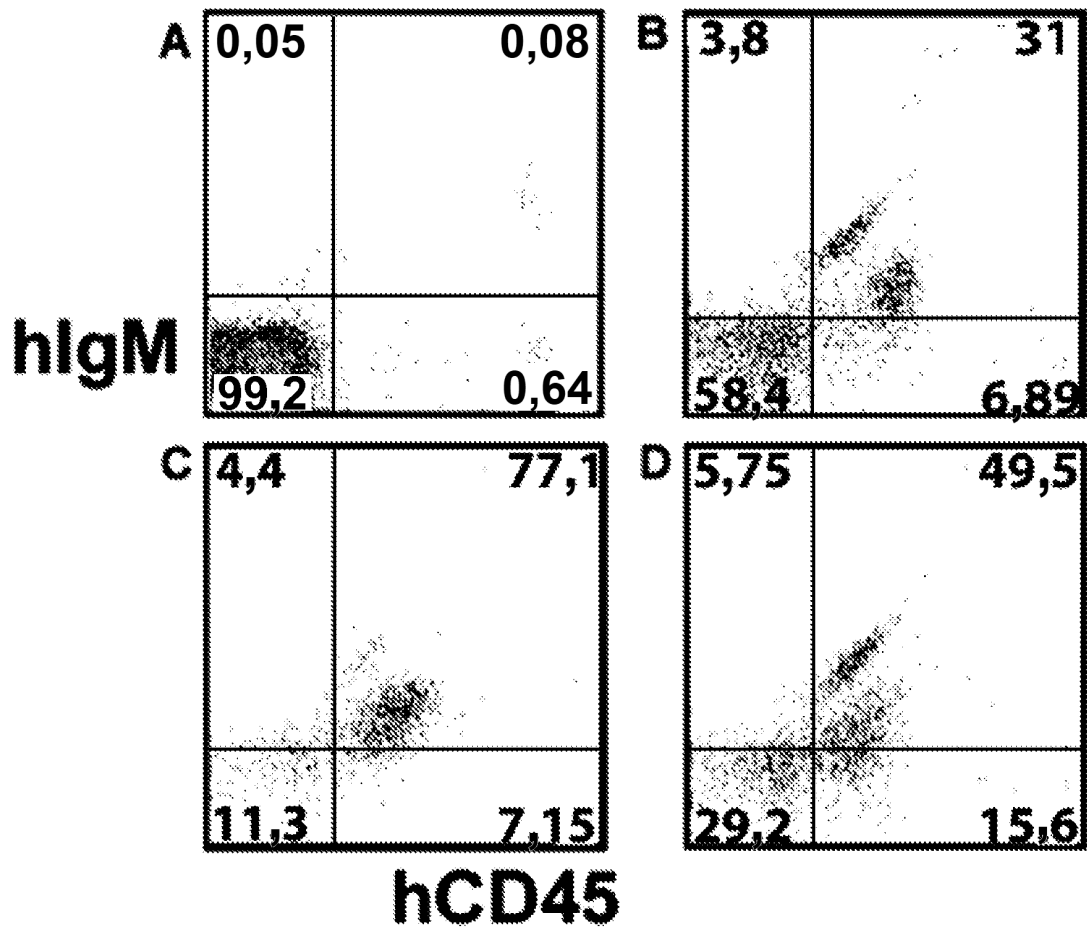


Fig. 4

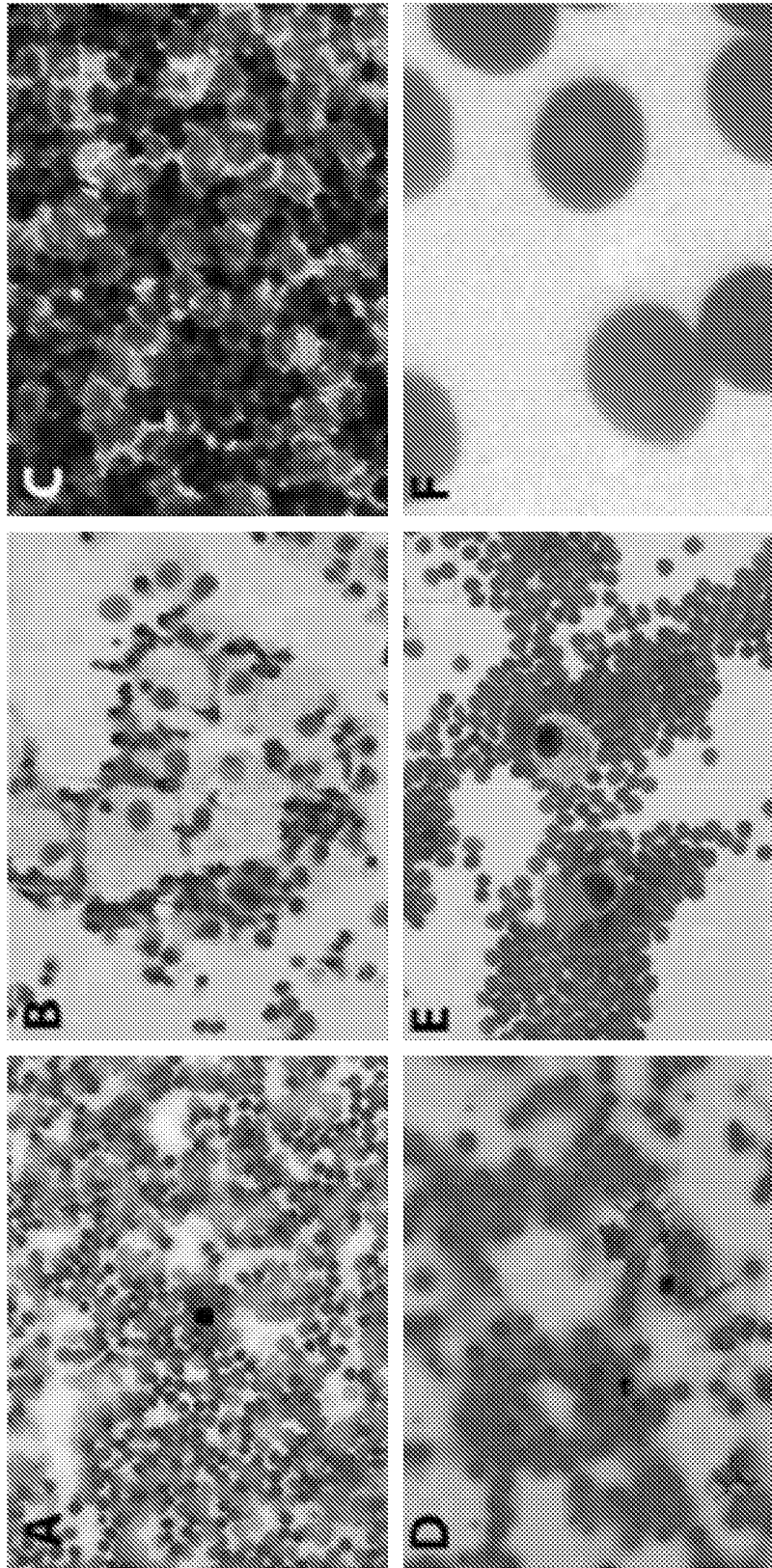
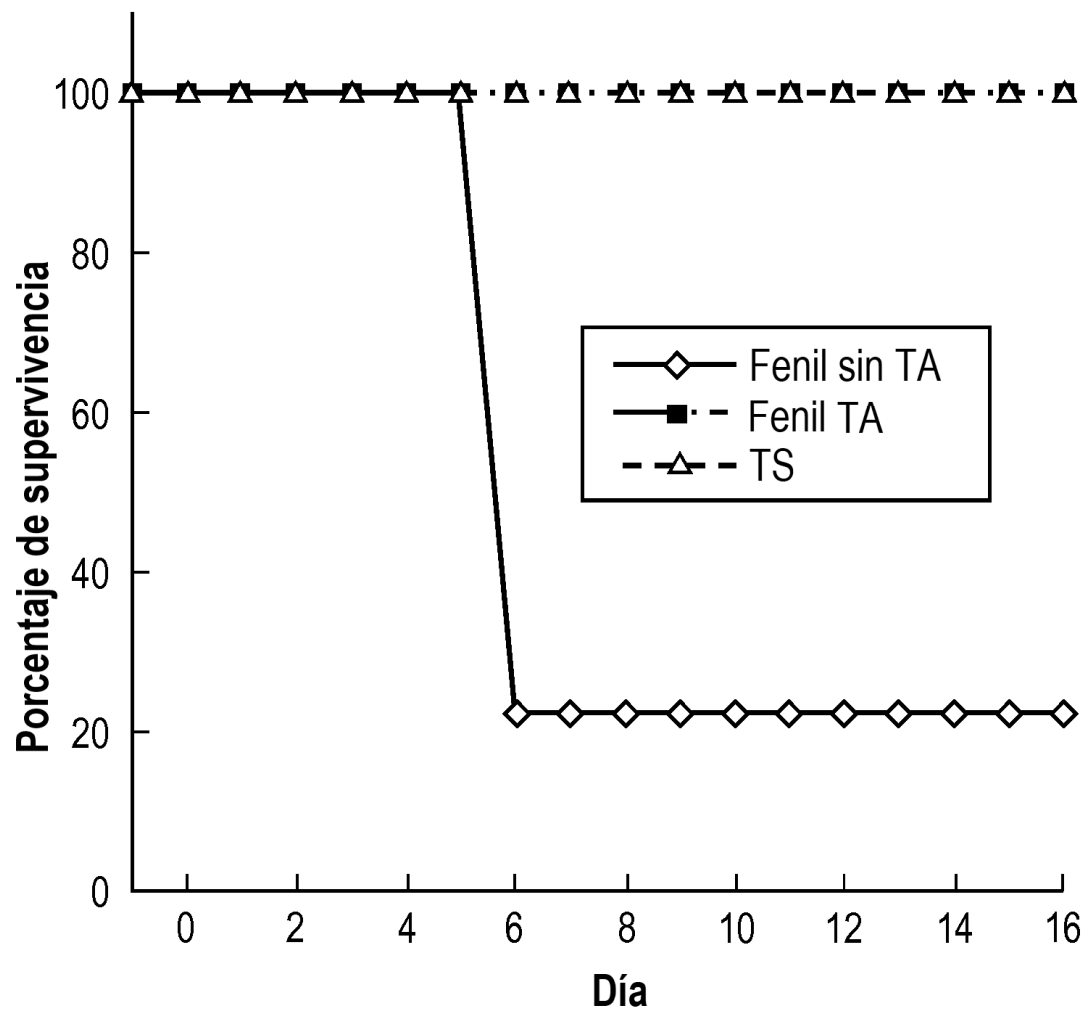


