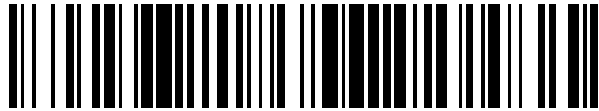


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 865 825**

51 Int. Cl.:

C12N 5/078 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2015 PCT/US2015/020614**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15153102**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2015 E 15712504 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2021 EP 3125927**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para inmunomodulación**

30 Prioridad:

01.04.2014 US 201461973763 P
 01.04.2014 US 201461973764 P
 09.05.2014 US 201461991319 P
 02.06.2014 US 201462006832 P
 02.06.2014 US 201462006828 P
 02.06.2014 US 201462006825 P
 02.06.2014 US 201462006829 P
 16.07.2014 US 201462025367 P
 02.10.2014 US 201462059100 P
 12.11.2014 WO PCT/US2014/065304

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.10.2021

73 Titular/es:

RUBIUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
399 Binney Street, Suite 300
Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

MATA-FINK, JORDI;
ROUND, JOHN;
AFEYAN, NOUBAR B. y
KAHVEJIAN, AVAK

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 865 825 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

Procedimientos y composiciones para inmunomodulación

Campo

El campo de la divulgación son las composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades y trastornos.

5 Antecedentes

La activación inmunitaria aberrante es un sello distintivo de muchas enfermedades y afecciones humanas. Las enfermedades autoinmunitarias surgen cuando el sistema inmunitario del cuerpo detecta incorrectamente un antígeno autólogo como ajeno y ataca los propios tejidos del cuerpo. Pueden surgir enfermedades inflamatorias y alergias cuando el sistema inmunitario del cuerpo se activa incorrectamente por antígenos habituales portados por los alimentos o ambientales. Los polipéptidos y proteínas usados para tratar una serie de enfermedades humanas con frecuencia se destruyen, se neutralizan o de otra manera se hacen ineficaces por las células inmunitarias que responden a ellos como si fueran antígenos extraños.

El tratamiento actual de enfermedades de activación inmunitaria inadecuada implica inmunosupresión con agentes químicos como corticosteroides o inhibidores de mediadores inflamatorios como antihistamínicos, anticuerpos o citocinas. Estos tratamientos generalizados se asocian con morbilidades importantes, tal como susceptibilidad a la infección, debido a que inhiben ampliamente el sistema inmunitario.

Para algunas alergias graves, se están realizando pruebas clínicas para inducir "tolerancia" a los alérgenos mediante la exposición a dosis que aumentan lentamente de la proteína causal a lo largo del tiempo. Hasta la fecha, estos tratamientos carecen de eficacia a largo plazo y están asociados con un riesgo de anafilaxia grave.

20 Existe la necesidad de nuevas terapias para tratar estas enfermedades.

El documento US 2003/133922 desvela un procedimiento para tratar la púrpura trombocitopénica inmunitaria en el que se administran plaquetas alogénicas por vía oral.

Sumario

La materia objeto de la presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

25 De forma más general, la presente divulgación, en determinados aspectos, se refiere a células hematopoyéticas desnucleadas aisladas que expresan un antígeno. Las células hematopoyéticas desnucleadas se denominarán en el presente documento "las CHD" (o en su forma singular: "CHD"). En algunas realizaciones, las células hematopoyéticas desnucleadas o CHD carecen de material nuclear. Por ejemplo, las CHD pueden ser células eritroides o células tromboideas. En algunas realizaciones, las CHD que carecen de material nuclear son glóbulos rojos, eritrocitos, reticulocitos o plaquetas. En algunas realizaciones, las células hematopoyéticas desnucleadas o CHD son células eritroides precursoras nucleadas o células tromboideas precursoras a las que se induce, p. ej., a perder su material nuclear o que se vuelven funcionalmente desnucleadas e incapaces de replicarse. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno es una célula en circulación, tal como un glóbulo rojo. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno se cultiva a partir de un precursor hematopoyético usando factores definidos. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno CHD es una célula tromboide, tal como una plaqueta. En algunas realizaciones, la célula tromboide se cultiva a partir de un precursor hematopoyético usando factores definidos. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno es una célula primaria aislada de un paciente, para uso autólogo o alogénico, que se pone en contacto con un antígeno.

40 Determinados aspectos de la divulgación se refieren a CHD que expresan antígenos exógenos que son capaces de inducir inmunotolerancia cuando se administran a un sujeto, p. ej., en forma de una composición farmacéutica que comprende las CHD que expresan antígenos exógenos. El antígeno exógeno expresado por las CHD se puede adaptar a una enfermedad, trastorno o afección específicos. Las CHD que expresan antígenos exógenos pueden comprender antígenos de múltiples formas, tales como, p. ej., presentación en superficie, expresión intracelular, carga intracelular o conjugación de superficie, del antígeno de interés. Las CHD que expresan antígenos exógenos pueden tratar enfermedades de activación inmunitaria aberrante de manera más eficaz y/o con menos efectos secundarios que los tratamientos existentes. Por ejemplo, las CHD que expresan antígenos exógenos pueden modular selectivamente el sistema inmunitario dejando al mismo tiempo la fisiología más general del sistema inmunitario sustancialmente intacta. En algunas realizaciones, las CHD que expresan antígenos exógenos pueden inducir la destrucción, desactivación y/o anergia de linfocitos T y B específicos de antígeno. Como alternativa o adicionalmente, las CHD que expresan antígenos exógenos pueden inducir la proliferación de linfocitos T reguladores específicos de antígenos.

Determinados aspectos de la divulgación se refieren a CHD que expresan antígenos exógenos que comprenden un antígeno exógeno que es reconocido por células inmunitarias en enfermedades autoinmunitarias, tales como, p. ej., esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, artritis reumatoide y nefritis membranosa.

Determinados aspectos de la divulgación se refieren a CHD que expresan antígenos exógenos que comprenden un

antígeno exógeno que es reconocido por células inmunitarias en enfermedades inflamatorias, tales como, p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca u otras enfermedades inflamatorias idiopáticas del intestino.

5 Determinados aspectos de la divulgación se refieren a CHD que expresan antígenos exógenos que comprenden un antígeno exógeno que es reconocido por células inmunitarias en enfermedades mediadas por discrepancias de antígenos leucocitarios humanos (HLA), tales como, p. ej., enfermedad del injerto contra el hospedador o rechazo de trasplante de órganos.

10 Determinados aspectos de la divulgación se refieren a CHD que expresan antígenos exógenos que comprenden un antígeno exógeno que es reconocido por células inmunitarias en enfermedades alérgicas, tales como, p. ej., asma, alergia al cacahuete, alergia al marisco, alergia al polen, alergia a las proteínas de la leche, alergia a las picaduras de insectos y alergia al látex.

15 Determinados aspectos de la divulgación se refieren a CHD que expresan antígenos exógenos que comprenden un antígeno exógeno que es una proteína terapéutica cuya eficacia o potencia es reducida o alterada por células inmunitarias, tales como, p. ej., factor de coagulación VIII en la hemofilia A, factor de coagulación IX en la hemofilia B, anticuerpos antifactor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias, glucocerebrosidasa en la enfermedad de Gaucher o asparaginasa en la leucemia linfoblástica aguda (LLA).

20 Determinados aspectos de la divulgación se refieren a CHD que expresan antígenos exógenos que comprenden un antígeno exógeno que comprende polipéptidos de longitud completa, truncamientos y fusiones quiméricas de polipéptidos que a) median en la regulación del complemento, b) que median en la unión e inmovilización de inmunocomplejos, c) anticuerpos autoinmunitarios o d) partículas patógenas. En algunas realizaciones, el antígeno exógeno comprende polipéptidos de longitud completa, truncamientos y fusiones quiméricas de polipéptidos que son enzimáticamente activos en la conversión de un sustrato de moléculas pequeñas en otro producto de moléculas pequeñas o de un sustrato polipeptídico en un segundo producto polipeptídico, incluyendo, p. ej., escisión del sustrato polipeptídico.

25 La divulgación, en determinados aspectos, también proporciona procedimientos de tratamiento de enfermedades usando las CHD que expresan antígenos exógenos y composiciones farmacéuticas de las mismas proporcionadas en el presente documento.

30 En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un procedimiento para inducir inmunotolerancia. El procedimiento comprende administrar a un sujeto humano que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios, una composición farmacéutica que comprende una célula hematopoyética desnucleada que expresa un antígeno exógeno, en el que la composición farmacéutica se administra en una cantidad eficaz para inducir inmunotolerancia en el sujeto al antígeno que media en la enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios.

35 En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1 y las enumeradas en la tabla F.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además administrar la composición farmacéutica al menos dos veces durante un periodo de tratamiento de modo que se trate la enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios o se reduzca uno de sus síntomas.

40 En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende además administrar la composición farmacéutica al menos dos veces durante un periodo de tratamiento de modo que se prevenga la enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios.

En otras realizaciones, el procedimiento comprende además administrar la composición farmacéutica un número suficiente de veces durante un periodo de tratamiento de modo que el porcentaje de células inmunitarias específicas de antígeno disminuya sustancialmente durante el periodo de tratamiento.

45 En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es un linfocito T. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es un linfocito B.

En algunas realizaciones, la disminución de la concentración de células inmunitarias específicas de antígeno se mide mediante citometría de flujo de una muestra biológica tomada del sujeto.

50 En algunas realizaciones, la muestra biológica es una biopsia de ganglio linfático, una muestra de bazo o sangre periférica.

En algunas realizaciones, la concentración de células inmunitarias específicas de antígeno disminuye en al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 99,99 % o más del 99,99 % durante parte o la totalidad del periodo de tratamiento.

- En otras realizaciones, la concentración de células inmunitarias específicas de antígeno disminuye en al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 99,99 % o más del 99,99 % en aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 minutos, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 horas, o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas después de la administración.
- 5
- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un periodo de tratamiento de modo que la concentración de células inmunitarias específicas de antígeno disminuya sustancialmente durante al menos aproximadamente una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más de seis meses.
- 10
- En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un periodo de tratamiento de modo que la concentración de células inmunitarias específicas de antígeno disminuya sustancialmente durante un periodo de tiempo al menos tan largo como el periodo de tratamiento.
- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un periodo de tratamiento de modo que la concentración de anticuerpos específicos de antígeno en circulación disminuya sustancialmente durante el periodo de tratamiento.
- 15
- En algunas realizaciones, la concentración de anticuerpos específicos de antígeno en circulación se mide mediante ELISA.
- En algunas realizaciones, la concentración de anticuerpo en circulación específico de antígeno disminuye en al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 99,99 % o más del 99,99 % durante parte o la totalidad del periodo de tratamiento.
- 20
- En algunas realizaciones, la concentración de anticuerpo específico de antígeno disminuye en al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 99,99 % o más del 99,99 % en aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 minutos, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 horas, o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas después de la administración.
- 25
- En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un periodo de tratamiento de modo que la concentración de anticuerpo en circulación específico de antígeno disminuya sustancialmente durante al menos aproximadamente una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más de seis meses.
- 30
- En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un periodo de tratamiento de modo que la concentración de anticuerpo en circulación específico de antígeno disminuya sustancialmente durante un periodo de tiempo al menos tan largo como el periodo de tratamiento.
- 35
- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un periodo de tratamiento de modo que el porcentaje de linfocitos T reguladores específicos de antígeno disminuya sustancialmente durante el periodo de tratamiento.
- En algunas realizaciones, la disminución de la concentración de células inmunitarias específicas de antígeno se mide mediante citometría de flujo de una muestra biológica tomada del sujeto.
- 40
- En algunas realizaciones, la muestra biológica es una biopsia de ganglio linfático, una muestra de bazo o sangre periférica.
- En determinadas realizaciones, la concentración de linfocitos T reguladores específicos de antígeno aumenta en al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 99,99 % o más del 99,99 % durante parte o la totalidad del periodo de tratamiento.
- 45
- En determinadas realizaciones, la concentración de linfocitos T reguladores específicos de antígeno aumenta en al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 99,99 % o más del 99,99 % en aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 minutos, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 horas, o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas después de la administración.
- 50
- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un periodo de tratamiento de modo que la concentración de linfocitos T reguladores específicos de antígeno disminuya sustancialmente durante al menos aproximadamente una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más de seis meses.

- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un periodo de tratamiento de modo que la concentración de linfocitos T reguladores específicos de antígeno disminuya sustancialmente durante un periodo de tiempo al menos tan largo como el periodo de tratamiento.
- 5 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un periodo de tratamiento de modo que se prevengan, disminuyan o retarden uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios.
- En algunas realizaciones, el periodo de tratamiento no es superior a un año, seis meses, tres meses, dos meses, un mes, dos semanas, una semana, tres días, dos días, un día.
- 10 En determinadas realizaciones, el intervalo de tiempo entre administraciones dentro del periodo de tratamiento no es más largo que el periodo en el que el número de células hematopoyéticas desnucleadas que expresan un antígeno exógeno se reduce a menos de aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % del número de células hematopoyéticas desnucleadas que expresan un antígeno exógeno presente en la composición farmacéutica administrada.
- 15 En algunas realizaciones, la frecuencia de administración es suficiente para reducir eficazmente la concentración de células inmunitarias específicas de antígeno por debajo de un nivel asociado con un síntoma de enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios.
- En determinadas realizaciones, la frecuencia de administración es suficiente para reducir eficazmente la concentración de anticuerpo en circulación específico de antígeno por debajo de un nivel asociado con un síntoma de enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios.
- 20 En determinadas realizaciones, la frecuencia de administración es suficiente para aumentar eficazmente la concentración de linfocitos T reguladores específicos de antígeno por encima de un nivel de umbral asociado con un síntoma de enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios.
- En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada es una célula eritroide, una célula tromboide o un precursor de las mismas. En algunas realizaciones, la célula eritroide es un eritrocito o un reticulocito. En algunas realizaciones, la célula tromboide es una plaqueta.
- 25 En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se aísla de un donante. En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se obtiene de forma autóloga del sujeto. En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se obtiene de forma alogénica. En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se obtiene de forma xenogénica.
- 30 En algunas realizaciones, la célula hematopoyética nucleada se obtiene de una célula precursora nucleada mediante un procedimiento basado en cultivo que induce la expulsión de su núcleo. En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se genera a partir de una célula precursora nucleada que se manipula química o físicamente para eliminar su núcleo.
- 35 En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se genera por irradiación o destrucción química del núcleo de una célula precursora nucleada. En algunas realizaciones, la destrucción química se lleva a cabo con citocalasina B. En algunas realizaciones, la irradiación se lleva a cabo con al menos 5 Gy, 7 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 25 Gy, 30 Gy, 40 Gy o al menos 50 Gy.
- En algunas realizaciones, el antígeno exógeno es un polipéptido codificado por un ácido nucleico exógeno.
- 40 En algunas realizaciones, el antígeno exógeno está asociado con la membrana celular de la célula hematopoyética desnucleada.
- En algunas realizaciones, el antígeno exógeno es una fusión o un polipéptido quimera.
- 45 En algunas realizaciones, la fusión o quimera comprende al menos uno de un dominio S, un dominio A o un dominio U, en el que el dominio S es un dominio de superficie en la célula hematopoyética desnucleada, en el que el dominio A es un anclaje en o sobre la membrana celular, en el que el dominio U se encuentra frente al lado intracelular, no expuesto, de la célula hematopoyética desnucleada y en el que el dominio S, el dominio A y/o el dominio U son de origen polipeptídico diferente.
- En algunas realizaciones, el dominio S y/o el dominio A comprenden al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, o al menos 500 aminoácidos. En algunas realizaciones, el dominio S y/o el dominio A comprenden al menos 500, 750 o al menos 1000 aminoácidos.
- 50 En algunas realizaciones, el antígeno exógeno se selecciona del grupo que consiste en la proteína básica de mielina, proteína proteolipídica, glucoproteína de oligodendrocitos de mielina, antígeno de células beta pancreáticas, insulina y los enumerados en la tabla F, tabla 6 y tabla 8.

ES 2 865 825 T3

En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada comprende al menos 10 copias, 100 copias, 1000 copias, 10 000 copias, 25 000 copias, 50 000 copias, 100 000 copias, 500 000 copias, 1 000 000 de copias o 2 000 000 de copias del antígeno exógeno.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un agente farmacéuticamente activo.

- 5 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de administrar un agente farmacéuticamente activo, en el que el agente farmacéuticamente activo se administra antes, después o al mismo tiempo que la composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa.

- 10 En algunas realizaciones, el agente farmacéuticamente activo se selecciona de un agente biológico, un agente de moléculas pequeñas o un agente de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de seleccionar para el tratamiento a un sujeto que padezca o esté en riesgo de padecer una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios seleccionados del grupo que consiste en: púrpura trombocitopénica trombótica, CAPS, APS, miastenia grave, síndrome de Goodpasture, nefritis membranosa, diabetes de tipo 1, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn o los enumerados en la tabla F y la tabla G.

- 20 En algunos aspectos, se desvela en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una célula hematopoyética desnucleada que expresa un antígeno exógeno, en el que la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica es capaz de inducir inmunotolerancia en un sujeto humano que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios administrada por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una población de células hematopoyéticas que expresan un antígeno exógeno. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos 1×10^3 células hematopoyéticas que expresan un antígeno exógeno.

- 30 En determinadas realizaciones de la composición farmacéutica, las células hematopoyéticas que expresan un antígeno exógeno se proporcionan en un volumen de aproximadamente 10 nl, 100 nl, 1 μ l, 10 μ l, 100 μ l, 1 ml, 10 ml, 20 ml o 50 ml. En otras realizaciones de la composición farmacéutica, las células hematopoyéticas que expresan un antígeno exógeno se proporcionan en un volumen de aproximadamente 1 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml o 500 ml.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, la composición está formulada para almacenamiento a largo plazo. En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, la composición está congelada. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un agente farmacéuticamente activo.

- 35 En determinadas realizaciones de la composición farmacéutica, el agente farmacéuticamente activo se selecciona de un agente biológico, un agente de moléculas pequeñas o un agente de ácido nucleico.

En algunos aspectos, se desvela en el presente documento una forma de dosificación que comprende las composiciones descritas en el presente documento formuladas como una suspensión líquida para inyección intravenosa.

- 40 En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un producto sanitario que comprende un recipiente que contiene las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento y un aplicador para inyección intravenosa de la composición farmacéutica al sujeto.

En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un equipo médico que comprende las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento y un producto sanitario para inyección intravenosa de la composición farmacéutica al sujeto.

- 45 En algunos aspectos, se desvelan en el presente documento células hematopoyéticas que expresan un antígeno exógeno de la composición farmacéutica administrada mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

En algunos aspectos, se desvela en el presente documento una población de células hematopoyéticas que expresan un antígeno exógeno como se desvela en el presente documento.

- 50 En algunas realizaciones, la población de células hematopoyéticas que expresan un antígeno exógeno se formula como un líquido.

En algunas realizaciones, se congela la población de células hematopoyéticas que expresan un antígeno exógeno.

En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un antígeno aislado expresado por la población de células hematopoyéticas descrita en el presente documento.

5 En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un ácido nucleico exógeno que codifica el antígeno exógeno descrito en el presente documento.

10 En algunos aspectos, se desvelada en el presente documento una célula hematopoyética desnucleada que comprende un antígeno exógeno que comprende al menos uno de un dominio S, un dominio A o un dominio U, en el que el dominio S es un dominio de superficie extracelular, el dominio A es un anclaje y el dominio U está localizado intracelularmente, y en el que la célula hematopoyética desnucleada es capaz de inducir inmunotolerancia cuando se administra a un sujeto.

En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el antígeno exógeno es una fusión o un polipéptido quimérico.

En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el dominio S, el dominio A y/o el dominio U son de origen polipeptídico diferente.

15 En determinadas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el dominio S y/o el dominio A comprenden al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, o al menos 500 aminoácidos.

En determinadas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el dominio S y/o el dominio A comprenden al menos 500, 750 o al menos 1000 aminoácidos.

20 En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el antígeno exógeno se selecciona del grupo que consiste en la proteína básica de mielina, proteína proteolipídica, glucoproteína de oligodendrocitos de mielina, antígeno de células beta pancreáticas, insulina y los enumerados en la tabla F, tabla 6 y tabla 8.

25 En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada comprende al menos 10 copias, 100 copias, 1000 copias, 10 000 copias, 25 000 copias, 50 000 copias, 100 000 copias, 500 000 copias, 1 000 000 de copias o 2 000 000 de copias del antígeno exógeno.

En determinadas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada es una célula eritroide, una célula tromboide o un precursor de las mismas. En algunas realizaciones, la célula eritroide es un eritrocito o un reticulocito. En algunas realizaciones, la célula tromboide es una plaqueta.

30 En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se aísla de un donante. En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se obtiene de forma autóloga del sujeto. En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se obtiene de forma alogénica. En algunas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se obtiene de forma xenogénica.

35 En determinadas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se obtiene de una célula precursora nucleada mediante un procedimiento basado en cultivo que induce la expulsión de su núcleo.

En determinadas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se genera a partir de una célula precursora nucleada que se manipula química o físicamente para eliminar su núcleo.

40 En determinadas realizaciones, la célula hematopoyética desnucleada se genera por irradiación o destrucción química del núcleo de una célula precursora nucleada. En algunas realizaciones, la destrucción química se lleva a cabo con citocalasina B. En algunas realizaciones, la irradiación se lleva a cabo con al menos 5 Gy, 7 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 25 Gy, 30 Gy, 40 Gy o al menos 50 Gy.

En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el antígeno exógeno es un polipéptido codificado por un ácido nucleico exógeno.

45 En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, la célula se obtiene de una fuente humana.

En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, la célula se obtiene de una fuente no humana, seleccionada del grupo que consiste en cerdo, chimpancé, macaco, un primate no humano y un mamífero no primate.