Fig. 5

***Fig. 6***

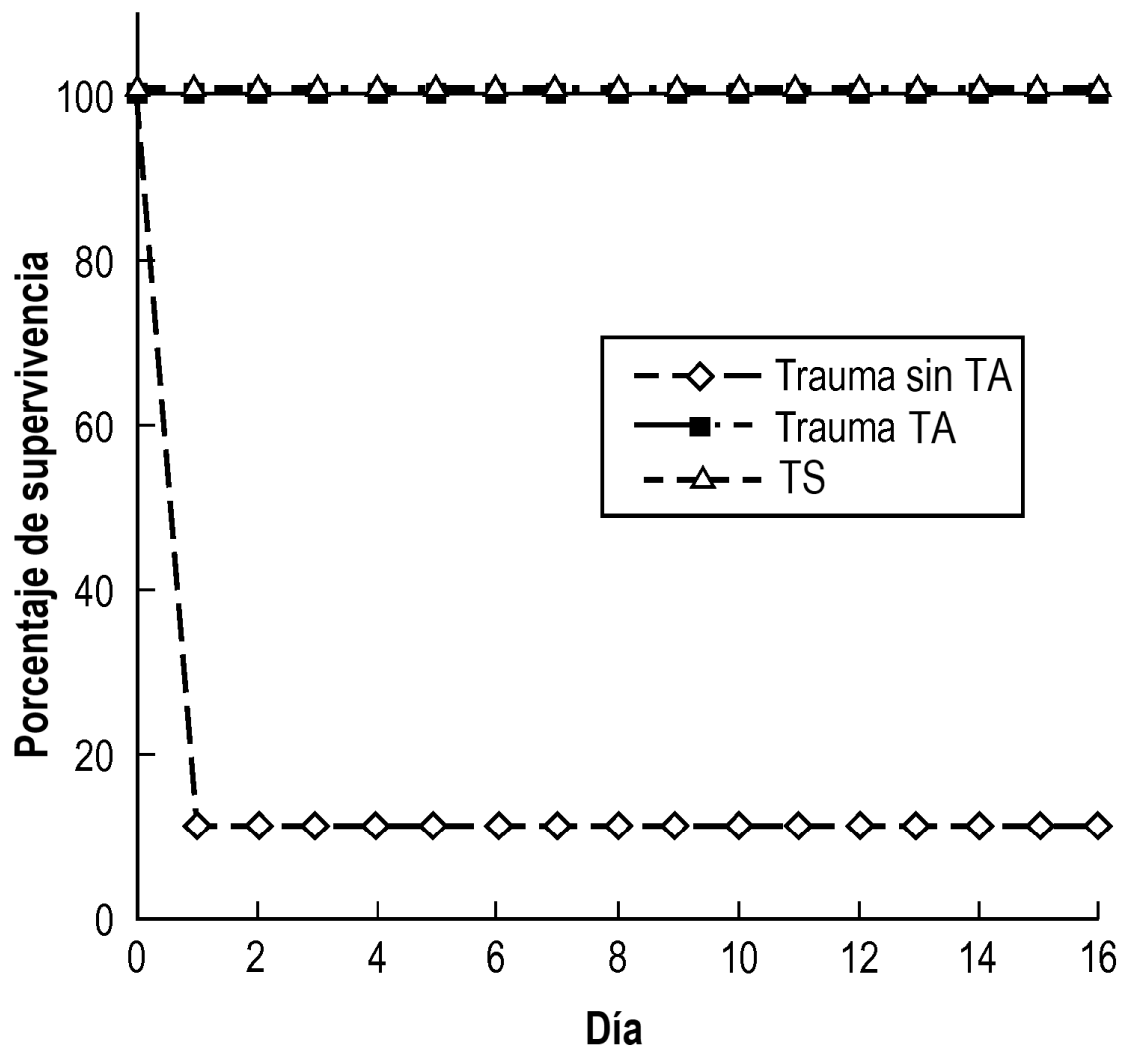


Fig. 7

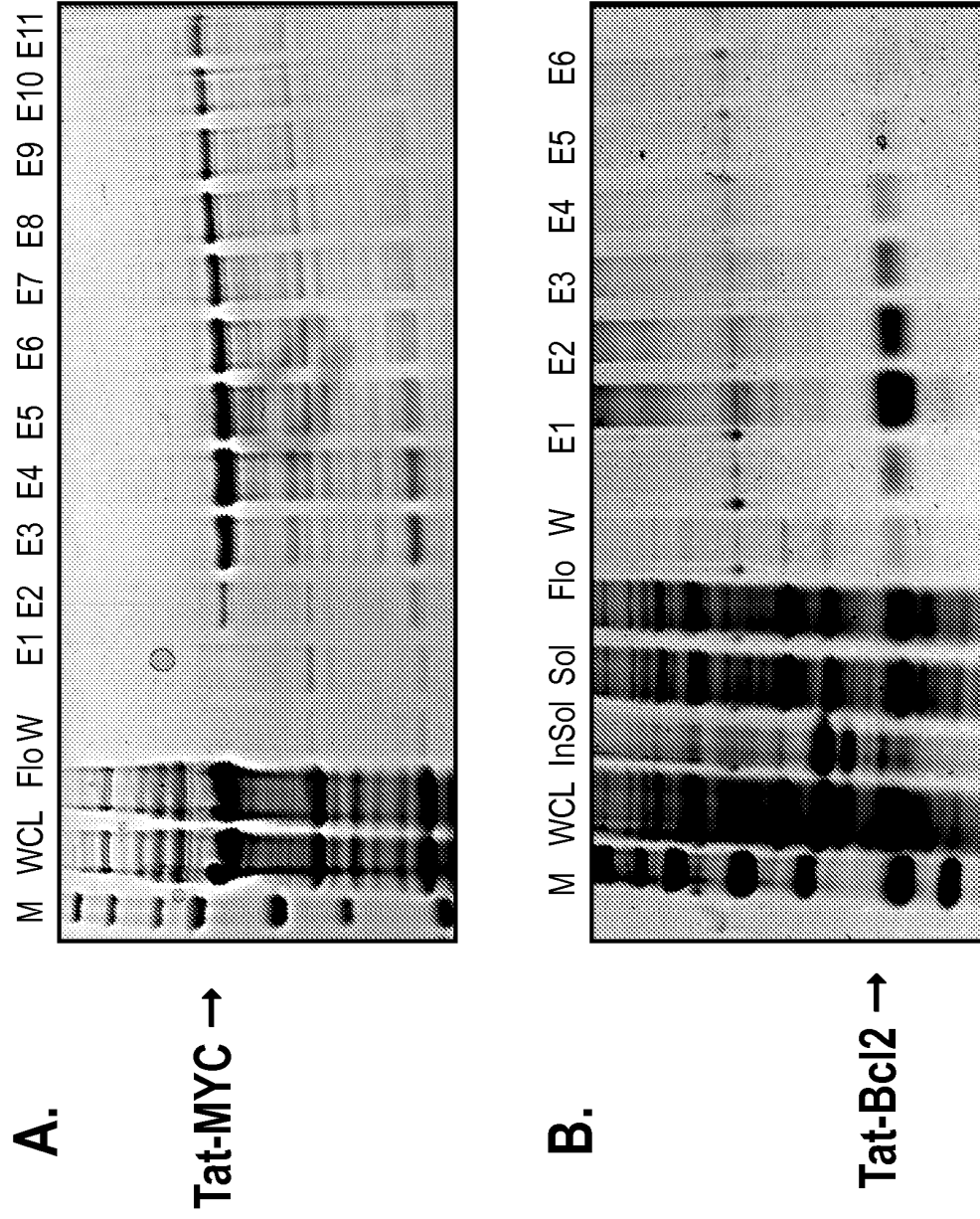


Fig. 8

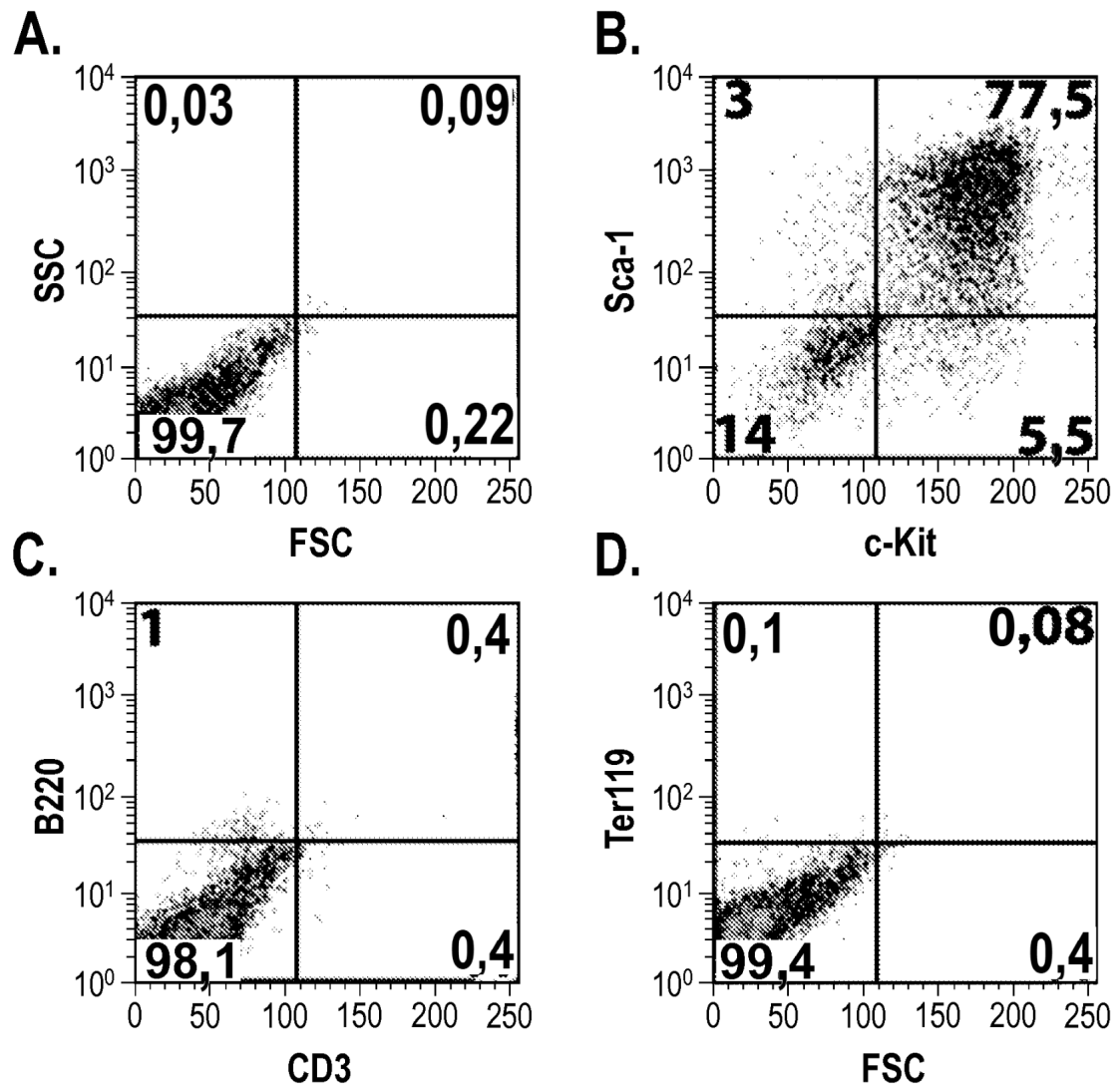


Fig. 9

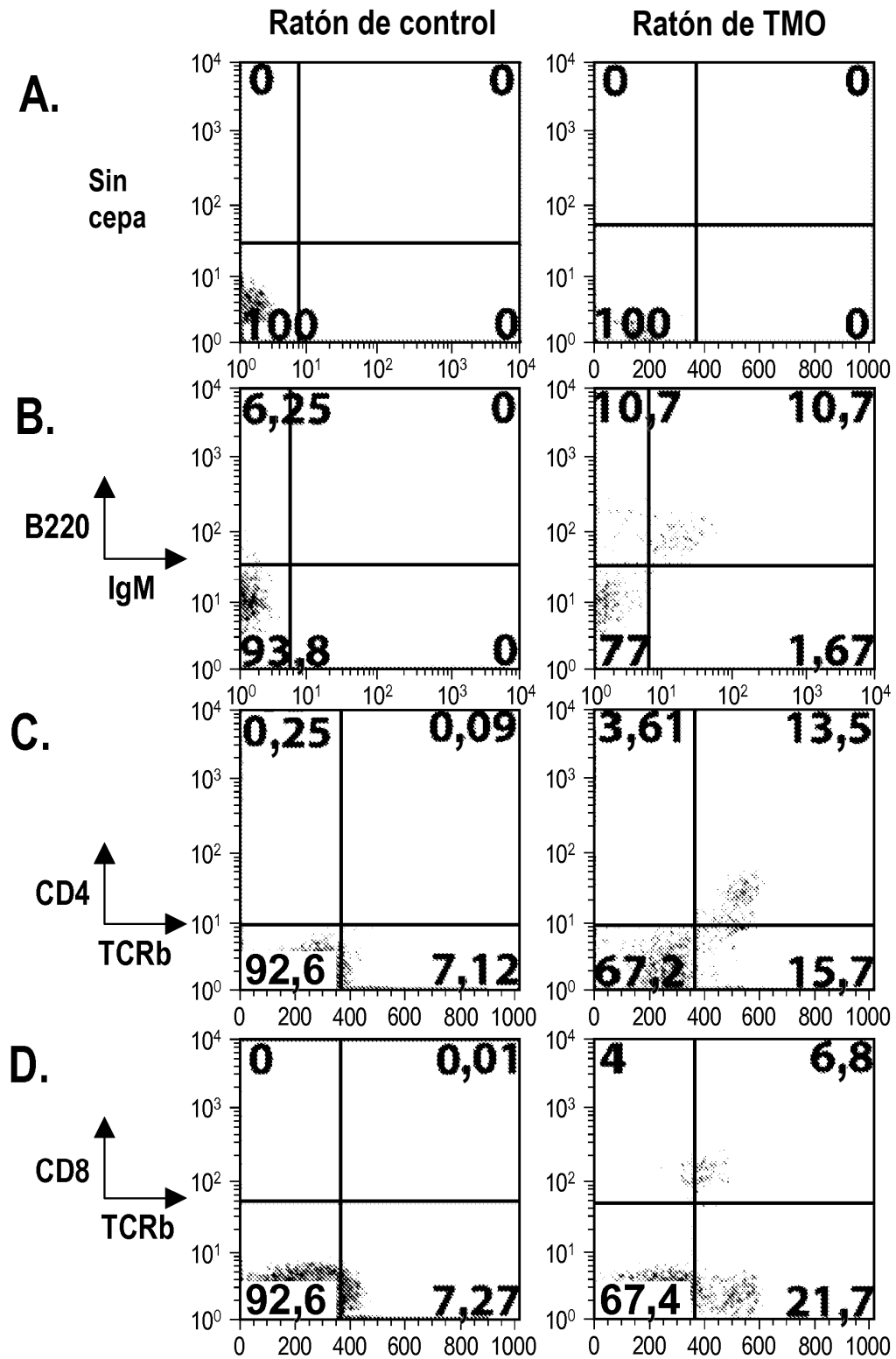


Fig. 10

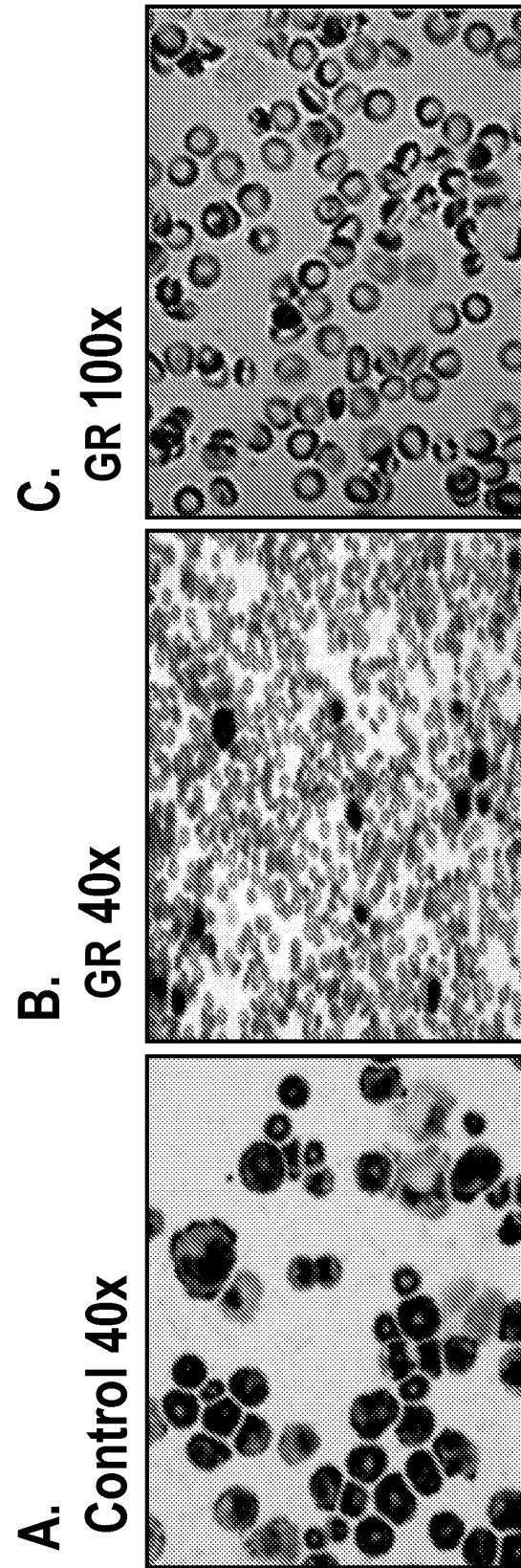
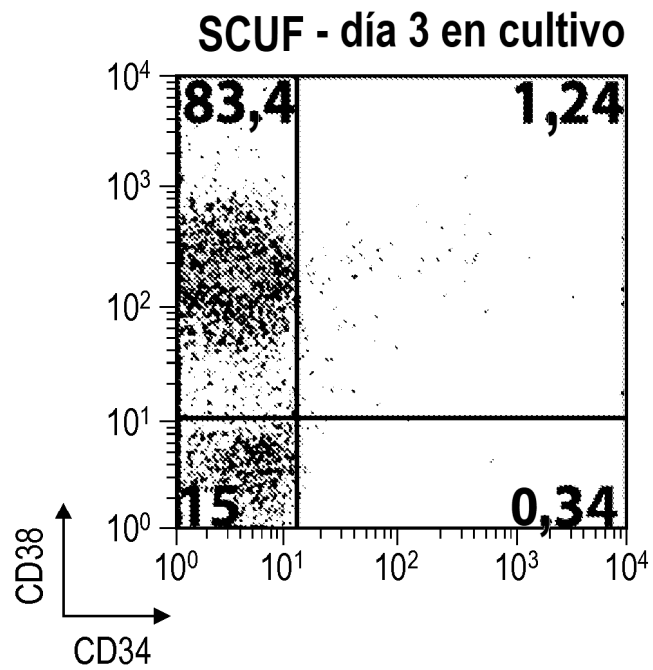


Fig. 11

A.



B.

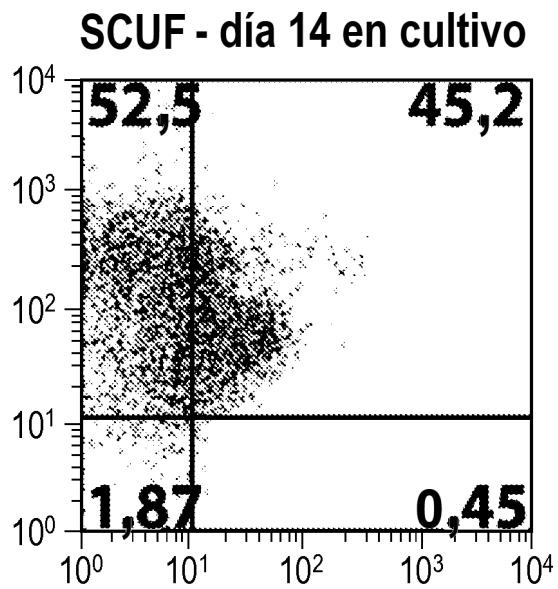


Fig. 12

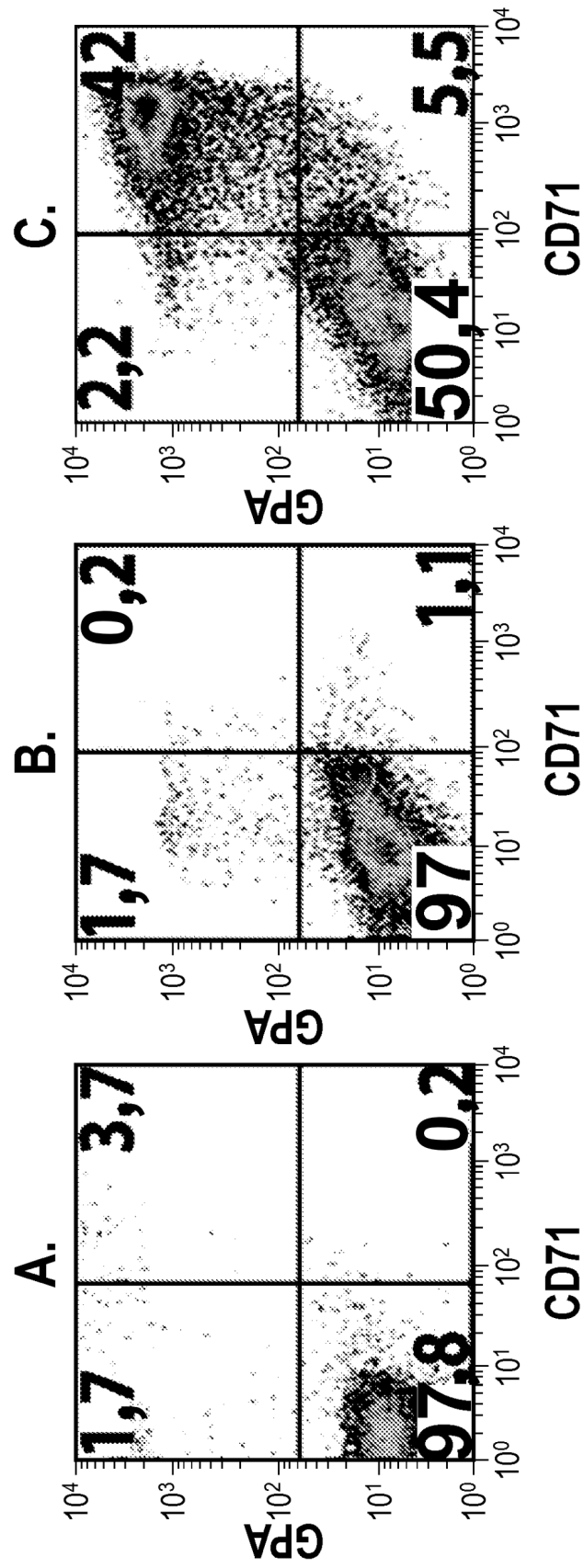


Fig. 13

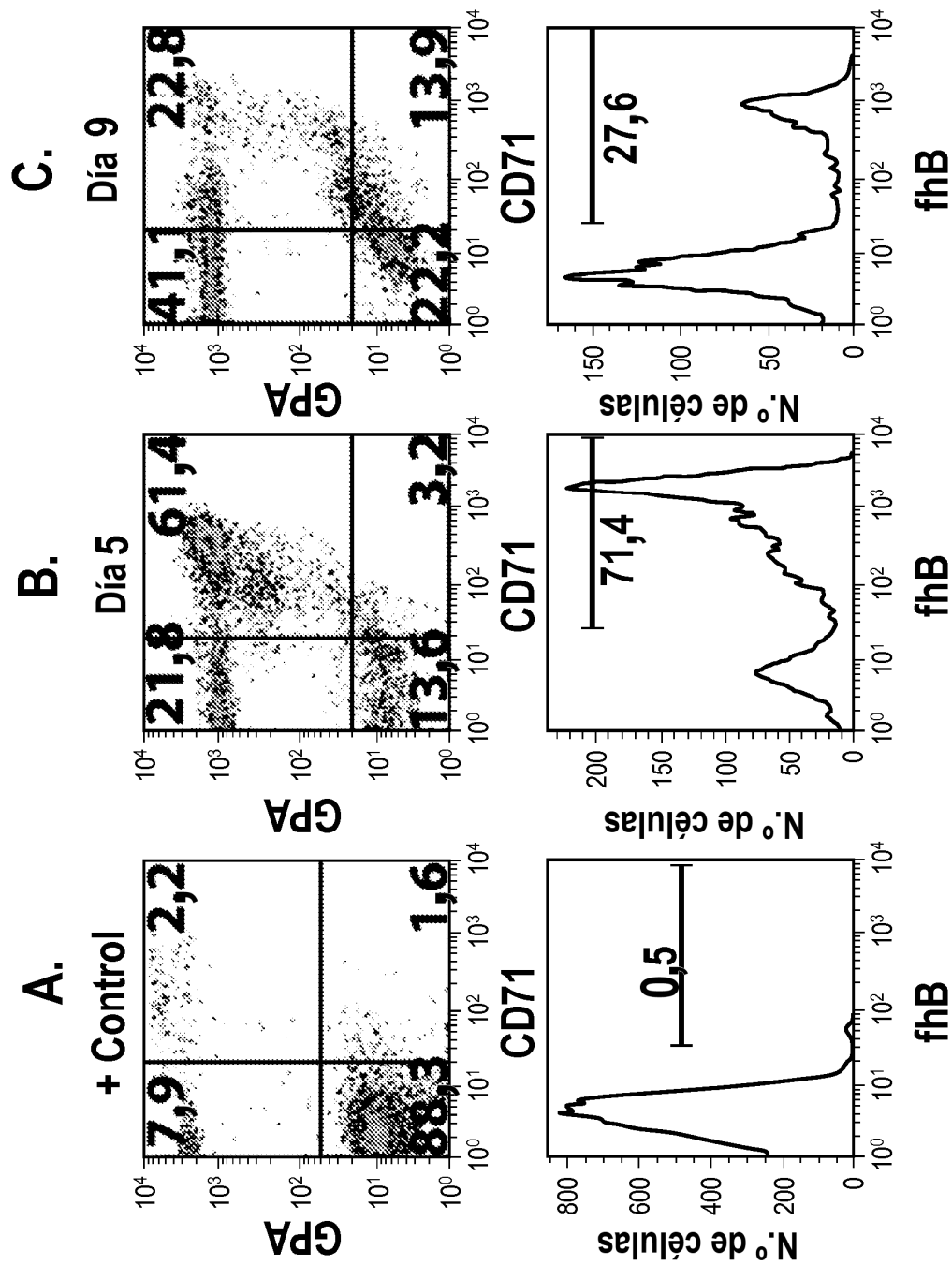
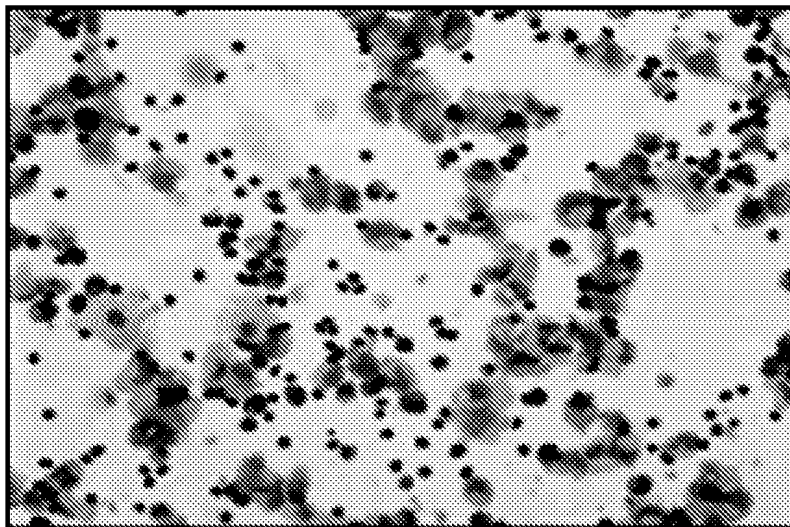


Fig. 14

A. Día 3



B. Día 7

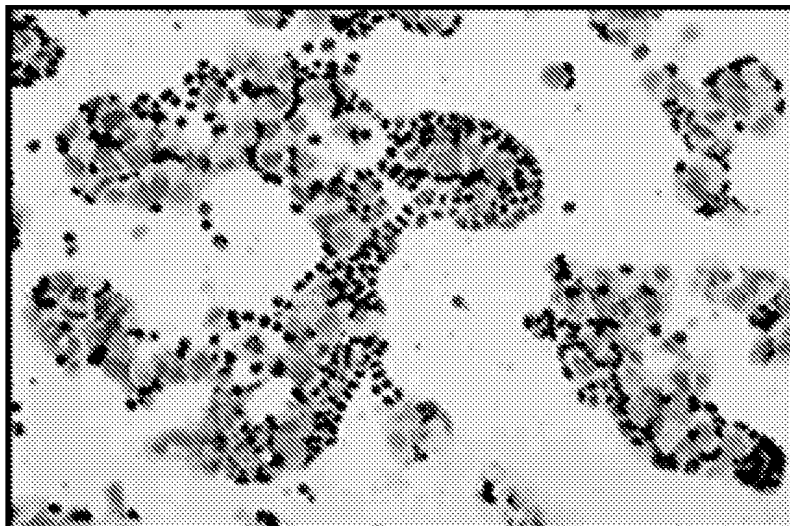


Fig. 15

A.