50 En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el antígeno polipeptídico se localiza intracelularmente. En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el antígeno polipeptídico se localiza extracelularmente en la superficie de la

- 5 célula. En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el antígeno polipeptídico se fusiona con una proteína celular endógena. En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el antígeno polipeptídico se fusiona con una región intracelular de una proteína transmembrana endógena. En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el antígeno polipeptídico se fusiona con una región extracelular de una proteína transmembrana endógena. En algunas realizaciones de la célula hematopoyética desnucleada desvelada en el presente documento, el antígeno polipeptídico se fusiona con una proteína anclada al glucosilfosfatidilinositol (GPI).
- 10 En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un lote de cultivo tisular que comprende las células hematopoyéticas desnucleadas descritas en el presente documento.
- En algunos aspectos, se desvela en el presente documento una población de las células hematopoyéticas desnucleadas descritas en el presente documento.
- 15 En algunos aspectos, se desvela en el presente documento una composición farmacéutica que comprende las poblaciones celulares descritas en el presente documento.
- 20 En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un procedimiento para inducir inmunotolerancia que comprende administrar a un sujeto que lo necesite las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento en una cantidad y/o frecuencia suficientes para inducir inmunotolerancia en el sujeto.
- En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un procedimiento para tratar una enfermedad de activación inmunitaria que comprende administrar a un sujeto que lo necesite las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento en una cantidad y/o frecuencia suficientes para tratar la enfermedad de activación inmunitaria.
- 25 En algunas realizaciones, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad mediada por autoanticuerpos, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad alérgica, una enfermedad mediada por discrepancias de HLA y una enfermedad tratable por una proteína terapéutica inmunogénica.
- En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un procedimiento para reducir o aliviar una activación inmunitaria en respuesta a un régimen de tratamiento con proteínas terapéuticas que comprende administrar a un sujeto que lo necesite las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento en una cantidad y/o frecuencia suficientes para reducir o aliviar sustancialmente la activación inmunitaria.
- 25 En algunas realizaciones, la proteína terapéutica se selecciona del grupo que consiste en las enumeradas en la tabla I, tabla J y tabla 7.
- 30 En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de célula eritroide endógena fusionada con uno o más antígenos polipeptídicos exógenos seleccionados del grupo que consiste en los enumerados en la tabla F, tabla G, tabla H, tabla I, tabla J, tabla 6, tabla 7 y tabla 8.
- 35 En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un ARN mensajero que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de célula eritroide endógena fusionada con uno o más antígenos polipeptídicos exógenos seleccionados del grupo que consiste en los enumerados en la tabla F, tabla G, tabla H, tabla I, tabla J, tabla 6, tabla 7 y tabla 8.
- 40 En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un procedimiento para inducir inmunotolerancia que comprende administrar a un sujeto humano que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección mediados por alérgenos, una composición farmacéutica que comprende una célula hematopoyética desnucleada que expresa un antígeno exógeno, en el que la composición farmacéutica se administra en una cantidad eficaz para inducir inmunotolerancia en el sujeto al alérgeno que media en la enfermedad, trastorno o afección.
- En determinadas realizaciones, el antígeno exógeno se selecciona del grupo que consiste en Ara h2, albúmina 2S, hialuronidasa y los enumerados en la tabla H.
- 45 En determinadas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección mediados por alérgenos se selecciona del grupo que consiste en alergia al cacahuete, alergia a las nueces arbóreas, alergia al veneno de insectos y los enumerados en la tabla H.
- 50 En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un procedimiento para inducir inmunotolerancia que comprende administrar a un sujeto humano que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección mediados por discrepancias de antígenos leucocitarios humanos (HLA), una composición farmacéutica que comprende una célula hematopoyética desnucleada que expresa un antígeno exógeno, en el que la composición farmacéutica se administra en una cantidad eficaz para inducir inmunotolerancia en el sujeto al HLA que media en la enfermedad, trastorno o afección.
- En algunos aspectos, se desvela en el presente documento un procedimiento para inducir inmunotolerancia que

comprende: administrar a un sujeto humano que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección que puede tratarse mediante una molécula terapéutica inmunogénica, una composición farmacéutica que comprende una célula hematopoyética desnucleada que expresa un antígeno exógeno, en el que la composición farmacéutica se administra en una cantidad eficaz para inducir inmunotolerancia en el sujeto a la molécula terapéutica inmunogénica usada para tratar la enfermedad, trastorno o afección.

En algunas realizaciones, la molécula terapéutica se selecciona del grupo que consiste en recombinante (factor VIII), Benefix (factor IX), Humira (anti-TNFa) y las enumeradas en la tabla I, tabla J y tabla 7.

Breve descripción de las figuras

La **fig. 1** es una colección de gráficos de citometría de flujo de glóbulos rojos en contacto con IgG marcada con fluorescencia encapsulada dentro de liposomas. Se muestran células que se incuban sin liposomas (izquierda), con una dosis baja de liposomas (centro) y una dosis alta de liposomas (izquierda). En los histogramas inferiores, se muestra el porcentaje de células que son fluorescentes.

La **fig. 2** es un gráfico de los niveles de expresión en superficie celular evaluados mediante citometría de flujo cuantitativa. El gráfico muestra diversos receptores de superficie celular: glucoforina A (triángulos continuos), cKIT (cuadrados discontinuos), receptor de transferrina (rombos punteados) y un transgén de superficie exógena (círculos abiertos) durante el transcurso de la diferenciación de células eritroides.

Las **fig. 3 A-C, F, I-M, O-Z y AA-AU** son una colección de gráficos de citometría de flujo y transferencias de Western que demuestran la expresión de una amplia gama de antígenos ilustrativos en la superficie, en el citoplasma, como fusiones y como proteínas intactas, en tres tipos celulares, células eritroides desnucleadas, células precursoras eritroides nucleadas y células eritroleucémicas.

Las **fig. 3 A-C, F, I-M y O-S** muestran la expresión exógena de proteínas de superficie y citoplasmáticas en células eritroides cultivadas desnucleadas.

Fig. 3A-Expresión de glucoforina A con un marcador epitópico de HA en el extremo C citoplasmático evaluada por la expresión de GFP cotraducida.

Fig. 3B-Expresión de glucoforina A con un marcador epitópico de HA en el extremo N entre la secuencia líder y el cuerpo del gen evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3C-Expresión del fragmento derivado del receptor 1 del complemento de ~70 kDa con un marcador epitópico de HA en el extremo N evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3F-Expresión del anticuerpo scFv como fusión N terminal con glucoforina A evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3I-Expresión del anticuerpo scFv fusionado con el extremo C del fragmento derivado de Kell de 71 aminoácidos evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3J-Expresión del anticuerpo scFv fusionado con el extremo C del fragmento derivado de Kell de 79 aminoácidos evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3K-Expresión de CD55 con marcador epitópico de HA en el extremo N extracelular después de la secuencia líder evaluada por tinción anti-HA.

Fig. 3L-Expresión de CD59 con marcador epitópico de HA en el extremo N extracelular después de las secuencias líder evaluadas mediante tinción anti-HA.

Fig. 3M-Expresión del anticuerpo scFv fusionado con el extremo N del fragmento derivado de CD55 de 37 aminoácidos, evaluada mediante transferencia de Western anti-HA.

Fig. 3O-Expresión citoplasmática de la adenosina desaminasa fusionada con el marcador de HA evaluada mediante transferencia de Western anti-HA. Tamaño esperado de aproximadamente 40 kDa.

Fig. 3P-Expresión citoplasmática de la fenilalanina hidroxilasa fusionada con el marcador de HA evaluada mediante transferencia de Western anti-HA. Tamaño esperado de aproximadamente 33 kDa.

Fig. 3Q-Expresión citoplasmática de la fenilalanina hidroxilasa fusionada con adenosina desaminasa y un marcador de HA evaluada mediante transferencia de Western anti-HA.

Fig. 3R-Expresión citoplasmática de la adenosina desaminasa fusionada con el extremo C intracelular de la glucoforina A evaluada mediante transferencia de Western anti-HA. Tamaño esperado de aproximadamente 55 kDa.

Fig. 3S-Expresión citoplasmática de la fenilalanina hidroxilasa fusionada con el extremo C intracelular de la glucoforina A evaluada mediante transferencia de Western anti-HA. Tamaño esperado de aproximadamente 50 kDa.

Las **Fig. 3 T-AO** muestran la expresión exógena de proteínas de superficie y citoplasmáticas en células precursoras eritroides cultivadas nucleadas.

Fig. 3T-Expresión de glucoforina A con un marcador epitópico de HA en el extremo C citoplasmático evaluada mediante la expresión de GFP cotraducida.

Fig. 3U-Expresión de glucoforina A con un marcador epitópico de HA en el extremo N entre la secuencia líder y el cuerpo del gen evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3V-Sobreexpresión del receptor 1 del complemento evaluada mediante tinción anti-CRI.

Fig. 3W-Expresión del fragmento derivado del receptor 1 del complemento de ~70 kDa con un marcador epitópico de HA en el extremo N evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3X-Expresión del fragmento derivado del receptor 1 del complemento de ~210 kDa con un marcador epitópico de HA en el extremo N evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3Y-Expresión del fragmento derivado del receptor 1 del complemento de ~230 kDa fusionado con el extremo N de glucoforina A con un marcador epitópico de HA en el extremo N evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3Z-Expresión del anticuerpo scFv como fusión N terminal con glucoforina A evaluada mediante tinción anti-HA.

5 **Fig. 3AA**-Expresión del anticuerpo scFv fusionado con el extremo C extracelular de Kell, evaluada mediante tinción anti-HA. Tamaño esperado de aproximadamente 108 kDa.

Fig. 3AB-Expresión del marcador HA fusionado con el extremo C extracelular de Kell, evaluada mediante tinción anti-HA.

10 **Fig. 3AC**-Expresión del fragmento derivado de Kell de 71 aminoácidos con marcador de HA en el extremo C (extracelular) evaluado mediante tinción anti-HA.

Fig. 3AD-Expresión del fragmento derivado de Kell de 79 aminoácidos con marcador de HA en el extremo C evaluado mediante tinción anti-HA.

Fig. 3AE-Expresión del anticuerpo scFv fusionado con el extremo C del fragmento derivado de Kell de 71 aminoácidos evaluada mediante tinción anti-HA.

15 **Fig. 3AF**-Expresión del anticuerpo scFv fusionado con el extremo C del fragmento derivado de Kell de 79 aminoácidos evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3AG-Expresión de CD55 con marcador epitópico de HA en el extremo N extracelular después de la secuencia líder evaluada mediante tinción anti-HA.

20 **Fig. 3AH**-Expresión de CD59 con marcador epitópico de HA en el extremo N extracelular después de las secuencias líder evaluadas mediante tinción anti-HA.

Fig. 3AI-Expresión del anticuerpo scFv fusionado con el extremo N del fragmento derivado de CD55 de 37 aminoácidos, evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3AJ-Expresión del anticuerpo scFv fusionado con el extremo N de CD59 evaluada mediante tinción anti-HA.

25 **Fig. 3AK**-Expresión citoplasmática de la adenosina desaminasa fusionada con el marcador de HA evaluada mediante transferencia de Western anti-HA. Tamaño esperado de aproximadamente 40 kDa.

Fig. 3AL-Expresión citoplasmática de la fenilalanina hidroxilasa fusionada con el marcador de HA evaluada mediante transferencia de Western anti-HA. Tamaño esperado de aproximadamente 33 kDa.

Fig. 3AM-Expresión citoplasmática de fenilalanina hidroxilasa fusionada con adenosina desaminasa y un marcador de HA evaluada mediante citometría de flujo para determinar la fluorescencia de GFP cotraducida.

30 **Fig. 3AN**-Expresión citoplasmática de la adenosina desaminasa fusionada con el extremo C intracelular de la glucoforina A evaluada mediante transferencia de Western anti-HA. Tamaño esperado de aproximadamente 55 kDa.

35 **Fig. 3AO**-Expresión citoplasmática de la fenilalanina hidroxilasa fusionada con el extremo C intracelular de la glucoforina A evaluada mediante transferencia de Western anti-HA. Tamaño esperado de aproximadamente 50 kDa.

La **fig. 3 AP-AU** muestra la expresión exógena de proteínas de superficie y citoplasmáticas en células de eritroleucemia K562.

Fig. 3AP-Sobreexpresión del receptor 1 del complemento evaluada mediante tinción anti-CRI.

40 **Fig. 3AQ**-Expresión del anticuerpo scFv como fusión N terminal con glucoforina A evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3AR-Expresión del anticuerpo scFv fusionado con el extremo N del fragmento derivado de CD55 de 37 aminoácidos, evaluada mediante tinción anti-HA.

Fig. 3AS-Expresión del anticuerpo scFv fusionado con el extremo N de CD59 evaluada mediante tinción anti-HA.

45 **Fig. 3AT**-Expresión citoplasmática de la adenosina desaminasa fusionada con el marcador de HA evaluada mediante transferencia de Western anti-HA. Tamaño esperado de aproximadamente 40 kDa.

Fig. 3AU-Expresión citoplasmática de la fenilalanina hidroxilasa fusionada con el marcador de HA evaluada mediante transferencia de Western anti-HA. Tamaño esperado de aproximadamente 33 kDa.

50 La **fig. 4** es una colección de histogramas de citometría de flujo que miden la fluorescencia en plaquetas primarias que se han transfectado con ARNm que codifica una proteína fluorescente (GFP). **(A)** Plaquetas sin transfectar. **(B)** Plaquetas transfectadas con 3 ug de ARNm de GFP. **(4C)** Plaquetas transfectadas con 6,8 ug de ARNm de GFP.

55 La **fig. 5** muestra la expresión de proteínas y actividad enzimática de células eritroides transgénicas en cultivo. **(A)** es una transferencia de Western de adenosina desaminasa expresada de forma exógena detectada con un anticuerpo anti-HA durante el transcurso de la diferenciación, desde células precursoras nucleadas ("Dif I D5") hasta células eritroides desnucleadas ("Dif III D8"). **(B)** es un gráfico de barras de inosina producido a partir de adenosina por células 293T que expresan adenosina desaminasa intactas. **(C)** es una transferencia de Western de la fenilalanina hidroxilasa expresada de forma exógena detectada con un anticuerpo anti-HA en diversos puntos temporales durante el transcurso de la diferenciación, desde células precursoras nucleadas ("Dif I D5") hasta células eritroides desnucleadas ("Dif III D8"). **(D)** es un gráfico de barras de tirosina producido a partir de fenilalanina por lisados de células eritroides desnucleadas que expresan fenilalanina hidroxilasa cultivadas.

60 La **fig. 6** muestra la captura y transferencia de inmunocomplejos a macrófagos por células eritroides cultivadas que sobreexpresan el receptor 1 del complemento (CR1). **(A)** es un gráfico de citometría de flujo que muestra la captura de inmunocomplejos fluorescentes (histograma blanco) e inmunocomplejos deficientes en complemento (histograma sombreado) por células eritroides cultivadas que sobreexpresan CR1. **(B)** es un diagrama de barras de datos de citometría de flujo que evalúa la captación de inmunocomplejos fluorescentes (barras rayadas), inmunocomplejos deficientes en complemento (barras grises) o ningún inmunocomplejo (barras negras) por

macrófagos (conjunto izquierdo) o macrófagos incubados con células eritroides cultivadas que sobreexpresan CR1 (conjunto derecho).

La **fig. 7** muestra la actividad de un anticuerpo scFv que se une al antígeno de superficie de la hepatitis B (scFv) en la superficie de una célula eritroide cultivada. **(A)** es un histograma de citometría de flujo que muestra la unión del antígeno 450 nM (histograma blanco) o la ausencia de antígeno (histograma gris). **(B)** es una valoración de la señal de unión evaluada por citometría de flujo para un intervalo de concentraciones de antígeno. **(C-D)** son gráficos de citometría de flujo de células sanguíneas de ratones a los que se les había inyectado antígeno fluorescente y células eritroides cultivadas que **(C)** no expresan o **(D)** expresan scFv. El eje de ordenadas mide la fluorescencia del antígeno. El eje de abscisas mide la fluorescencia de las células cultivadas.

La **fig. 8** muestra el aclaramiento específico de anticuerpos circulantes mediado por CHD que expresan antígenos exógenos *in vivo*. **(A)** es un conjunto de gráficos de citometría de flujo que muestran ausencia de unión (arriba) y unión (abajo) del anticuerpo anti-HA de ratón marcado con Dylight650 circulante a células eritroides humanas cultivadas marcadas con CFSE aisladas de un ratón receptor que no expresan (arriba) o expresan (abajo) el marcador epitópico de HA en su superficie. El eje de abscisas mide la fluorescencia de CFSE. El eje de ordenadas mide la fluorescencia del anticuerpo anti-HA Dylight650. **(B)** son datos de un ELISA de sustrato de marcador epitópico de HA que compara los niveles de anticuerpos anti-HA a lo largo del tiempo en plasma recogido de ratones a los que se ha inyectado anticuerpo anti-HA (círculos vacíos, línea continua), anticuerpo anti-HA seguido de células eritroides humanas cultivadas que no expresan el marcador epitópico de HA (línea discontinua) o anticuerpo anti-HA seguido de células eritroides humanas cultivadas que expresan el marcador epitópico de HA (línea punteada). **(C)** es un conjunto de gráficos de citometría de flujo que muestran ausencia de unión (arriba) y unión (abajo) del anticuerpo antibiotina de ratón marcado con Dylight650 a eritrocitos humanos primarios marcados con CFSE que no están (arriba) o están (abajo) conjugados con biotina en su superficie. El eje de abscisas mide la fluorescencia de CFSE. El eje de ordenadas mide la fluorescencia del anticuerpo antibiotina Dylight650. **(D)** son datos de un ELISA de sustrato de biotina que compara los niveles de anticuerpos antibiotina a lo largo del tiempo en plasma recogido de ratones a los que se ha inyectado anticuerpo antibiotina (círculos vacíos, línea continua), anticuerpo antibiotina seguido de células eritroides humanas cultivadas que no están conjugadas con biotina (línea discontinua) o anticuerpo antibiotina seguido de células eritroides humanas cultivadas que están conjugadas con biotina (línea punteada).

La **fig. 9** muestra la tasa de aclaramiento de células eritroides humanas cultivadas en un ratón. **(A)** es un gráfico de puntos de citometría de flujo representativo de sangre extraída, teñido para glucoforina A humana (eje de ordenadas) y CFSE (eje de abscisas), en el que las células cultivadas humanas son doblemente positivas. **(B)** es un gráfico de la tasa de aclaramiento a lo largo del tiempo como porcentaje de células doblemente positivas restantes después de inyectar a los ratones NSG glóbulos rojos humanos (círculos continuos), células eritroides desnucleadas cultivadas (rombos discontinuos), células eritroides desnucleadas cultivadas que expresan una proteína exógena intracelular (cuadrados punteados) y células eritroides desnucleadas cultivadas que expresan una proteína exógena de superficie (triángulos vacíos).

La **fig. 10** es una evaluación de los acontecimientos adversos después de la inyección de células eritroides humanas cultivadas en un ratón. **(AB)** muestran niveles de **(A)** fibrinopéptido A y **(B)** fibrinopéptido B evaluados por ELISA en plasma recogido de ratones 20 minutos (negro), 6 horas (gris) y 48 horas (blanco) después de la inyección con (1) glóbulos rojos humanos, (2) células eritroides humanas cultivadas, (3) células eritroides humanas cultivadas que expresan una proteína citoplasmática exógena, (4) células eritroides humanas cultivadas que expresan un transgén de superficie exógeno o (5) proteína recombinante. **(C-D)** muestran imágenes microscópicas de secciones de bazo teñidas histológicamente para ratones a los que se han inyectado **(C)** células eritroides humanas cultivadas y **(D)** proteína recombinante.

La **fig. 11** rastrea la expresión de proteína exógena en células eritroides cultivadas en circulación. **(A)** son datos de citometría de flujo de sangre extraída de un ratón al que se le inyectaron células eritroides humanas cultivadas que expresan una proteína de superficie exógena, que muestra el porcentaje de células eritroides humanas cultivadas que son positivas para HA a lo largo del tiempo. **(B)** es una transferencia de Western de sangre extraída de dos ratones, en la que a un ratón se le inyectaron células eritroides humanas cultivadas que expresan una proteína citoplasmática exógena y en la que al otro ratón se le inyectó la proteína exógena purificada producida de forma recombinante en ausencia de células, que muestra el nivel de proteína que contiene HA en la sangre a lo largo del tiempo.

La **fig. 12** es una evaluación de la expansión y diferenciación de células eritroides humanas cultivadas. **(A)** es un gráfico de velocidades de expansión para distintos cultivos de células eritroides diferenciadas *in vitro* que contienen transgenes (línea discontinua y línea punteada) y células que no contienen un transgén (línea continua). **(B)** es un gráfico de citometría de flujo de los marcadores de superficie celular GPA y CKIT para distintos cultivos de células eritroides humanas cultivadas que no contienen (izquierda) o contienen (derecha) un transgén. **(C)** es un gráfico de citometría de flujo de células eritroides humanas cultivadas que no contienen (izquierda) o contienen (derecha) un transgén, en el que las células se tiñen con tinción de ADN DRAQ5 (eje de ordenadas) y antiglucoforina A (eje de abscisas), que identifica distintas poblaciones de (1) células desnucleadas, (2) células nucleadas y (3) núcleos.

La **fig. 13A** es un esquema de tres formas en las que un antígeno puede localizarse en una CHD que expresa antígeno exógeno. **B** es un esquema de tres formas en las que un antígeno localizado en o sobre una CHD que expresa un antígeno exógeno puede actuar sobre una diana en circulación. **C** es un esquema de una fusión autocatalítica de un anclaje polipeptídico endógeno con un antígeno utilizando un mecanismo SpyTag-SpyCatcher.

Descripción detallada

La divulgación, en determinados aspectos, proporciona células aisladas que se obtienen por ingeniería genética o se modifican para contener antígenos exógenos de interés. En determinados aspectos, las CHD aisladas de la divulgación comprenden uno o más antígenos que comprenden o consisten en polipéptidos. En algunas realizaciones, el antígeno es una proteína de longitud completa. En algunas realizaciones, el antígeno está comprendido por uno o más polipéptidos contenidos dentro de la proteína de longitud completa, de cualquier longitud superior a aproximadamente 7 aminoácidos. Los polipéptidos que comprenden el antígeno pueden comprender uno o más epítomos inmunológicos que pueden ser epítomos conformacionales o pueden ser epítomos lineales. El antígeno puede estar comprendido por uno o más polipéptidos de una o más proteínas diferentes. En determinados aspectos, las CHD de la divulgación comprenden uno o más antígenos que comprenden o consisten en hidratos de carbono. En determinados aspectos, las CHD de la divulgación comprenden uno o más antígenos que comprenden o consisten en lípidos. En determinados aspectos, las CHD de la divulgación comprenden uno o más antígenos que comprenden o consisten en uno o más polipéptidos, lípidos y/o hidratos de carbono y cualquier combinación de los mismos. Las células pueden ser células circulantes, tales como CHD. Las CHD se pueden cultivar a partir de precursores hematopoyéticos usando factores definidos tales como, p. ej., factor de células madre, citocinas tales como IL-3 e IL-6, insulina, transferrina, eritropoyetina, hidrocortisona y estrógenos.

Los aspectos de la divulgación se refieren a procedimientos de cultivo de CHD para que comprendan antígenos exógenos de interés. Los antígenos exógenos de interés pueden introducirse mediante varios procedimientos, tales como, p. ej., expresión intracelular, expresión en superficie celular, fusión con una proteína endógena, conjugación por medios químicos o enzimáticos con una proteína de la superficie celular o carga física en el espacio intracelular. Las células que comprenden antígenos de la divulgación pueden usarse como agentes terapéuticos.

Algunos aspectos de la divulgación se refieren al uso de estas células que comprenden antígenos en el tratamiento de enfermedades de activación inmunitaria mediante la inducción de tolerancia periférica. En algunos aspectos, la inducción de tolerancia periférica significa la supresión o inactivación de células inmunitarias específicas de antígeno, tales como, p. ej., linfocitos T CD8 (células T CD8), linfocitos T CD4 (células T CD4), linfocitos T reguladores CD4 (Treg) o linfocitos B (células B). Las enfermedades de activación inmunitaria incluyen enfermedades autoinmunitarias, tales como, p. ej., esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, artritis reumatoide y nefritis membranosa. Las enfermedades de activación inmunitaria también incluyen enfermedades inflamatorias, tales como, p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca u otras enfermedades inflamatorias idiopáticas del intestino. Las enfermedades de activación inmunitaria también incluyen enfermedades alérgicas, tales como, p. ej., asma, alergia al cacahuete, alergia al marisco, alergia al polen, alergia a las proteínas de la leche, alergia a las picaduras de insectos y alergia al látex. Las enfermedades de activación inmunitaria también incluyen la activación inmunitaria en respuesta a una proteína terapéutica, administrada para tratar una afección primaria, que disminuye la eficacia de la proteína terapéutica, tal como, p. ej., factor de coagulación VIII en la hemofilia A, factor de coagulación IX en la hemofilia B, anticuerpos antifactor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias, glucocerebrosidasa en la enfermedad de Gaucher o asparaginasa en la leucemia linfoblástica aguda (LLA).