B.

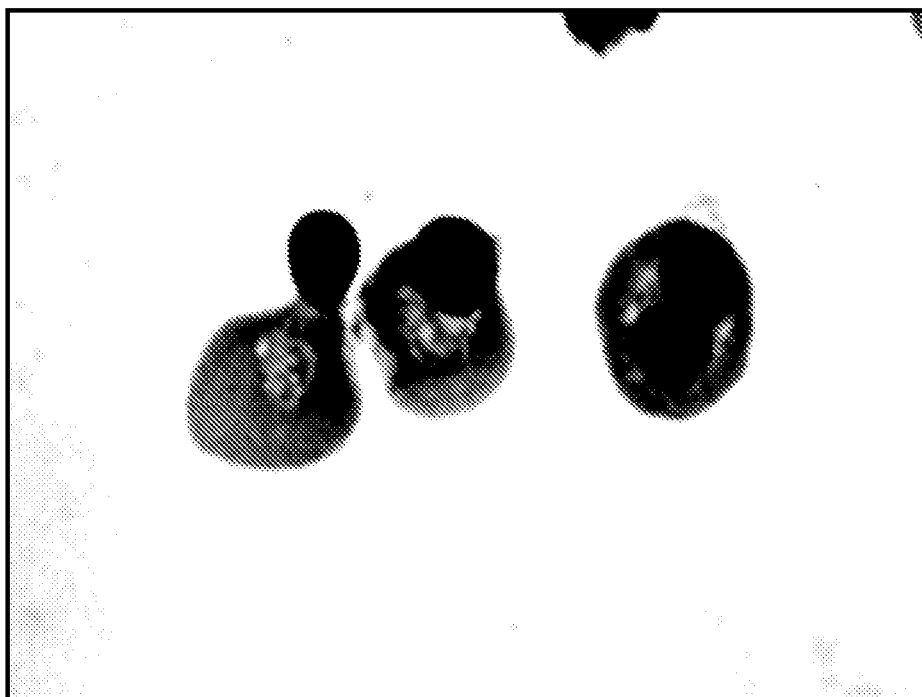


Fig. 16

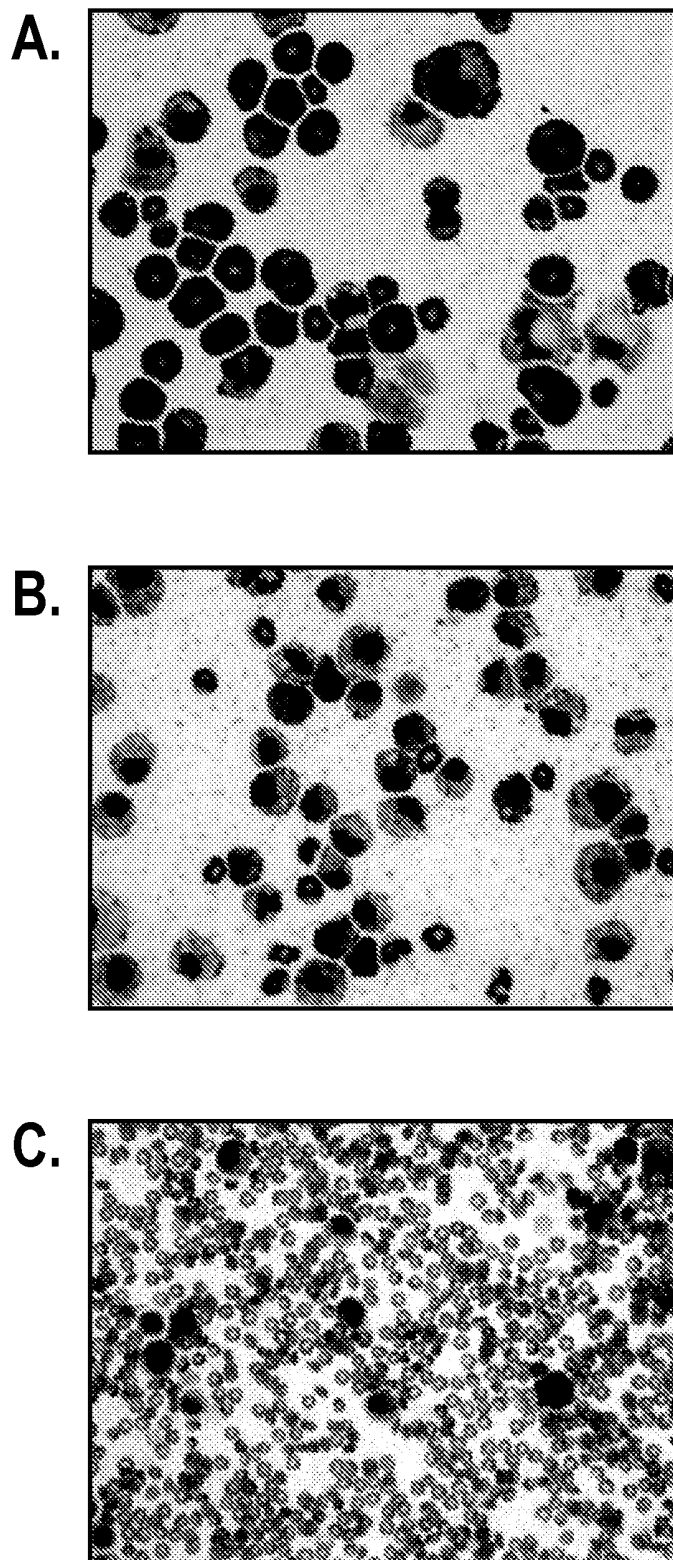


Fig. 17

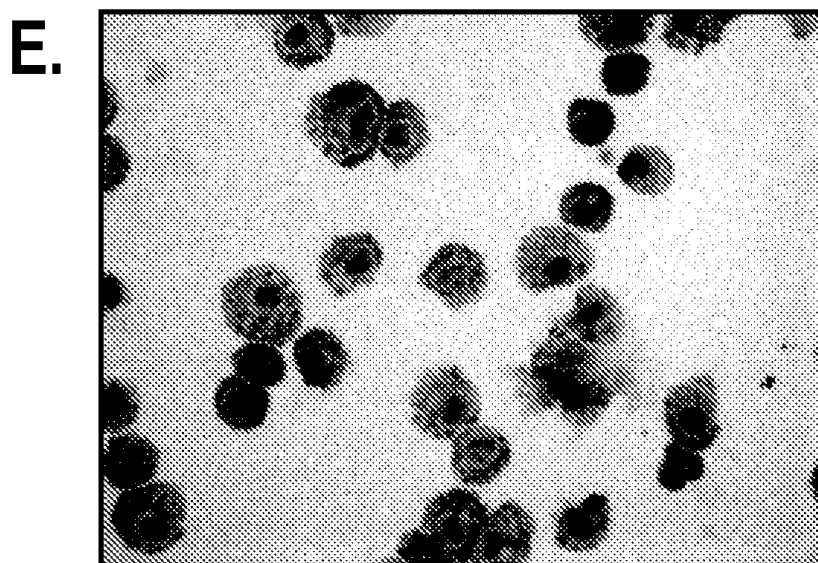
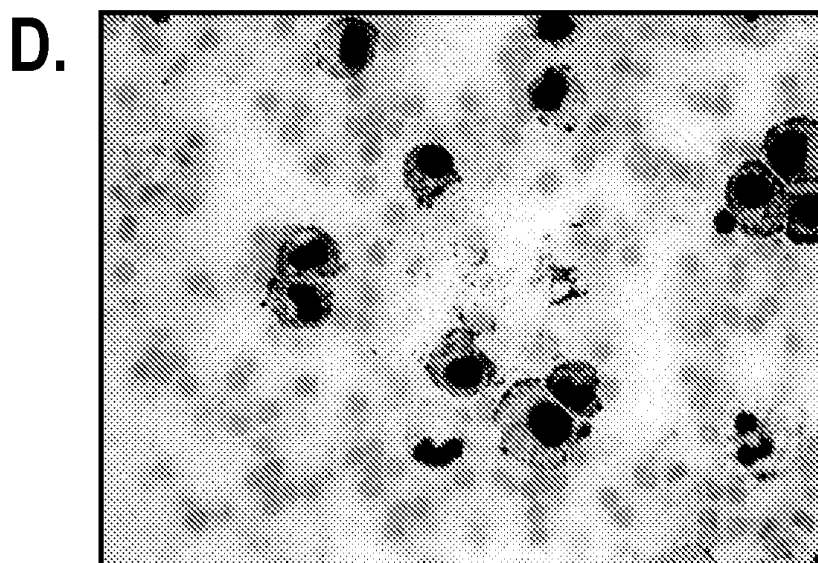


Fig. 17
(Continuación)