Biología de la inmunotolerancia

El cuerpo ha desarrollado mecanismos sofisticados para la prevención de la activación inmunitaria aberrante y las enfermedades autoinmunitarias, denominados colectivamente inmunotolerancia. La tolerancia central se refiere a la supresión específica de antígeno de linfocitos T y linfocitos B autorreactivos durante el desarrollo en los órganos linfoides primarios, p. ej., el timo y la médula ósea. La tolerancia periférica se refiere a la supresión o inactivación de linfocitos T y B maduros fuera de los órganos linfoides primarios. La tolerancia periférica incluye la supresión de linfocitos autorreactivos por linfocitos T reguladores (Tregs) o la inducción de anergia o falta de respuesta en linfocitos efectores específicos de antígeno por exposición a dosis bajas continuas de antígeno en ausencia de señales de "peligro" coestimulantes. Tanto la activación de Treg como la anergia de linfocitos pueden ser inducidas por la secreción de factores inhibidores tales como, por ejemplo, TGF-beta, IL-10 e IL-4.

La activación inmunitaria en respuesta al antígeno requiere con frecuencia una señal secundaria de "peligro", tal como un ligando de receptor de tipo toll, con frecuencia procedente de patógenos microbianos o víricos (Matzinger, *Annu Rev Immuno* 1994). Dichas señales de peligro incluyen ARN bicatenario, ADN monocatenario, lipopolisacárido, lipoproteínas bacterianas, flagelina, cimosano y otros. Las células presentadoras de antígenos que reciben tanto antígeno como señal de peligro presentan moléculas coestimulantes en su superficie, como CD80 y CD86, además de los péptidos antigénicos. Se activan linfocitos T que reconocen tanto el péptido antigénico como las moléculas coestimulantes. Los que reciben solo la señal de péptido antigénico se vuelven anérgicos.

Se han desarrollado estrategias terapéuticas que aprovechan la presentación de antígenos en ausencia de señales de peligro para inducir inmunotolerancia para el tratamiento experimental de muchas alergias alimentarias. Los estudios toman la forma de exposición prolongada a dosis crecientes de alérgeno con la intención de inducir tolerancia. Trece estudios desde 2007 han probado diversos alérgenos alimentarios habituales como el cacahuete, la leche y el huevo, en este formato. 50-100 % de los pacientes se sensibilizan, es decir, son capaces de sobrevivir a una exposición alimentaria sin anafilaxia. Sin embargo, la tolerancia a largo plazo tiene menos éxito, con solo el 25-50 % de los pacientes capaces de tolerar el antígeno después de un mes sin terapia. Véase, p. ej., Burks y col., *New England Journal of Medicine* 2012.

- Se cree que la alergia está mediada por IgE, con activación de mastocitos y basófilos. La administración oral del alérgeno en dosis bajas, tal como alimentación continua, induce Treg a través de presentación por células dendríticas CD11c⁺ de antígeno y secreción de TGF-beta, IL-10 e IL-4. La administración oral a dosis altas induce la anergia y supresión de linfocitos T específicos de antígeno a través de células dendríticas plasmacitoides. En estudios de seres humanos, la administración oral de alérgeno da lugar a una disminución de IgE, mastocitos y basófilos, un aumento de IgG4, TGF-beta, IL-10 y un repunte temporal de Treg al inicio de la terapia. Véase, p. ej., Herzog, *Adv Drug Deliv Rev* 2013.
- Sin desear quedar limitados a ningún mecanismo en particular, se cree que la inmunotolerancia periférica puede ser inducida por autoantígenos de células en apoptosis (Griffith y Ferguson, *Immunity* 2011; Green y col., *Nat Rev Immunol* 2009). Aunque los mecanismos exactos no se comprenden completamente desde una perspectiva molecular, las autoproteínas tales como HSP90 y otros patrones moleculares asociados al daño facilitan la captación por las células dendríticas. Los receptores de células dendríticas como CD205 reconocen estas señales, presentan de forma cruzada el antígeno e inducen citocinas tolerogénicas y suprimen la expresión de proteínas coestimulantes (Bonifaz, *J Exp Med* 2002).
- Se están investigando estrategias terapéuticas que aprovechan el potencial tolerogénico de las células en apoptosis para inducir inmunotolerancia periférica. Estas estrategias normalmente implican el acoplamiento químico de antígenos de interés en la superficie de las células. En estudios en ratones, ratas y cobayas, diversos antígenos proteicos se unen químicamente a la superficie de esplenocitos y leucocitos. Véase, p. ej., Molinero y col., *J Exp Med* 1979; Braley-Mullen y col., *Cell Immunol* 1980; Luo y col., *PNAS* 2008; Smarr y col., *J Immunol* 2011.
- En un estudio clínico reciente de fase I en seres humanos, un cóctel de antígenos peptídicos asociados con la esclerosis múltiple se acopló químicamente con células mononucleares de sangre periférica autólogas y se reinfundió en los pacientes (Lutterotti y Martin, *Sci Trans Med* 2013). Las células se toleraron bien y hubo pruebas de una disminución de las respuestas de linfocitos T específicos de antígeno.
- Las CHD son una fuente importante de células moribundas. Una gran cantidad de eritrocitos se elimina después de la muerte celular programada similar a la apoptosis, denominada eriptosis, cada día (más del 1 % al día en seres humanos, aproximadamente 1×10^{11} células). Aunque los desencadenantes exactos del aclaramiento de los eritrocitos siguen sin estar claros, los eritrocitos eriptóticos se caracterizan por asimetría de la fosfatidilserina, heterogeneidad de la membrana y unión de anexina-V, de forma análoga a las células apoptóticas nucleadas.
- Las CHD también son persistentes en el cuerpo. Los eritrocitos circulan durante hasta 120 días en el ser humano adulto. Así pues, las CHD que comprenden un antígeno de interés pueden permitir la exposición persistente del antígeno al huésped. Como se ha descrito anteriormente, aunque los mecanismos moleculares exactos no se comprenden completamente, se cree que la exposición persistente al antígeno puede inducir tolerancia periférica a través de la presentación del antígeno en ausencia de señales coestimulantes, lo que conduce a la expansión de linfocitos T reguladores, la supresión y anergia de linfocitos T y B efectores y la secreción de citocinas antiinflamatorias y pro-tolerógenas.
- También se ha explorado experimentalmente la inducción de tolerancia periférica aprovechando los eritrocitos. En trabajo preliminar, se ha mostrado que el antígeno modelo ovoalbúmina induce la supresión de linfocitos T CD8 específicos de antígeno y la inducción de Treg específicos de antígeno cuando se une de forma no covalente a eritrocitos (Kontos y col., *PNAS* 2013) o se carga de forma osmótica en eritrocitos (Cremel y Godfrin, *Int J Pharm* 2013).
- Las CHD cultivadas de la divulgación que comprenden un antígeno exógeno de interés pueden tener ventajas claras sobre el antígeno que está unido de forma no covalente a los eritrocitos, p. ej., a través de un dominio de unión a polipéptido. Una ventaja puede ser que la biodistribución de una CHD que comprende un antígeno exógeno de interés está más definida que la de una composición polipeptídica de antígeno con dominio de direccionamiento. La CHD que comprende un antígeno exógeno de interés estará confinada a la vasculatura y a lugares donde normalmente residen eritrocitos, p. ej., el bazo. Las CHD que comprenden un antígeno exógeno de interés no se filtrarán fuera del riñón ni saldrán al tejido periférico, problemas que pueden surgir cuando se administran composiciones de antígeno polipeptídico. La dosis de antígeno exógeno por CHD puede ser significativamente mayor si se cultivan las células que comprenden un antígeno exógeno de interés que si se inyecta directamente en el torrente sanguíneo un antígeno polipeptídico y se distribuye en aproximadamente 10 billones de eritrocitos en el torrente sanguíneo. En algunos casos, puede ser preferible tener el antígeno exógeno de interés confinado en el compartimento intracelular de la CHD. Por ejemplo, si el antígeno es inmunogénico, la localización intracelular puede ser ventajosa porque puede enmascarar el antígeno inmunogénico frente al sistema inmunitario y, de este modo, prevenir o reducir la activación inmunitaria. Esta configuración no es posible con una composición de antígeno polipeptídico.
- Las CHD cultivadas que expresan un antígeno exógeno de interés pueden tener ventajas claras sobre el antígeno que se carga de forma osmótica en las CHD. Las CHD cultivadas que comprenden un antígeno exógeno de interés tendrán membranas celulares y citoesqueleto sustancialmente inalterados, en contraste con el producto de un procedimiento de carga osmótica, en el que grandes poros rompen la integridad de la membrana celular y el citoesqueleto. La morfología y las características biofísicas de las CHD son determinantes cruciales de la biodistribución, circulación e

interacción de la célula con la vasculatura y las células inmunitarias (p. ej., Pries y col., *Cardiovasc. Res.* 1996) y, por lo tanto, mantener la integridad celular puede ser crucial para conservar la eficacia. Un antígeno exógeno que esté unido físicamente a una CHD cultivada, por ejemplo, mediante fusión directa con una proteína citoplasmática endógena o fusión con una proteína transmembrana endógena, no se filtrará fuera de la célula ni quedará expuesto al sistema inmunitario hasta que se consuma la CHD. El problema de la fuga puede surgir si la célula se pone en contacto con el antígeno usando un procedimiento de carga osmótica en el que se puede dañar la membrana celular.

Las CHD cultivadas que expresan un antígeno de interés se pueden administrar directamente a un sujeto que necesite el antígeno. No es necesaria una separación y purificación del antígeno durante la fabricación del producto. Esto contrasta con un producto de carga osmótica, en el que el antígeno debe sintetizarse y purificarse por separado y después combinarse con la célula, y puede proporcionar una ventaja significativa de coste y tiempo en la fabricación del producto. Las CHD cultivadas que expresan un antígeno de interés pueden ampliarse mediante propagación en cultivo. Se pueden producir lotes grandes, de tamaño industrial, de células para generar una composición farmacéutica sustancialmente uniforme de CHD para un antígeno dado que se puede usar para tratar universalmente a muchos sujetos. Por el contrario, la carga osmótica generalmente está limitada a una escala de un donante a un sujeto.

Adquisición de células

Se pueden generar células hematopoyéticas desnucleadas que expresan antígenos exógenos de la divulgación pueden generarse mediante cualquier procedimiento descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, las etapas comprenden poner en contacto células aisladas opcionalmente cultivadas procedentes de células madre hematopoyéticas con un antígeno. Las células madre hematopoyéticas dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas que se encuentran en la sangre de los mamíferos, incluyendo los linajes mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linfoides (linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK). Las células madre hematopoyéticas se pueden aislar de la médula ósea de huesos de adultos, incluyendo, por ejemplo, fémur, cadera, costilla o huesos del esternón. Las células se pueden obtener directamente de la cadera, por ejemplo, mediante la extracción de células de la médula ósea usando aspiración con una aguja y jeringa. Como alternativa, las células madre hematopoyéticas se pueden aislar de la sangre periférica normal después del pretratamiento con citocinas tales como, por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). G-CSF moviliza la liberación de células del compartimento de la médula ósea hacia la circulación periférica. Otras fuentes de células madre hematopoyéticas incluyen la sangre del cordón umbilical y la placenta.

Las células madre hematopoyéticas aisladas se pueden cultivar, expandir y diferenciar *ex vivo* para proporcionar una gran variedad de material de origen para generar CHD que expresan antígenos exógenos. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas aisladas de la médula ósea, sangre periférica estimulada por citocinas o sangre del cordón umbilical pueden expandirse y diferenciarse *ex vivo* en eritrocitos maduros (Giarratana y col., *Nature Biotech.* 23: 69-74 (2005); solicitud de patente de los Estados Unidos 2007/0218552). Así pues, se aíslan células CD34+ de la médula ósea o sangre periférica o del cordón usando, por ejemplo, selección de microperlas magnéticas y columnas Mini-MACS (Miltenyi Biotech). En un ejemplo, las células se cultivan posteriormente en medio modificado sin suero complementado con seroalbúmina bovina (BSA) al 1 %, 120 µg/ml de transferrina humana saturada de hierro, 900 ng/ml de sulfato ferroso, 90 ng/ml de nitrato férrico y 10 µg/ml de insulina y se mantienen a 37 °C en dióxido de carbono al 5 % en aire. La expansión y diferenciación del cultivo celular puede producirse en múltiples etapas. Por ejemplo, en la etapa de crecimiento inicial después del aislamiento, las células se pueden expandir en el medio descrito en el presente documento en presencia de múltiples factores de crecimiento, incluyendo, por ejemplo, hidrocortisona, factor de células madre, IL-3 y eritropoyetina. En la segunda fase, las células pueden opcionalmente cocultivarse, por ejemplo, sobre una capa estromal adherente en presencia de eritropoyetina. En una tercera fase, las células pueden cultivarse en una capa estromal adherente en medio de cultivo en ausencia de factores exógenos. La capa estromal adherente puede ser células estromales MS-5 murinas, por ejemplo. Como alternativa, la capa estromal adherente puede ser células estromales mesenquimatosas procedentes de la médula ósea del adulto. Las células estromales adherentes pueden mantenerse en RPMI complementado con suero de ternero fetal al 10 %, por ejemplo. En algunas realizaciones, las células precursoras eritroides y poblaciones celulares procedentes de las mismas no se cultivan conjuntamente con células no CHD, p. ej., con una capa estromal adherente, es decir, se cultivan en ausencia de células no CHD. En algunas realizaciones, las CHD que comprenden un antígeno se cultivan en ausencia de células no CHD y se diferencian de modo que más del 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más del 98 % de las CHD estén desnucleadas y la población de células desnucleadas se obtiene sin una etapa de enriquecimiento, tal como separación gravitacional, clasificación magnética o fluorescente, irradiación, envenenamiento de células nucleadas y similares para seleccionar células desnucleadas.

En algunos casos, puede ser deseable expandir y diferenciar parcialmente las células madre hematopoyéticas CD34+ *in vitro* y permitir que se produzca diferenciación terminal en eritrocitos maduros *in vivo* (véase, p. ej., Neildez-Nguyen y col., *Nature Biotech.* 20: 467-472 (2002)). Se pueden expandir células madre hematopoyéticas CD34+ aisladas *in vitro* en ausencia de la capa de células estromales adherentes en un medio que contenga diversos factores, incluyendo, por ejemplo, ligando de Flt3, factor de células madre, trombopoyetina, eritropoyetina y factor insulínico de crecimiento. Las células precursoras eritroides resultantes se pueden caracterizar por la expresión superficial de CD36 y GPA y se pueden transfundir a un sujeto en el que se permite que se produzca la diferenciación terminal a eritrocitos maduros.

En algunas realizaciones, la población de CHD comprende una pluralidad de CHD desnucleadas que comprenden un polipéptido antigénico que se conserva durante la desnucleación. La CHD desnucleada aislada resultante que comprende un polipéptido antigénico presenta sustancialmente la misma fragilidad de la membrana osmótica que la correspondiente CHD aislada, sin modificar, sin cultivar.

- 5 En algunas realizaciones, la población de CHD comprende una pluralidad de células precursoras de eritrocitos sustancialmente en la misma fase de diferenciación y/o fase del ciclo celular, en la que las células precursoras comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica un antígeno. La mayoría de las células precursoras de eritrocitos que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica un antígeno son capaces de diferenciarse en eritrocitos maduros que conservan el antígeno sin conservar el ácido nucleico recombinante.
- 10 En algunas realizaciones, las células primarias se pueden recoger mediante venopunción, punción capilar o punción arterial. De los eritrocitos de sangre completa recogidos, las plaquetas u otras células se pueden aislar después usando una, o una combinación de técnicas, incluyendo agotamiento de plasma, gradiente de densidad, hidroxietilalmidón, PrepaCyte-CB y centrifugación.

Abastecimiento alogénico y autólogo

- 15 En algunas realizaciones, la generación de una CHD que expresa un antígeno exógeno comprende poner en contacto células aisladas opcionalmente cultivadas que son autólogas y/o alogénicas para el sujeto con un antígeno. Por ejemplo, los eritrocitos alogénicos para el sujeto incluyen uno o más eritrocitos específicos de grupo sanguíneo o uno o más eritrocitos de donantes universales. En algunas realizaciones, se pueden generar CHD que expresan antígenos exógenos mediante la fusión de eritrocitos, p. ej., entre eritrocitos autólogos para el sujeto y uno o más eritrocitos alogénicos, liposomas y/o vesículas artificiales.
- 20

En determinadas realizaciones, la transfusión autóloga de CHD que expresan antígenos exógenos incluye el aislamiento de eritrocitos, reticulocitos o células madre hematopoyéticas de un sujeto, la generación de una CHD adecuada que expresa antígeno exógeno poniendo en contacto la célula con un antígeno mediante procedimientos descritos en el presente documento y la administración (p. ej., mediante transfusión) de la CHD que expresa antígeno exógeno en el mismo sujeto.

25

En determinadas realizaciones, la transfusión alogénica de CHD que expresan antígenos exógenos incluye el aislamiento de eritrocitos, reticulocitos o células madre hematopoyéticas de un donante, la generación de una CHD adecuada que expresa antígeno exógeno poniendo en contacto la célula con un antígeno mediante procedimientos descritos en el presente documento y la administración (p. ej., mediante transfusión) de la CHD que expresa antígeno exógeno en un sujeto que es diferente del donante. Cuando se utilicen células alogénicas para transfusión, se debe tener cuidado de usar un grupo sanguíneo ABO compatible para prevenir una reacción de transfusión hemolítica intravascular aguda que se caracteriza por la activación del complemento y la lisis de eritrocitos incompatibles. Los grupos sanguíneos ABO se definen en función de la presencia o ausencia de los antígenos A y B del grupo sanguíneo, estructuras de hidratos de carbono monosacáridos que se encuentran en los extremos de las cadenas de oligosacáridos asociadas con glucoproteínas y glucolípidos en la superficie de los eritrocitos (revisado en Liu y col., Nat. Biotech. 25: 454-464 (2007)). Los eritrocitos del grupo 0 carecen de cualquiera de estas estructuras de monosacáridos antigénicos. Los sujetos con eritrocitos del grupo A tienen anticuerpos naturales contra eritrocitos del grupo B, mientras que los sujetos con eritrocitos del grupo B tienen anticuerpos contra eritrocitos del grupo A. Los sujetos del grupo sanguíneo AB no tienen ninguno de los anticuerpos y los individuos del grupo sanguíneo 0 tienen ambos. Los sujetos con anticuerpos anti-A y/o anti-B no pueden recibir una transfusión de sangre que contenga el antígeno correspondiente. Debido a que los eritrocitos del grupo 0 no contienen antígenos A ni B, se pueden transfundir de forma segura a receptores de cualquier grupo sanguíneo ABO, p. ej., receptores del grupo A, B, AB o 0. Los eritrocitos del grupo 0 se consideran universales y pueden usarse en todas las transfusiones de sangre. Por el contrario, los eritrocitos del grupo A se pueden administrar a receptores de los grupos A y AB, los eritrocitos del grupo B se pueden administrar a receptores de los grupos B y AB y los eritrocitos del grupo AB solo se pueden administrar a receptores AB. En las realizaciones en las que se generan CHD que expresan antígenos exógenos por contacto de eritrocitos o sus precursores con un antígeno, los eritrocitos obtenidos o sus precursores se emparejan según su compatibilidad con el receptor.

30

35

40

45

En algunos casos, puede ser beneficioso convertir una CHD que exprese un antígeno exógeno que comprenda un eritrocito que no sea del grupo 0 en un grupo sanguíneo universal. La eliminación enzimática de los monosacáridos inmunodominantes en la superficie de los eritrocitos del grupo A y del grupo B se puede usar para generar una población de CHD que expresan antígenos exógenos del grupo 0 (véase, p. ej., Liu y col., Nat. Biotech. 25: 454-464 (2007)). Las CHD que expresan antígenos exógenos del grupo B pueden convertirse usando una α -galactosidasa procedente de granos verdes de café. Como alternativa o adicionalmente, las actividades enzimáticas de α -N-acetilgalactosaminidasa y α -galactosidasa procedentes de la bacteria *E. meningosepticum* pueden usarse para eliminar respectivamente los antígenos inmunodominantes A y B (Liu y col., Nat. Biotech. 25: 454-464 (2007)), si están presentes en las CHD que expresan antígenos exógenos. En un ejemplo, se incubó un concentrado de glóbulos rojos aislados como se describe en el presente documento en glicina 200 mM (pH 6,8) y NaCl 3 mM en presencia de α -N-acetilgalactosaminidasa y α -galactosidasa (aproximadamente 300 μ g/ml de concentrado de glóbulos rojos) durante 60 min a 26 °C. Después del tratamiento, los glóbulos rojos se lavan mediante 3-4 aclarados en solución salina con

50

55

60

centrifugación y se determina su grupo AB0 según con técnicas convencionales de banco de sangre.

En realizaciones específicas, las CHD que expresan antígenos exógenos descritas en el presente documento pueden generarse de la siguiente manera. En primer lugar, se aíslan células precursoras eritroides. Como alternativa, estas células pueden ser autólogas para el paciente o de sangre de un donante sustancialmente universal. Por ejemplo, las células pueden ser de grupo 0 de AB0, factor rhesus Rh r/r, Duffy -/- y negativas para antígeno Kell grande K1. En el transcurso de la diferenciación de la célula precursora eritroide a CHD, se introduce un ácido nucleico recombinante que codifica el antígeno. El ácido nucleico recombinante que codifica el antígeno puede estar bajo el control de un promotor específico eritroide, tal como un promotor GATA-1 (véase, p. ej., Repik y col., *Clin Exp Immunol* 2005, 140: 230). El ácido nucleico recombinante que codifica el antígeno se puede introducir de cualquier forma conocida en la técnica, por ejemplo, como ADN plásmido, virus o ARNm. La introducción de ácidos nucleicos se puede realizar mediante diversos procedimientos convencionales, p. ej., transfección, transducción o electroporación.

Obtención y maduración plaquetaria

En realizaciones específicas, las CHD que expresan antígenos exógenos descritas en el presente documento pueden generarse poniendo en contacto plaquetas con un antígeno. Cada día, un ser humano adulto produce 2×10^{11} glóbulos rojos y aproximadamente la mitad de glóbulos blancos y plaquetas. En seres humanos, casi toda la producción de células sanguíneas se produce en la médula ósea roja, que representa un sistema de desarrollo jerárquico compuesto por células madre hematopoyéticas, progenitores de nivel intermedio y células en maduración comprometidas con cada linaje.