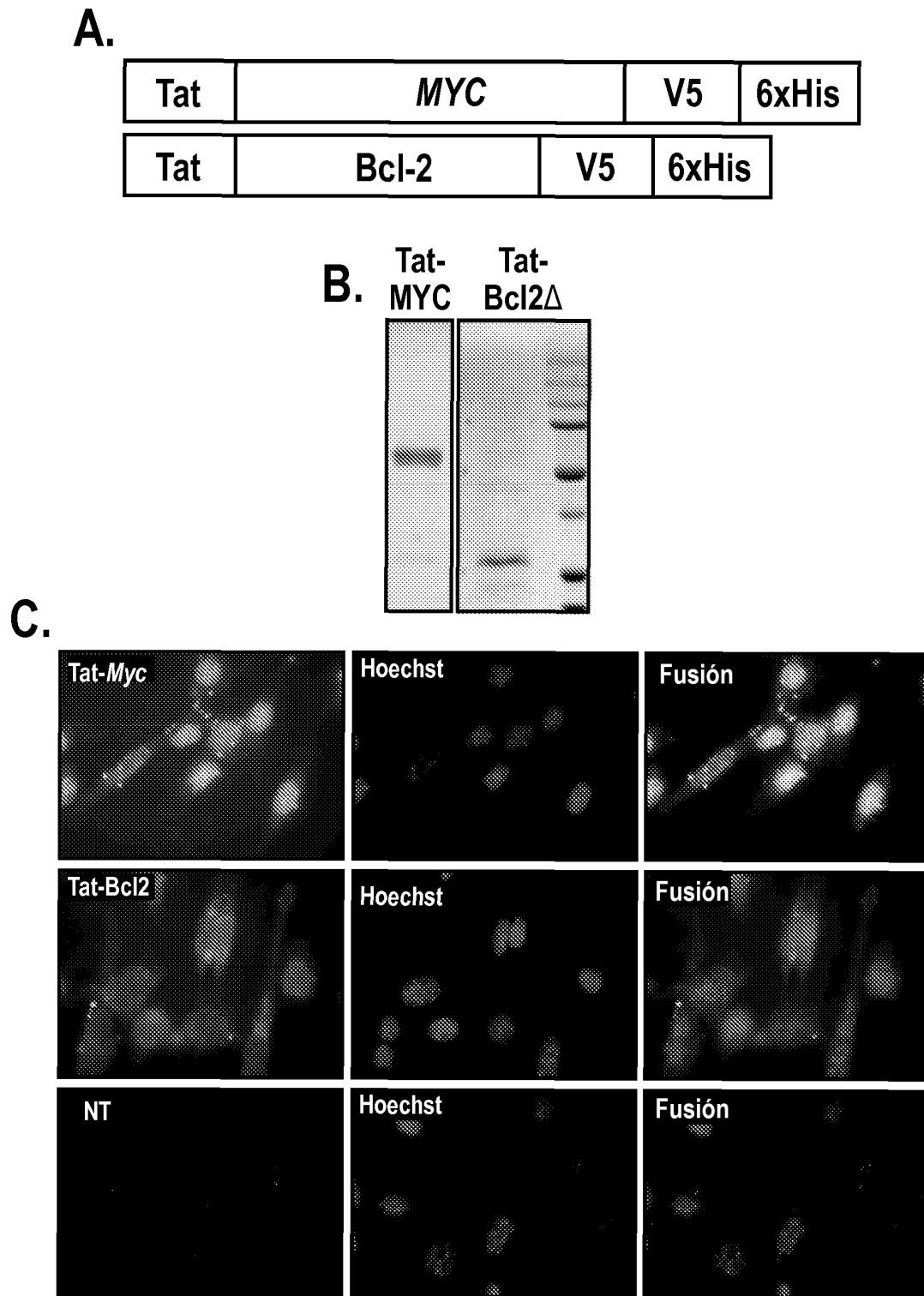


Fig. 18

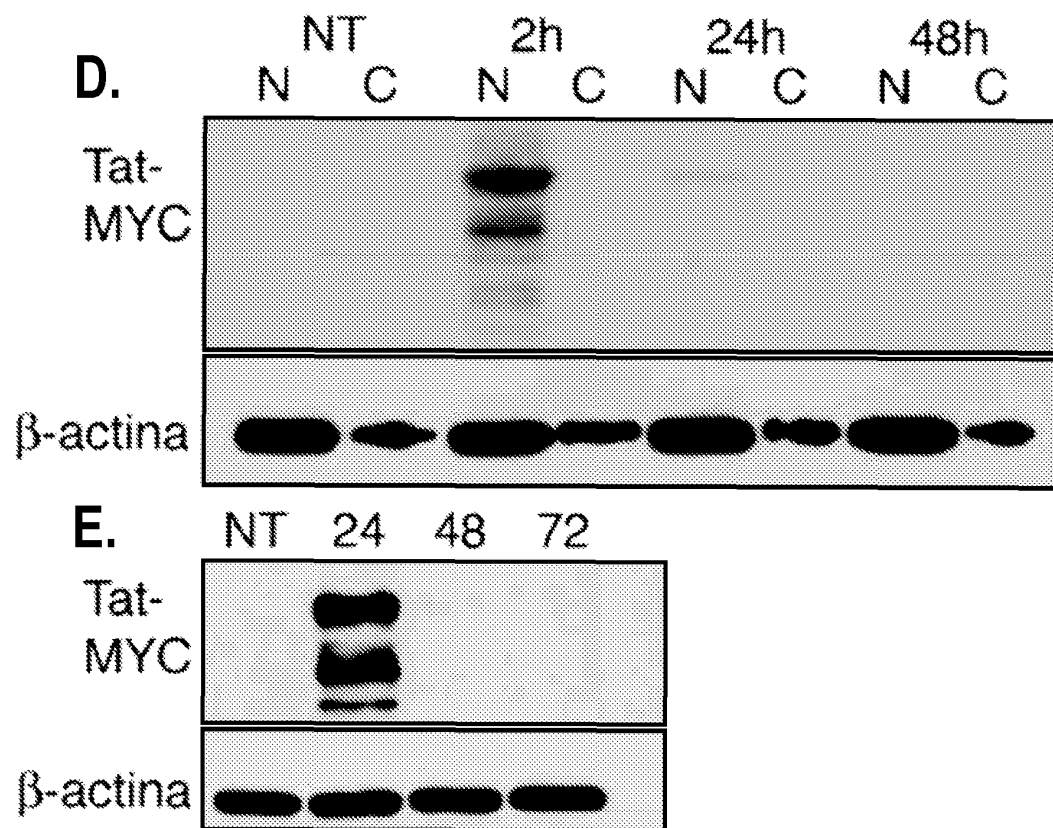


Fig. 18

(Continuación)

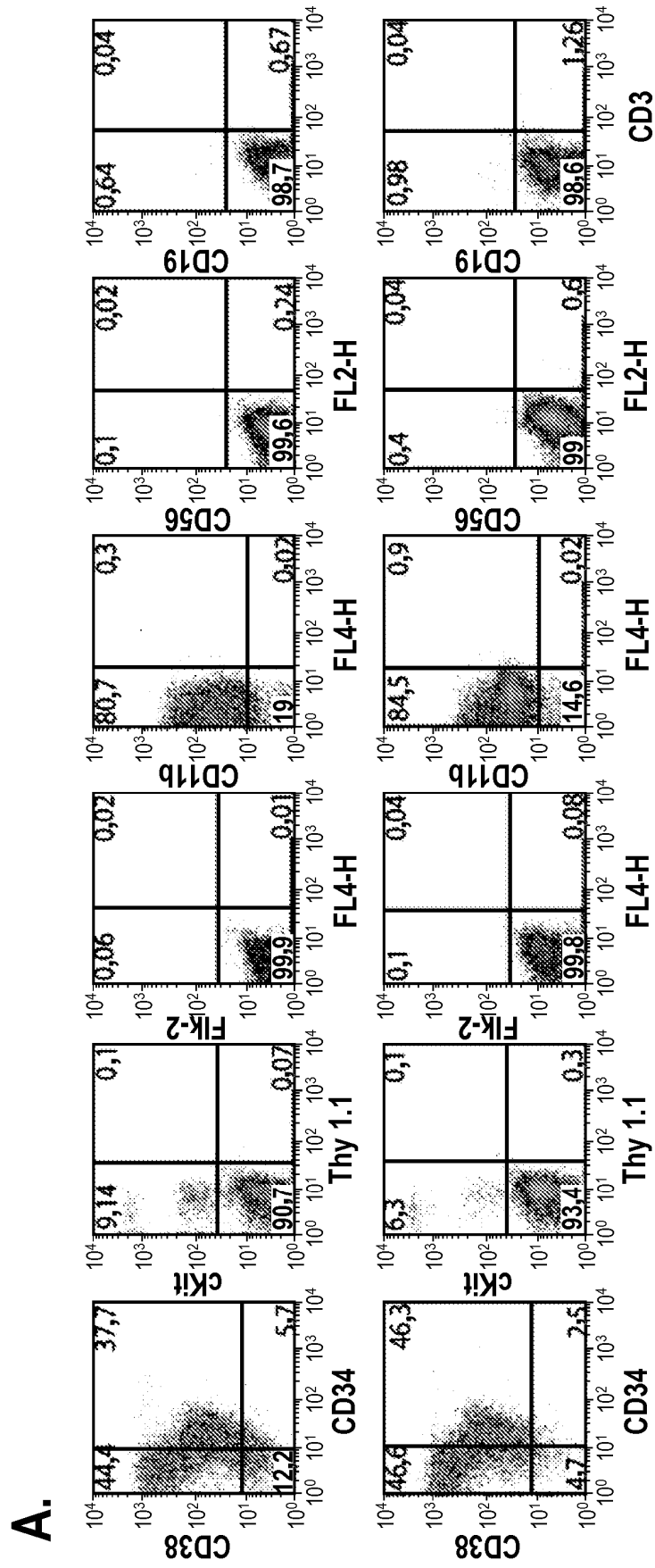


Fig. 19

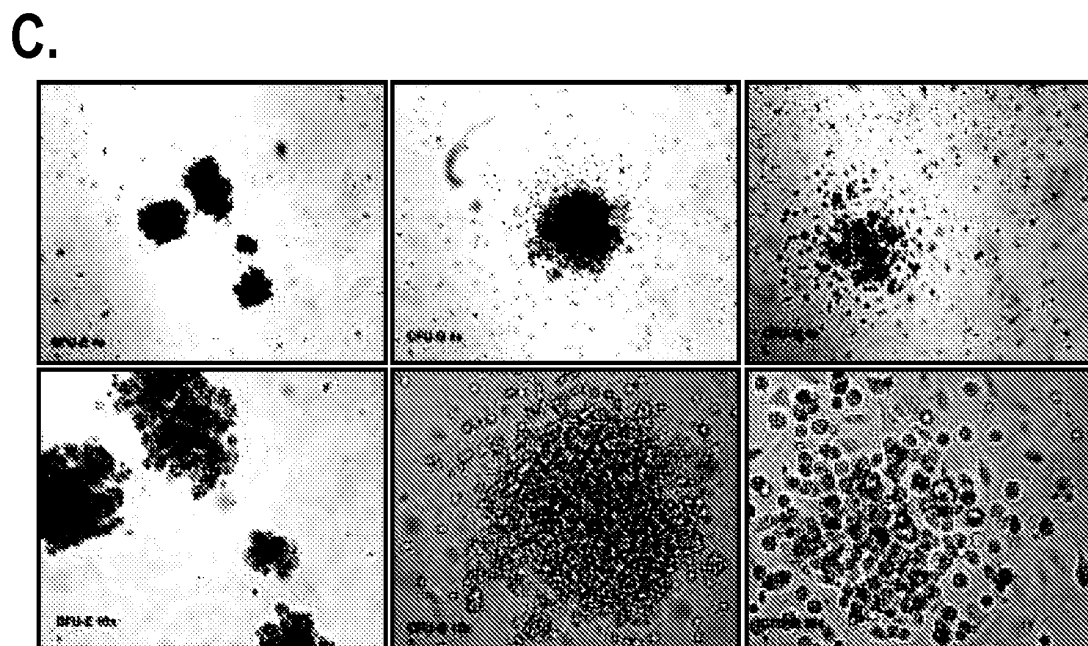
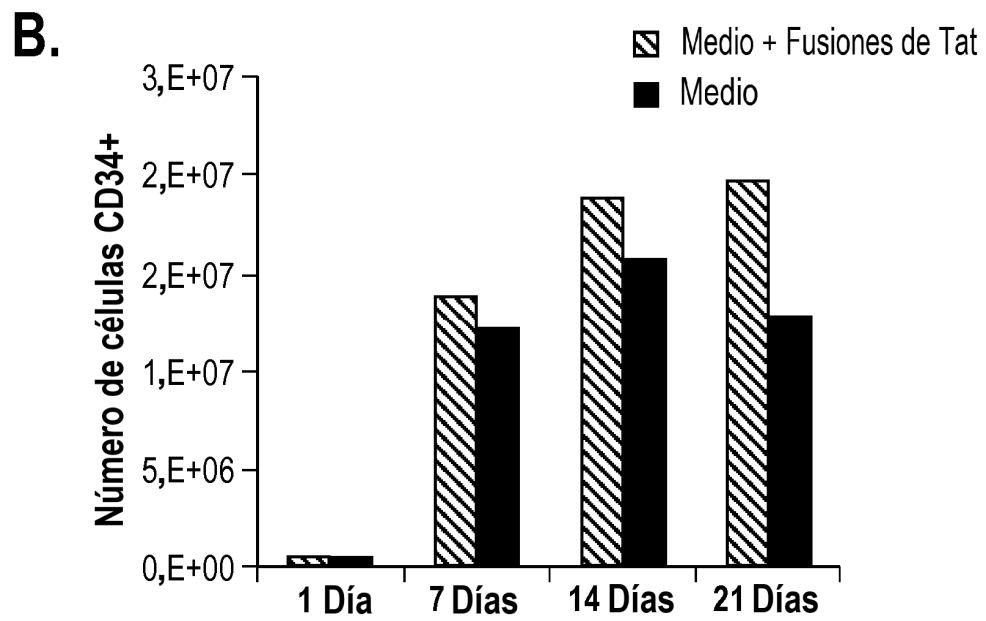


Fig. 19
 (Continuación)

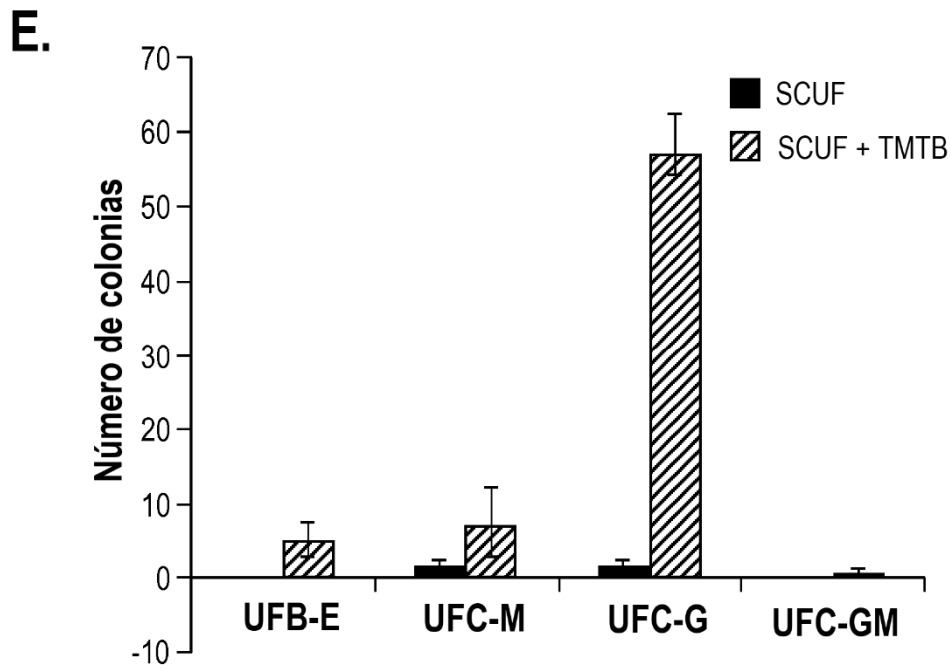
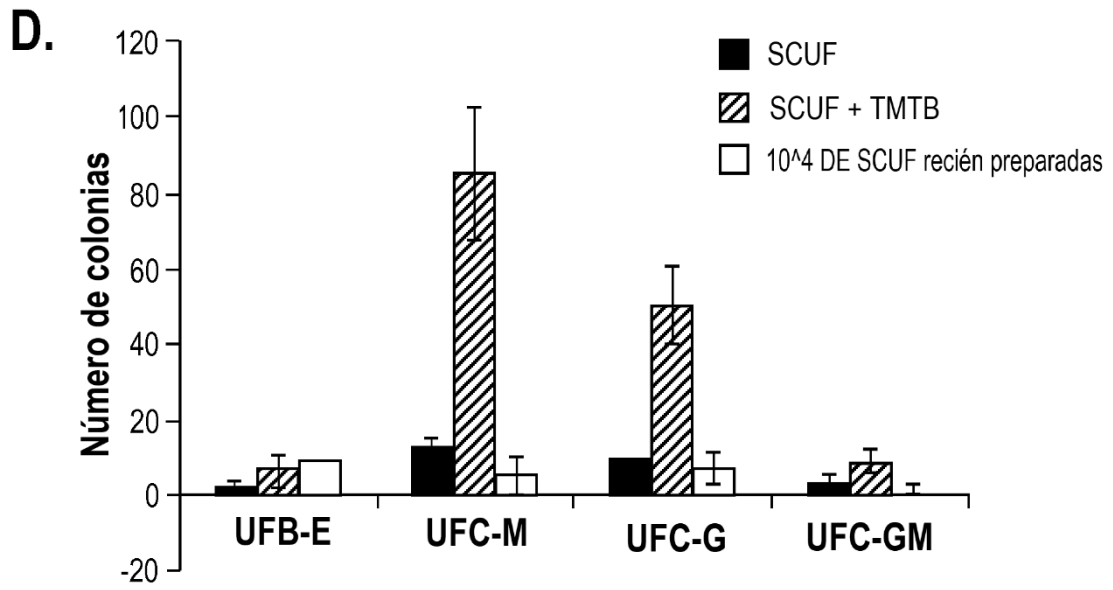