Aunque la morfología de todos los tipos principales de células sanguíneas es similar en sus etapas iniciales del desarrollo, los megacariocitos, células comprometidas con la producción de plaquetas, están marcados por una desviación estructural y funcional evidente más allá del nivel de diferenciación de las células blásticas que crecen hasta un tamaño 10 veces mayor que el diámetro de la mayoría de las demás células de la médula ósea y sanguíneas, y que contienen hasta 128 veces el complemento cromosómico normal, estas células dan lugar a plaquetas sanguíneas. Después de una serie de divisiones celulares normales, el precursor de megacariocitos en desarrollo entra en un ciclo celular único caracterizado por una breve fase G1 (aproximadamente 1 h), una fase S habitual (7 h), una fase G2 muy breve (~45 min), seguida de la fase endomitótica (una fase M abortada). Una vez que la célula desarrolla un núcleo muy poliploide, también desarrolla membranas de demarcación necesarias para la fragmentación citoplasmática. Este acontecimiento se acompaña de la expresión de la glucoproteína GPIIb/IIIa (receptor de fibrinógeno plaquetario; Papayannopoulou y col., *Exp. Hematol.*, 24: 660-9, 1996) y GPIb (receptor del factor de von Willebrand; Kaushansky y col., *Nature*, 369: 568-571, 1994), los gránulos que contienen ADP, serotonina, tromboglobulina y otras sustancias críticas para la función de las plaquetas maduras. Por último, los megacariocitos muy poliploides experimentan partición citoplasmática, permitiendo la liberación de miles de plaquetas (Choi y col., *Blood*, 85: 402-413, 1995; Cramer y col., *Blood*, 89: 2336-2346, 1997).

Como todos los precursores de células sanguíneas, los megacariocitos proceden de células madre pluripotentes de la médula ósea que conservan la capacidad de autorrenovarse ampliamente o de diferenciarse en todos los elementos de la sangre. La producción de plaquetas está regulada en parte por mecanismos de señalización inducidos por la interacción entre la trombopoyetina (TPO) y su receptor celular TPOR/MPUc-MPL.

La trombopoyetina (TPO) es un factor de crecimiento hematopoyético implicado en la estimulación de la megacariocitopoyesis y la producción de plaquetas. TPO se expresa en hígado y riñón y, en respuesta a la demanda de plaquetas, su expresión también puede estar regulada positivamente en el microambiente de la médula ósea (Kato y col., *Stem Cells*, 16: 322-328, 1998; McCarty y col., *Blood*, 86: 3668-3675, 1995). Como la expresión de TPO es en su mayoría constitutiva, se cree que los niveles de TPO están regulados por la inmovilización de plaquetas (Fielder y col., *Blood* 87: 2154, 1996).

El gen que codifica la TPO se ha clonado y caracterizado (Kuter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 11104-11108, 1994; Bartley y col., *Cell*, 77: 1117-1124, 1994; Kaushansky y col., *Nature*, 369: 568-571, 1994; Wendling y col., *Nature*, 369: 571-574, 1994 y de Sauvage y col., *Nature*, 369: 533-538, 1994). El ADNc de la TPO humana (hTPO) codifica un polipéptido de 353 aminoácidos de longitud. La hTPO de longitud completa secretada por células de mamífero después de la escisión del péptido señal consiste en 332 aminoácidos. Aunque la masa molecular predicha de esta proteína es de 38 kDa, las masas moleculares observadas a partir de mediciones de material en suero o en líquido de cultivo de células recombinantes varían entre 18 y 85 kD (glucosilación y procesamiento proteolítico postraduccional).

El receptor de superficie celular para TPO (TPOR/MPL/c-MPL) es un producto del protooncogén c-mpl, un homólogo de v-mpl, una proteína de la envoltura del virus de la leucemia mieloproliferativa (MPLV) que se ha mostrado que induce un trastorno panmieloide (Wendling, *Virol.*, 149: 242-246, 1986). El gen humano c-mpl codifica una proteína de 635 aa que tiene un peso molecular predicho de 71 kD (Vigon y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5640-44, 1992; Mignotte y col., *Genomics*, 20: 5-12, 1994).

Los ratones con anulación de la expresión de TPO o su receptor (TPOR/MPL/c-MPL) manifiestan un fenotipo trombocitopénico grave (Gurney y col., *Science*, 265: 1445, 1994; Kaushansky y col., *J. Clin. Invest.*, 96: 1683, 1995; de Sauvage y col., *J. Exp. Med.*, 183: 651, 1996).

Se ha mostrado que múltiples citocinas (p. ej., factor de células madre [SCF], IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, factor inhibidor de la leucemia [LIF], G-CSF, GM-CSF, M-CSF, eritropoyetina (EPO), ligando kit e interferón) poseen actividad trombocitopoyética.

Activación plaquetaria

5 Las plaquetas resultantes son pequeños fragmentos celulares en forma de disco que experimentan una rápida transformación cuando encuentran sitios de daño vascular. Se vuelven más esféricos y extruyen pseudópodos, sus receptores de fibrinógeno se activan, lo que da lugar a la agregación, y liberan su contenido de gránulos y finalmente forman un tapón que es responsable de la hemostasia primaria (Siess, W., *Physiol. Rev.* 69: 58-178, 1989). La activación de las plaquetas también está implicada en la patogenia de la angina inestable, el infarto de miocardio y el ictus (Packham, M. A., *Can J. Physiol Pharmacol.* 72: 278-284).

10 Varias sustancias fisiológicas están implicadas en la activación de plaquetas, tales como colágeno, que está expuesto en las superficies subendoteliales, trombina, generada por la cascada de coagulación, y tromboxano A₂ (TXA₂) y ADP, que se liberan de plaquetas activadas. El colágeno se une a varias proteínas de la membrana plaquetaria, incluyendo integrina α₂ β₁, lo que conduce a la activación plaquetaria a través de la liberación de TXA₂ y ADP (Shattil, S. J., y col., *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 695-704, 1994). Por el contrario, la trombina, TXA₂ y ADP, activan receptores acoplados a proteína G directamente e inducen la agregación plaquetaria y la liberación de gránulos (Hourani, S. M y Cusack, N. J., *Pharmacol. Rev.* 43: 243-298, 1991). Se cree que los principales acontecimientos implicados en la activación plaquetaria son el resultado de la activación de isoformas β de la fosfolipasa C (PLC) que conducen a la generación de trifosfato de inositol 1,4,5 y diacilglicerol. Las plaquetas contienen principalmente dos isoformas, PLC-β₂ y PLC-β₃.

20 Los receptores plaquetarios que median en la adhesión y agregación plaquetarias se ubican en los dos complejos principales de glucoproteínas de la superficie plaquetaria. Estos complejos son el complejo de glucoproteína Ib-IX, que facilita la adhesión plaquetaria mediante unión al factor de von Willebrand (vWF), y el complejo de glucoproteína IIb-IIIa que liga las plaquetas en agregados mediante unión al fibrinógeno. Los pacientes con síndrome de Bernard-Soulier, un trastorno hemorrágico congénito, muestran una adhesión plaquetaria deficiente debido a una deficiencia del complejo de glucoproteína Ib-IX que se une al vWF, trombocitopenia leve y plaquetas linfocoides grandes.

25 La glucoproteína V (GPV) es una importante (≈12 000 moléculas/plaqueta) proteína de membrana plaquetaria muy glucosilada (Mr 82 000). La exposición de las plaquetas a la trombina libera un fragmento soluble de 69 kDa denominado GPVfl. La GPV puede interactuar de forma no covalente con el complejo GPIb-IX, un complejo formado por la asociación no covalente de GPIb (que consiste en GPIbα, una proteína de 145 kDa, disulfuro ligado a GPIbβ, una proteína de 24 kDa) con GPIX (una proteína de 22 kDa). Los sitios de unión para el factor de von Willebrand y para la trombina en el complejo GPIb-IX se han localizado en GPIbα. Ya que ahora se sabe que la trombina activa las plaquetas escindiendo el receptor de trombina (Vu y col., *Cell* 64: 1057-1068 (1990)), un receptor acoplado a proteína G, se desconoce si la trombina escinde la GPV de manera incidental como consecuencia de la unión de la trombina a GPIbα o si esta escisión tiene una función fisiológica. GPIbα, GPIbβ y GPIX contienen uno o más dominios ricos en leucina homólogos de 24 aminoácidos. Estos dominios también se encuentran en una gran familia de glucoproteínas ricas en leucina (LRG).

30 La GPV es un marcador del linaje celular megacariocítico. Un anticuerpo monoclonal específico para GPV (SW16) no se une a glóbulos rojos, células endoteliales de leucocitos o líneas celulares tales como HEL o MEG-01 que se sabe que expresan marcadores de megacariocitos plaquetarios.

40 La GPV madura está compuesta por 543 aminoácidos que contienen un solo dominio transmembrana, un dominio citoplasmático corto (16 restos) y un dominio extracelular grande con 8 sitios potenciales de N-glucosilación. El análisis del dominio extracelular reveló la presencia de 15 repeticiones ricas en Leu en tándem de 24 aminoácidos con homología con GPIbα e identificó un sitio de escisión para la trombina cerca del extremo C con homología con la cadena Aα del fibrinógeno.

Condiciones de cultivo

45 Las fuentes para generar CHD que expresan antígenos exógenos descritas en el presente documento incluyen células circulantes tales como CHD. Se puede aislar una fuente de células adecuada de un sujeto como se describe en el presente documento a partir de células progenitoras hematopoyéticas o eritroides procedentes del paciente, procedentes de líneas CHD inmortalizadas o procedentes de células madre pluripotentes inducidas, opcionalmente cultivadas y diferenciadas. Se conocen bien en la materia procedimientos para generar eritrocitos usando técnicas de cultivo celular, p. ej., Giarratana y col., *Blood* 2011, 118: 5071, Huang y col., *Mol Ther* 2013, publicación electrónica antes de impresión, 3 de septiembre, o Kurita y col., *PLOS One* 2013, 8: e59890. Los protocolos varían según los factores de crecimiento, las líneas celulares de partida, el periodo de cultivo y los rasgos morfológicos por los que se caracterizan las células resultantes. También se han establecido sistemas de cultivo para la producción de sangre que pueden sustituir a las transfusiones de donantes (Fibach y col., 1989 *Blood* 73: 100). Recientemente, se diferenciaron células CD34 hasta la fase de reticulocitos, seguido de una transfusión exitosa en un sujeto humano (Giarratana y col., *Blood* 2011, 118: 5071).

Se proporcionan en el presente documento procedimientos de cultivo para CHD y CHD que expresan antígenos

exógenos procedentes de CHD. Las CHD se pueden cultivar a partir de células progenitoras hematopoyéticas, incluyendo, por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas CD34+ (Giarratana y col., Blood 2011, 118: 5071), células madre pluripotentes inducidas (Kurita y col., PLOS One 2013, 8: e59890) y células madre embrionarias (Hirose y col., 2013 Stem Cell Reports 1: 499). Se conocen en la materia cócteles de factores de crecimiento y diferenciación que son adecuados para expandir y diferenciar células progenitoras. Los ejemplos de factores de expansión y diferenciación adecuados incluyen, pero sin limitación, factor de células madre (SCF), una interleucina (IL) tal como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, LCR, G-CSF, trombopoyetina (TPO), GM-CSF, eritropoyetina (EPO), Flt3, Flt2, PIXY 321 y factor inhibidor de la leucemia (LIF).

Las CHD se pueden cultivar a partir de progenitores hematopoyéticos, tales como células CD34+, poniendo en contacto las células progenitoras con factores definidos en un procedimiento de cultivo de varias etapas. Por ejemplo, las CHD se pueden cultivar a partir de progenitores hematopoyéticos en un procedimiento de tres etapas.