Fig. 19

(Continuación)

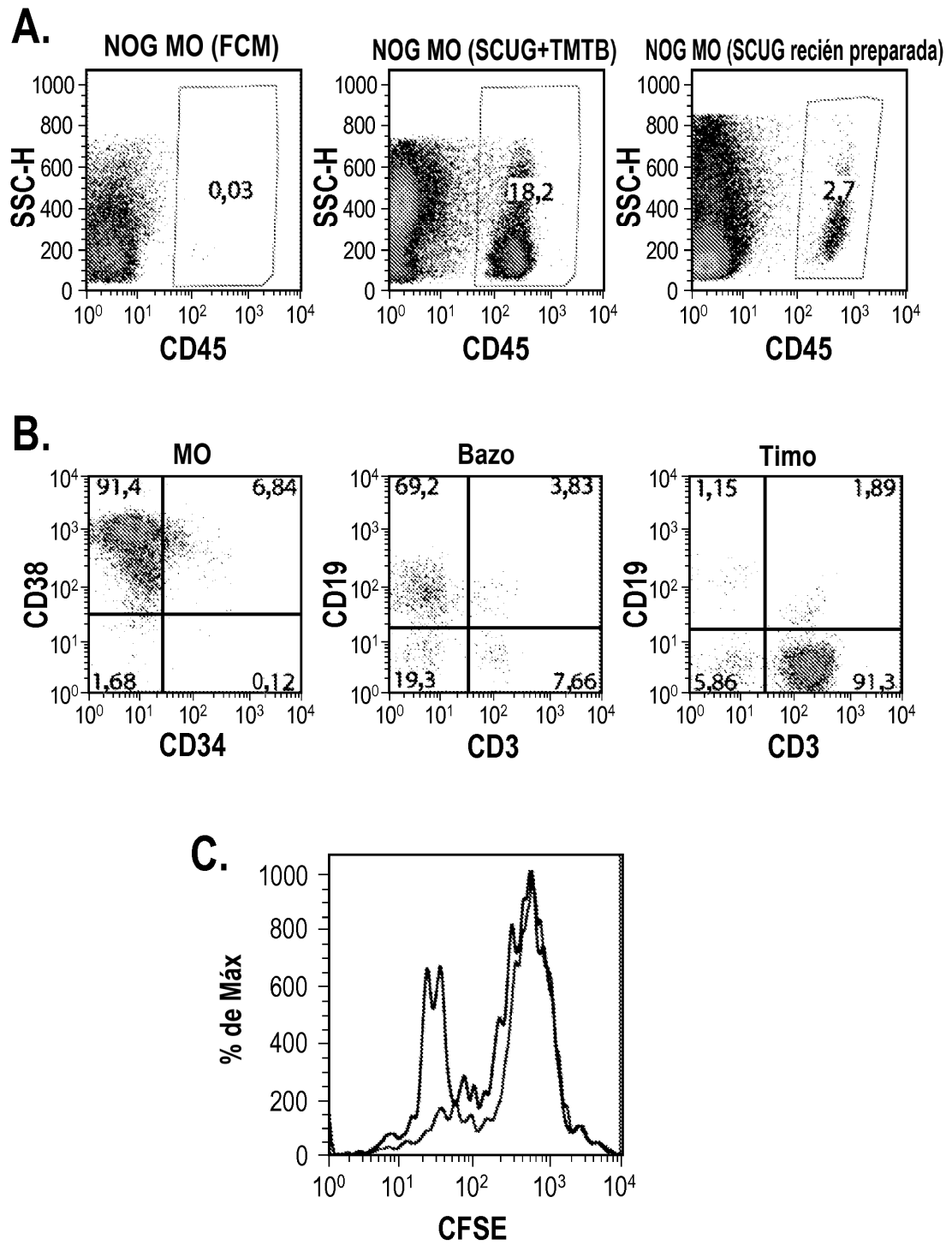


Fig. 20

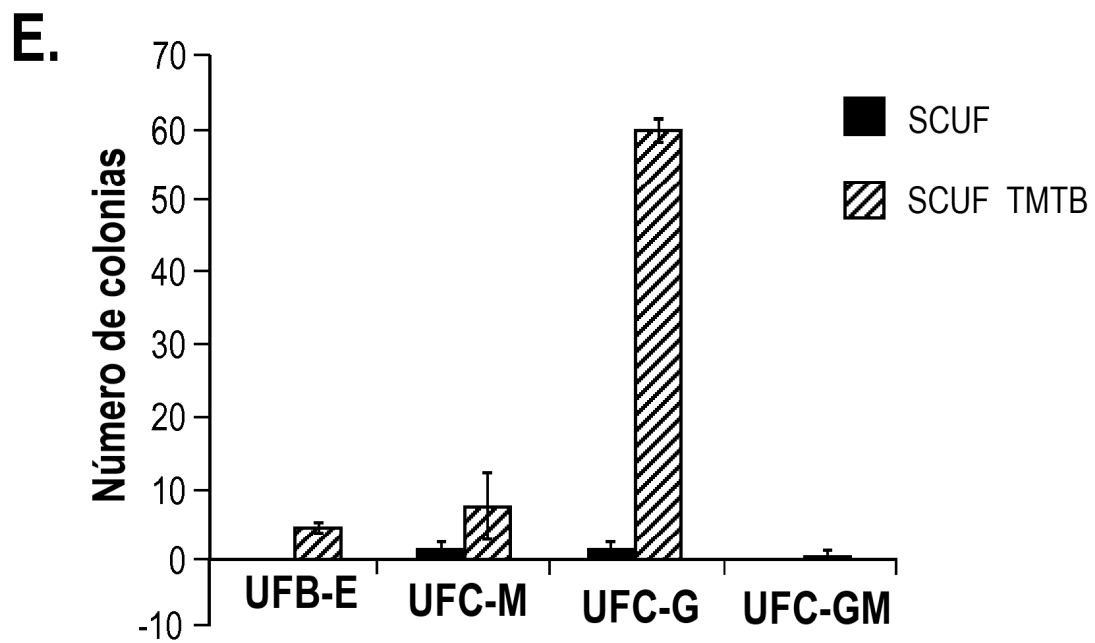
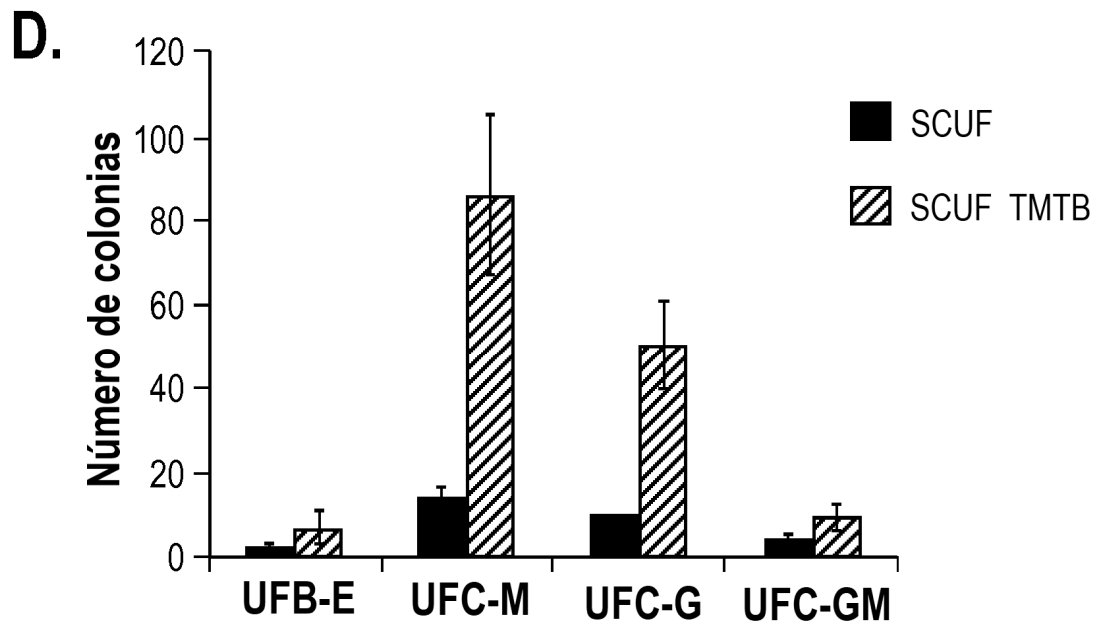


Fig. 20

(Continuación)

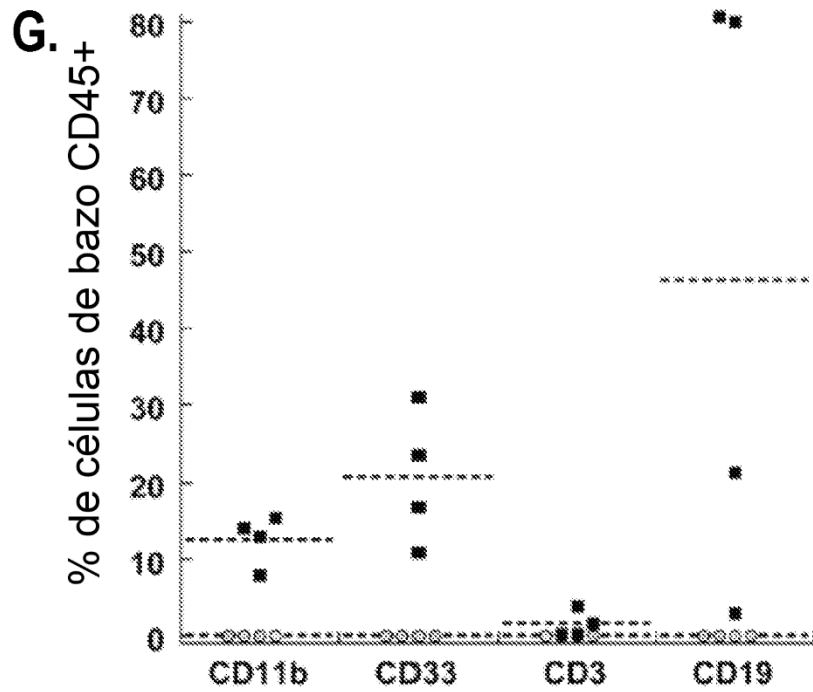
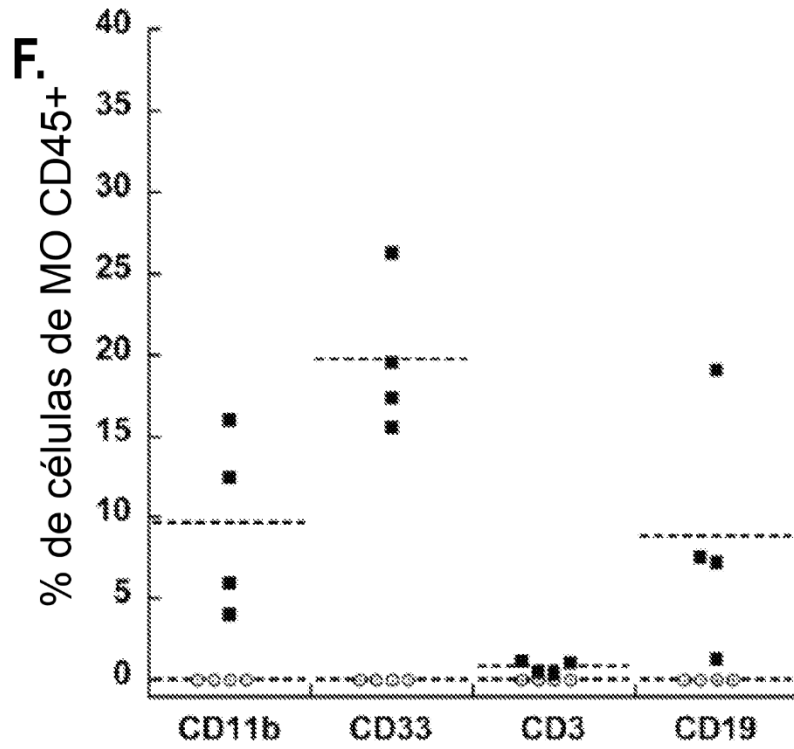


Fig. 20
(Continuación)

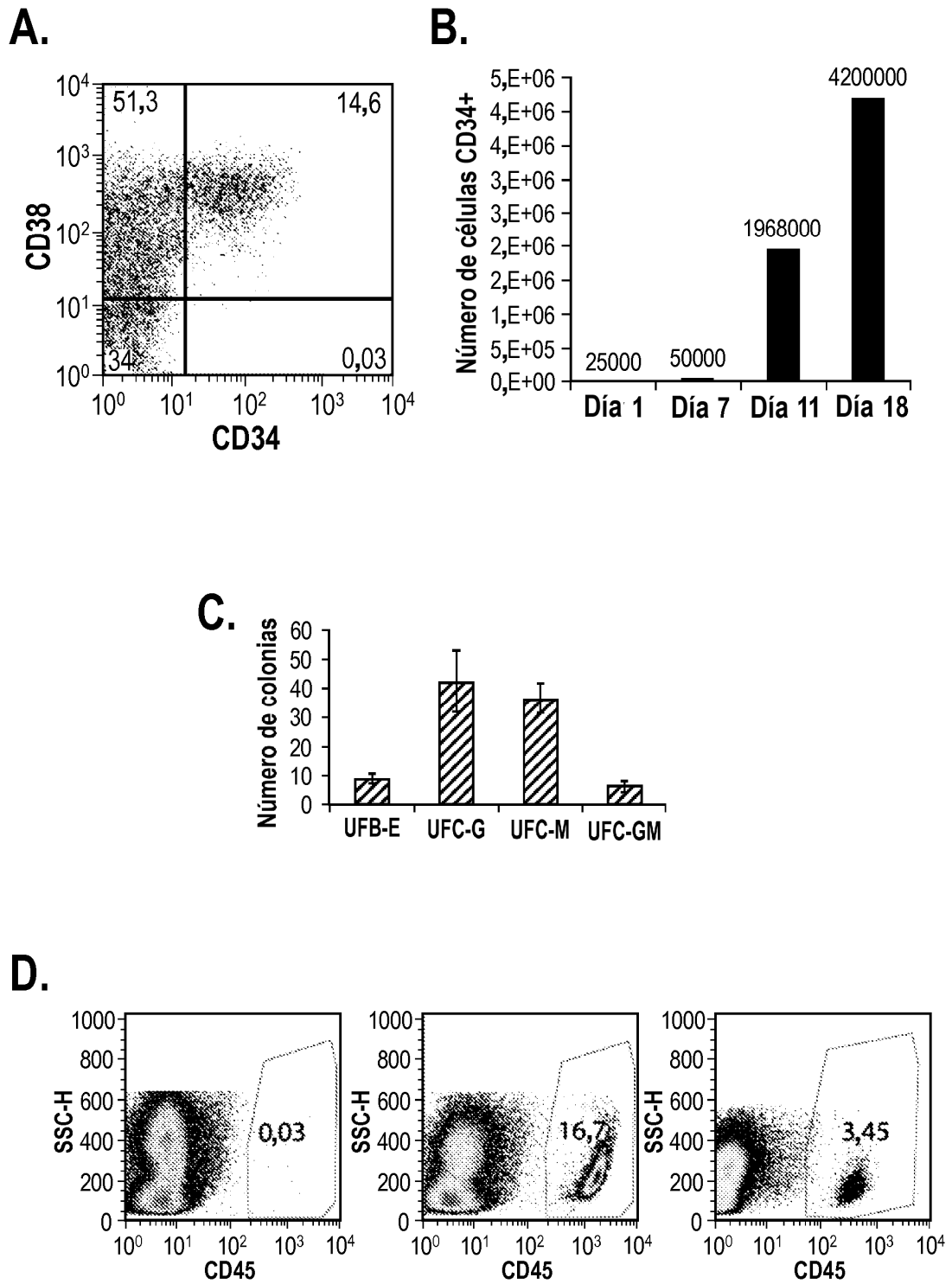
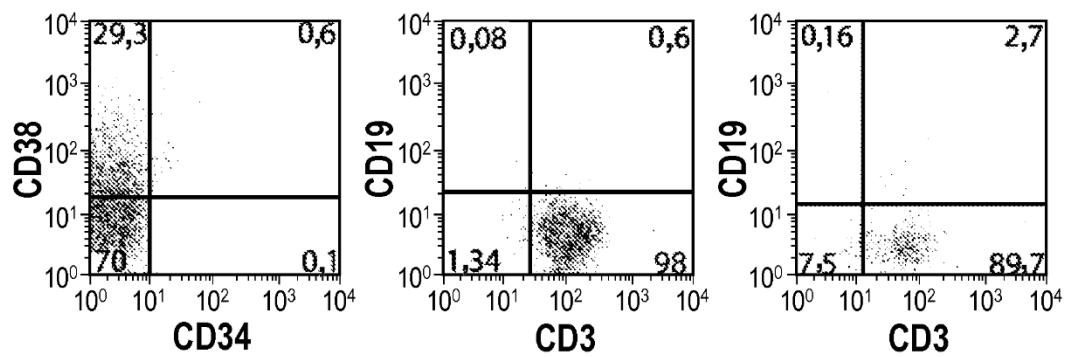
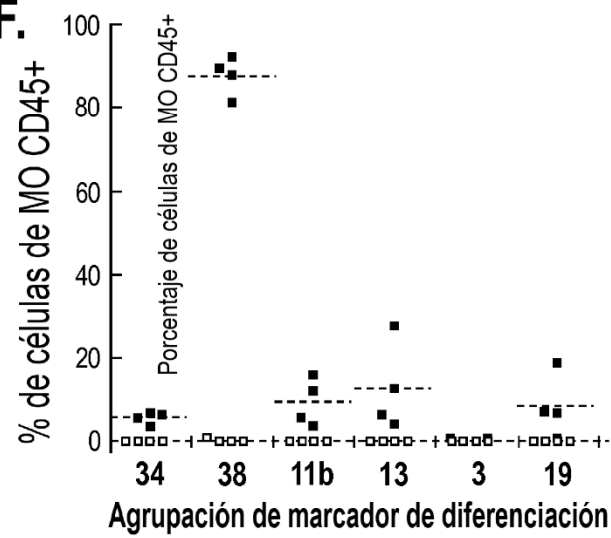


Fig. 21

E.



F.



G.

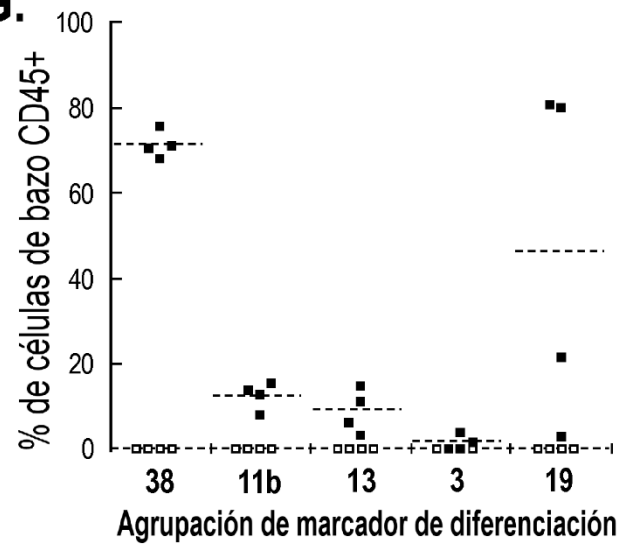


Fig. 21

(Continuación)

A.

Tat	MYC	V5	6xHis
Tat	3AMYC	V5	6xHis
EPTD	MYC	V5	6xHis
EPTD	3AMYC	V5	6xHis
VPR	MYC	V5	6xHis
MYC		VPR	V5
			6xHis

Porcentaje de linfocitos T activados vivos 48 h después
del tratamiento con PTD-MYC

B.

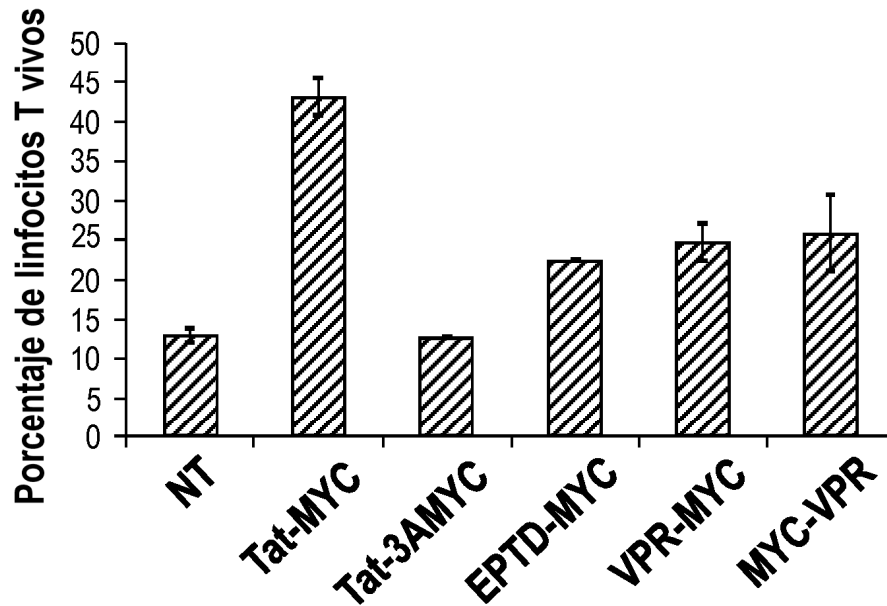


Fig. 22

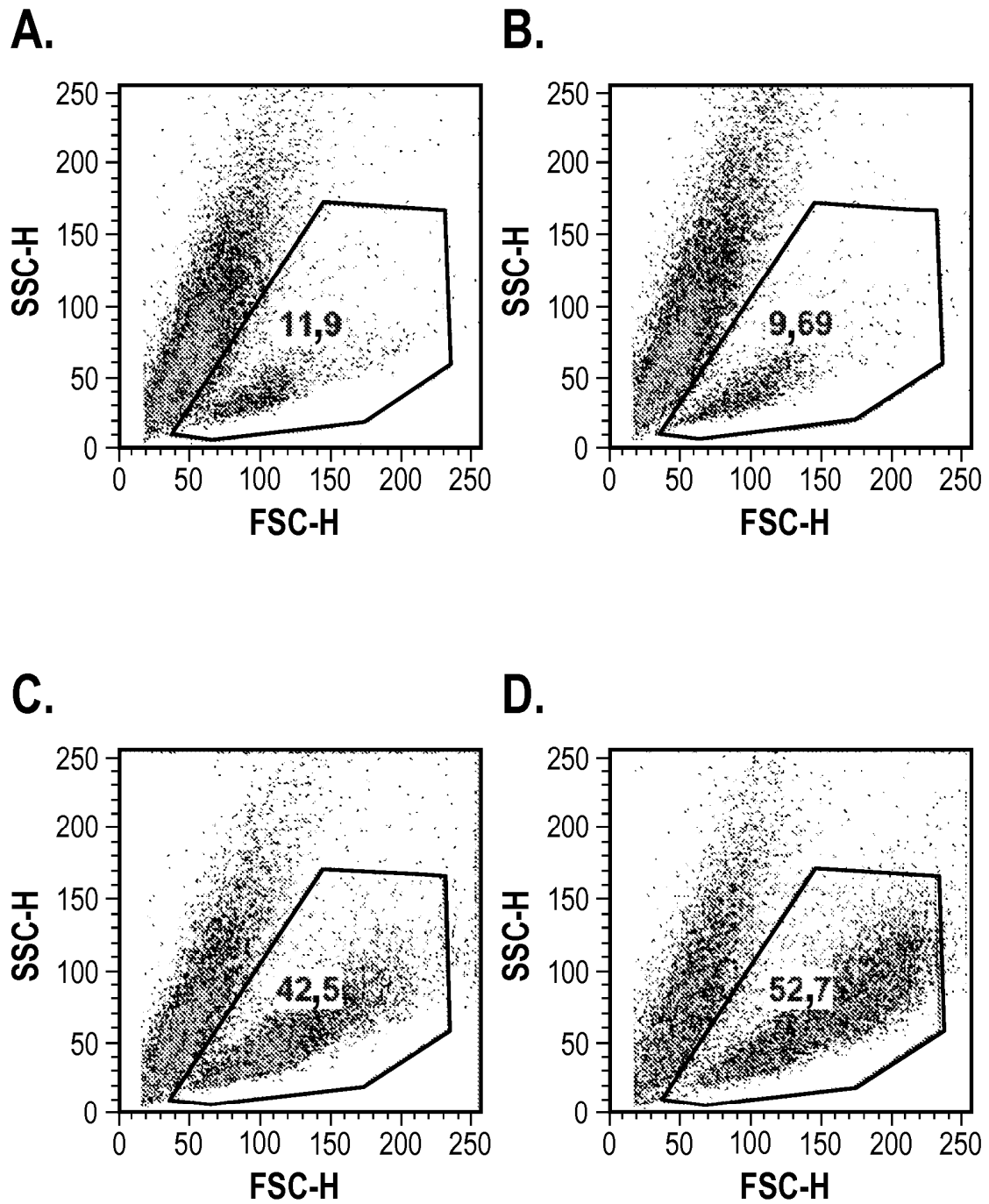


Fig. 23

Secuencia de aminoácidos de TAT-MYC (SEQ ID NO: 1)

MRKKRRQRRRMPLNVSFTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSELOPP
APSEDIWKKFELLPTPPLSPSRRLGLCSFSYVAVTPLSLRGDNDGGGGSFSTADQL
EMVTELLGGDMVNVQSFICDPDDDETFIKNIHQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQA
ARKDSGSPNPARGHSVCSTSSLYLQDLSAAASECIDPSVVFPYPLNDSSSPKSCAS
QDSSAFSPSSDILLSSTESSPQGSPEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVE
KRQAPGKRSESGSPSAGGHSKPPHSPLVLKRCHVSTHQHNYAAPPSTRKDYPAA
KRVKLDVSRVLRQISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFAL
RDQIPELENNEKAPKVVLKKATAYILSVQAEEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQ
LRKGELNSKLEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH

Los aminoácidos 2-10 son el dominio de transducción de la proteína Tat del VIH

Los aminoácidos 11-454 son c-Myc

Los aminoácidos 455-468 son el epítipo V5 de 14 aminoácidos

Los aminoácidos 472-477 son el marcador 6 Histidina

Secuencia de nucleótidos de TAT-MYC (SEQ ID NO: 2)

ATGAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAATGCCCCCTCAACGTTAGCTTC
ACCAACAGGAACTATGACCTCGACTACGACTCGGTGCAGCCGTATTTCTACT
GCGACGAGGAGGAGAACTTCTACCAGCAGCAGCAGCAGAGCGAGCTGCAGC
CCCCGGCGCCAGCGAGGATATCTGGAAGAAATTCGAGCTGCTGCCACCCC
GCCCCGTGTCCTAGCCGCGCTCCGGGCTCTGCTCGCCCTCCTACGTGCGG
TCACACCCCTTCTCCCTTCGGGGAGACAACGACGGCGGTGGCGGGAGCTTCTC
CACGGCCGACCAGCTGGAGATGGTGACCGAGCTGCTGGGAGGAGACATGGT
GAACCAGAGTTTCATCTGCGACCCGGACGACGAGACCTTCATCAAAAACATC
ATCATCCAGGACTGTATGTGGAGCGGCTTCTCGGCCGCGCCAAGCTCGTCTC
AGAGAAGCTGGCCTCCTACCAGGCTGCGCGCAAAGACAGCGGCAGCCGAA
CCCCGCCCCGCGGCCACAGCGTCTGCTCCACCTCCAGCTTGTACCTGCAGGATC
TGAGCGCCGCGCCTCAGAGTGCATCGACCCCTCGGTGGTCTTCCCCTACCCT
CTCAACGACAGCAGCTCGCCCAAGTCCTGCGCCTCGCAAGACTCCAGCGCCT
TCTCTCCGTCTCTCGGATTCTCTGCTCTCTCGACGGAGTCCTCCCCGAGGGC
AGCCCCGAGCCCCTGGTGCTCCATGAGGAGACACCGCCACCACCAGCAGCG
ACTCTGAGGAGGAACAAGAAGATGAGGAAGAAATCGATGTTGTCTCTGTGGA
AAAGAGGCAGGCTCCTGGCAAAAGGTCAGAGTCTGGATCACCTTCTGCTGGA
GGCCACAGCAAACCTCCTCACAGCCCACTGGTCCTCAAGAGGTGCCACGTCT
CCACACATCAGCACAACCTACGCAGCGCCTCCTCCACTCGGAAGGACTATCC
TGCTGCCAAGAGGGTCAAGTTGGACAGTGTGAGAGTCCTGAGACAGATCAGC
AACAACCGAAAATGCACCAGCCCCAGGTCCTCGGACACCGAGGAGAATGTC
AAGAGGCGAACACACAACGTCCTGGAGCGCCAGAGGAGGAACGAGCTAAAA
CGGAGCTTTTTTGGCCTGCGTGACCAGATCCCGGAGTTGGAAAACAATGAAA
AGGCCCCCAAGGTAGTTATCCTTAAAAAAGCCACAGCATACATCCTGTCCGT
CCAAGCAGAGGAGCAAAAGCTCATTTCTGAAGAGGACTTGTGCGGAAACGA

Fig. 24

Secuencia de aminoácidos de TAT-Bcl2Δ (SEQ ID NO: 3)

MRKKRRQRRRMAHAGRSGYDNREIVMKYIHYKLSQRATSGISIEAAGPALSPVP
PVVHLTLRQAGDDFSRRYRRDFAEMSSQLHLPFTARGCFATVVEELFRDGVNW
GRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLHTWIQDNGGWD
FVELYGPSMRPLDFSWLSLKTLLSLALVGACITLGAYLSHKKGELNSKLE GKPIP
NPILLGLDSTRTGHHHHHHH

Los aminoácidos 2-10 son el dominio de transducción de la proteína Tat del VIH

Los aminoácidos 11-212 son Bcl2Δ

Los aminoácidos 213-226 son el epítipo V5 de 14 aminoácidos

Los aminoácidos 230-235 son el marcador 6 Histidina

Secuencia de nucleótidos de TAT-Bcl2Δ (SEQ ID NO: 4)

atgaggaagaagcggagacagcgacgaagaatggcgacgctgggagaagtgggtacgataaccgggagatagtgatgaa
gtacatccattataagctgtcgcagagggctacgagtgaggatcgcagcagggcgccggggcctgcgctcagccgggtgceac
ctgtggtccacctgacctcgcagggcgccgacgacttcctccgcccctaccgccgacttcgccgagatgtccagccag
ctgcacctgacgcccttcacggcgccgggatgcttggcacgggtggaggagctctcagggacggggggaactggggga
ggatgtggtcctcttggatgggtgggtgcatgtgtggagagcgtaaccgggagatgtcggccctgggtggacaacatcgc
cctgtggatgactgagtacctgaaccggcactgcacacctggatccaggataacggaggctgggatgcttgggaactgta
cgccccagcatgggcctctgttgaattctcctggctgtctctgaagactctgctcagtttggccctgggtggagcttgcatac
cctgggtgctctatctgagccacaagaaggcgagctcaattcgaagctgaaggtaagcctatccctaaccctctcctcggctc
gattctacgggtaaccggctatcatcaccatcaccattga

Fig. 25

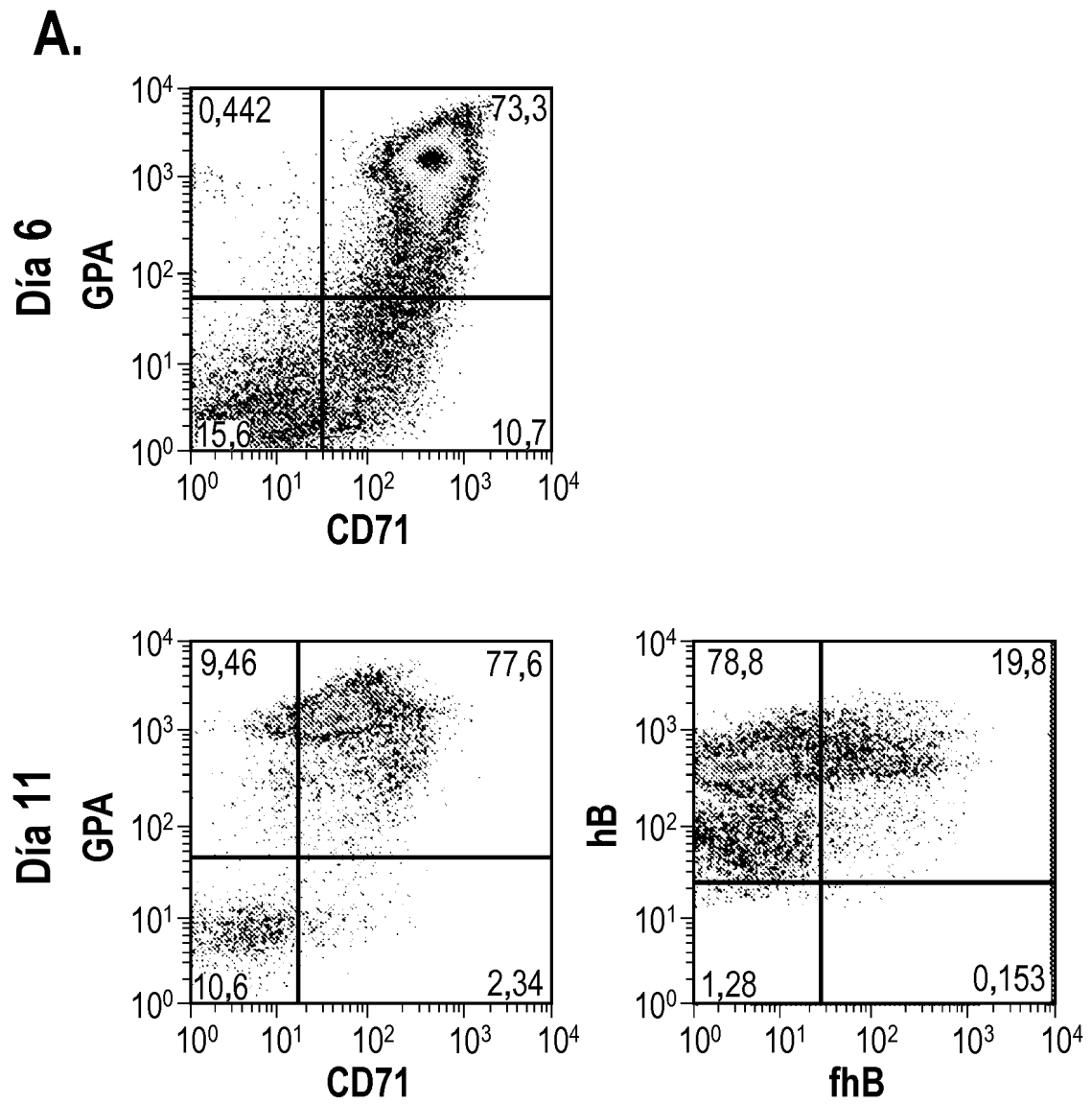


Fig. 26

B.

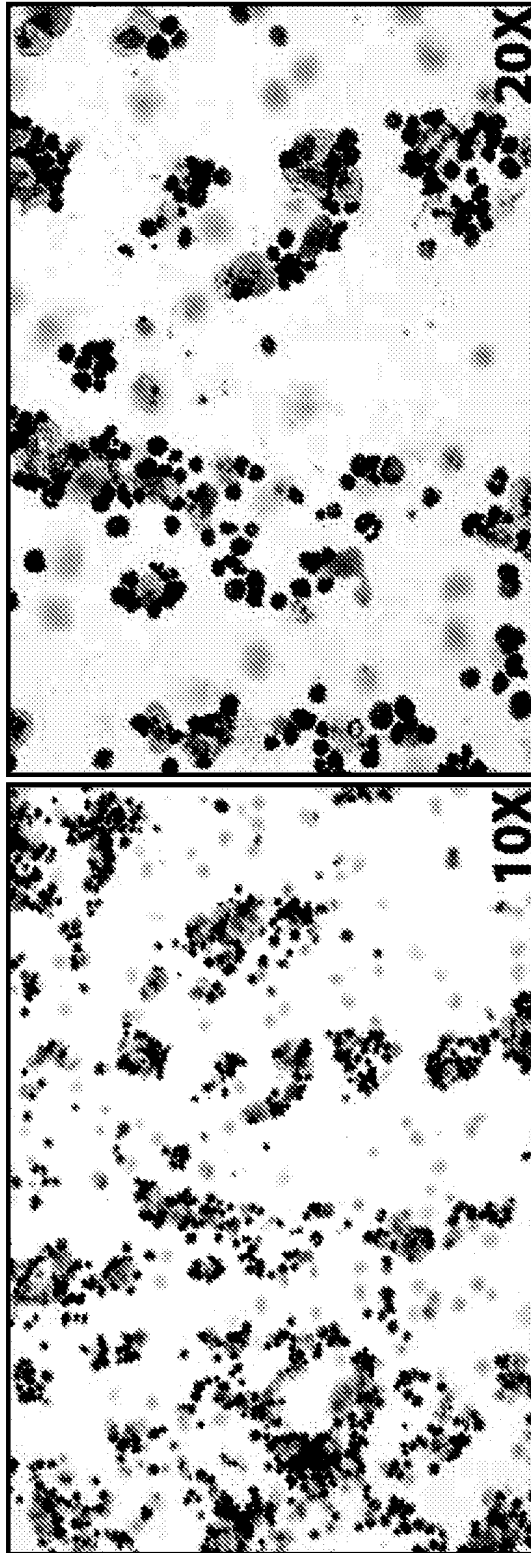


Fig. 26
(Continuación)