La primera etapa puede comprender poner en contacto las células en cultivo con el factor de células madre (SCF) a 1-1000 ng/ml, eritropoyetina (EPO) a 1-100 U/ml e interleucina-3 (IL-3) a 0,1-100 ng/ml. La primera etapa comprende opcionalmente poner en contacto las células en cultivo con un ligando que se une a y activa un receptor de hormonas nucleares, tal como, p. ej., el receptor de glucocorticoides, el receptor de estrógeno, el receptor de progesterona, el receptor de andrógenos o el receptor x de pregnano. Los ligandos para estos receptores incluyen, por ejemplo, un corticoesteroide, tal como, p. ej., dexametasona a 10 nM-100 µM o hidrocortisona a 10 nM-100 µM; un estrógeno, tal como, p. ej., beta-estradiol a 10 nM-100 µM; un progestágeno, tal como, p. ej., progesterona a 10 nM-100 µM, hidroxiprogesterona a 10 nM-100 µM, 5α-dihidroprogesterona a 10 nM-100 µM, 11-desoxicorticosterona a 10 nM-100 µM o una progestina sintética, tal como, p. ej., acetato de clormadinona a 10 nM-100 µM; un andrógeno, tal como, p. ej., testosterona a 10 nM-100 µM, dihidrotestosterona a 10 nM-100 µM o androstendiona a 10 nM-100 µM; o un ligando del receptor x de pregnano, tal como, p. ej., rifampicina a 10 nM-100 µM, hiperforina a 10 nM-100 µM, hierba de San Juan (hipericina) a 10 nM-100 µM, o moléculas de tipo vitamina E, tales como, p. ej., tocoferol a 10 nM-100 µM. La primera etapa también puede comprender opcionalmente poner en contacto las células en cultivo con una molécula de tipo insulínico, tal como, p. ej., insulina a 1-50 µg/ml, factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1) a 1-50 µg/ml, factor insulínico de crecimiento 2 (IGF-2) a 1-50 µg/ml o factor de crecimiento mecánico a 1-50 µg/ml. La primera etapa puede comprender además opcionalmente poner en contacto las células en cultivo con transferrina a 0,1-5 mg/ml.

La primera etapa puede comprender opcionalmente poner en contacto las células en cultivo con una o más interleucinas (IL) o factores de crecimiento tales como, p. ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), trombopoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos (MGDF), factor inhibidor de la leucemia (LIF) y ligando Flt3. Cada interleucina o factor de crecimiento puede suministrarse normalmente a una concentración de 0,1-100 ng/ml. La primera etapa también puede comprender opcionalmente poner en contacto las células en cultivo con proteínas séricas o moléculas no proteicas tales como, p. ej., suero bovino fetal (1-20 %), plasma humano (1-20 %), plasmanato (1-20 %), suero humano (1-20 %), albúmina (0,1-100 mg/ml) o heparina (0,1-10 U/ml).

La segunda etapa puede comprender poner en contacto las células en cultivo con factor de células madre (SCF) a 1-1000 ng/ml y eritropoyetina (EPO) a 1-100 U/ml. La segunda etapa también puede comprender opcionalmente poner en contacto las células en cultivo con una molécula de tipo insulínico, tal como, p. ej., insulina a 1-50 µg/ml, factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1) a 1-50 µg/ml, factor insulínico de crecimiento 2 (IGF-2) a 1-50 µg/ml o factor de crecimiento mecánico a 1-50 µg/ml. La segunda etapa puede comprender además opcionalmente poner en contacto las células en cultivo con transferrina a 0,1-5 mg/ml. La segunda también puede comprender opcionalmente poner en contacto las células en cultivo con proteínas séricas o moléculas no proteicas tales como, p. ej., suero bovino fetal (1-20 %), plasma humano (1-20 %), plasmanato (1-20 %), suero humano (1-20 %), albúmina (0,1-100 mg/ml) o heparina (0,1-10 U/ml).

La tercera etapa puede comprender poner en contacto las células en cultivo con eritropoyetina (EPO) a 1-100 U/ml. La tercera etapa puede comprender opcionalmente poner en contacto las células en cultivo con el factor de células madre (SCF) a 1-1000 ng/ml. La tercera etapa puede comprender opcionalmente además poner en contacto las células en cultivo con una molécula de tipo insulínico, tal como, p. ej., insulina a 1-50 µg/ml, factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1) a 1-50 µg/ml, factor insulínico de crecimiento 2 (IGF-2) a 1-50 µg/ml o factor de crecimiento mecánico a 1-50 µg/ml. La tercera etapa también puede comprender opcionalmente poner en contacto las células en cultivo con transferrina a 0,1-5 mg/ml. La tercera etapa también puede comprender opcionalmente poner en contacto las células en cultivo con proteínas séricas o moléculas no proteicas tales como, p. ej., suero bovino fetal (1-20 %), plasma humano (1-20 %), plasmanato (1-20 %), suero humano (1-20 %), albúmina (0,1-100 mg/ml) o heparina (0,1-10 U/ml).

El procedimiento de cultivo puede comprender opcionalmente poner en contacto células mediante un procedimiento conocido en la técnica con una molécula, p. ej., una molécula de ADN, una molécula de ARN, un ARNm, un ARNip, un microARN, un ARNinc, un ARNhc, una hormona o una pequeña molécula, que activa o atenúa uno o más genes. Los genes diana pueden incluir, por ejemplo, genes que codifican un factor de transcripción, un factor de crecimiento o un receptor del factor de crecimiento, incluyendo, pero sin limitación, p. ej., GATA1, GATA2, CMyc, hTERT, p53,

EPO, SCF, insulina, EPO-R, SCF-R, transferrina-R, insulina-R.

En una realización, las células CD34+ se colocan en un cultivo que contiene cantidades variables de IMDM, FBS, glutamina, BSA, holotransferrina, insulina, dexametasona, β -estradiol, IL-3, SCF y eritropoyetina, en tres etapas de diferenciación separadas durante un total de 22 días.

- 5 En una realización, las células CD34+ se colocan en un cultivo que contiene cantidades variables de IMDM, FBS, glutamina, BSA, holotransferrina, insulina, dexametasona, β -estradiol, IL-3, SCF y trombopoyetina, en tres etapas de diferenciación separadas durante un total de 14 días.

- 10 En una realización, las células CD34+ se colocan en un cultivo que contiene cantidades variables de IMDM, FBS, glutamina, BSA, holotransferrina, insulina, dexametasona, β -estradiol, IL-3, SCF y GCSF, en tres etapas de diferenciación separadas durante un total de 15 días.

- 15 En determinadas realizaciones, las células que comprenden un antígeno exógeno de interés pueden estar compuestas o proceder de una pluralidad de células circulantes incluyendo, pero sin limitación, las enumeradas en la tabla A. En una realización preferida, las células circulantes de la divulgación son CHD, tales como, p. ej., glóbulos rojos nucleados, precursores de glóbulos rojos o glóbulos rojos desnucleados. Por ejemplo, las CHD son una célula madre de sangre del cordón umbilical, una célula CD34+, una célula madre hematopoyética (CMH), una célula formadora de colonias del bazo (UFC-B), una célula progenitora mielóide común (PMC), una célula formadora de colonias de blastocitos, una unidad formadora de brote eritroide (UFB-E), una célula progenitora eritroide-megacariocítica (PEM), una unidad formadora de colonias eritroides (UFC-E), un reticulocito, un eritrocito, una célula madre pluripotente inducida (iPSC), una célula madre mesenquimatosas (CMM), un normoblasto policromático, un normoblasto ortocromático o las enumeradas en la tabla A1, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, las CHD son células inmortales o inmortalizadas, por ejemplo, eritroblastos inmortalizados generados por transducción retroviral de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ para expresar Oct4, Sox2, Klf4, cMyc y suprimir TP53 (p. ej., Huang y col., Mol Ther 2013, publicación electrónica antes de impresión el 3 de septiembre).

- 25 Se proporcionan en el presente documento composiciones de eritrocitos, en las que una pluralidad de eritrocitos expresan un antígeno exógeno de interés o un fragmento del mismo. Las células se pueden cultivar a partir de células progenitoras hematopoyéticas o eritroides procedentes del paciente, procedentes de líneas CHD inmortalizadas o procedentes de células madre pluripotentes inducidas. Se conocen en la materia procedimientos para generar eritrocitos en cultivo celular, p. ej., Giarratana y col., Blood 2011, 118: 5071, Huang y col., Mol Ther 2013 o Kurita y col., PLOS One 2013, 8: e59890. Los antígenos exógenos se pueden introducir mediante la transfección de copias individuales o múltiples de genes, transducción con un virus o electroporación en presencia de ADN o ARN. Se conocen bien en la materia procedimientos para la expresión de proteínas exógenas en células de mamíferos. Por ejemplo, la expresión del factor IX exógeno en las células hematopoyéticas es inducida por la transducción viral de células progenitoras CD34+, véase Chang y col., Nat Biotechnol 2006, 24: 1017.

- 35 Las composiciones de eritrocitos descritas en el presente documento se pueden generar de la siguiente manera. En primer lugar, se aíslan células precursoras eritroides. Como alternativa, estas células pueden ser autólogas para el paciente o de sangre de un donante sustancialmente universal. Por ejemplo, las células pueden ser de grupo 0 de AB0, factor rhesus Rh r/r, Duffy -/- y negativas para antígeno Kell grande K1. En el transcurso de la diferenciación de la célula precursora eritroide a CHD, se introducen los ácidos nucleicos que codifican el antígeno exógeno. El ácido nucleico que codifica el antígeno exógeno puede estar bajo el control de un promotor específico eritroide, tal como un promotor GATA-1 (véase, p. ej., Repik y col., Clin Exp Immunol 2005, 140: 230). El ácido nucleico que codifica el antígeno exógeno, se puede introducir de cualquier forma conocida en la técnica, por ejemplo, como ADN plásmido, virus o ARNm. La introducción de ácidos nucleicos se puede realizar mediante diversos procedimientos convencionales, p. ej., transfección, transducción o electroporación.

- 45 Modificación de células progenitoras. Pueden introducirse ácidos nucleicos, tales como vectores de expresión de ADN o ARNm para producir el antígeno de interés, en células progenitoras, que pueden aislarse de una fuente original u obtenerse de la expansión anterior mediante tecnología recombinante rutinaria como se proporciona en el presente documento. En algunos casos, los vectores de expresión pueden diseñarse de modo que se puedan incorporar al genoma de las células mediante recombinación homóloga o no homóloga mediante procedimientos conocidos en la técnica.

- 50 En algunos casos, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que puede dirigirse a y cortar selectivamente el genoma, por ejemplo, un CRISPR/Cas9, nucleasa efectora de tipo activador transcripcional (TALEN) o nucleasa de dedos de cinc, se usa para dirigir la inserción de la carga útil de ácido nucleico del vector de expresión a una ubicación genómica particular, por ejemplo, el locus CR1 (1q32.2), el locus de la hemoglobina (11p15.4) u otra proteína asociada a eritroides incluyendo, pero sin limitación, las enumeradas en la tabla C.

- 55 En algunos casos, el ácido nucleico es una molécula de ARN, o una molécula de ADN que codifica una molécula de ARN, que silencia o reprime la expresión de un gen diana. Por ejemplo, la molécula puede ser un ARN interferente pequeño (ARNip), una molécula de ARN antisentido o una molécula de ARN en horquilla corta (ARNhc).

Los procedimientos para transferir vectores de expresión a células progenitoras incluyen, pero sin limitación,

transferencia de genes mediada por virus, transferencia mediada por liposomas, transformación, pistolas génicas, transfección y transducción, p. ej., transferencia de genes mediada por virus, tal como el uso de vectores basados en virus de ADN, tales como adenovirus, virus adenoasociado y virus del herpes, así como vectores basados en retrovirus. Los ejemplos de modos de transferencia génica incluyen, p. ej., ADN desnudo, precipitación con CaPO₄, DEAE dextrano, electroporación, fusión de protoplastos, lipofección y microinyección celular.

Cualquiera de las células progenitoras modificadas genéticamente descritas en el presente documento puede cultivarse en condiciones adecuadas que permitan la diferenciación en glóbulos rojos desnucleados maduros, p. ej., el procedimiento de cultivo *in vitro* descrito en el presente documento. Los glóbulos rojos desnucleados resultantes presentan y expresan proteínas asociadas con eritrocitos maduros, p. ej., hemoglobina, glucoforina A, que se pueden validar y cuantificar mediante procedimientos convencionales (p. ej., análisis de transferencia de Western o FACS).

Estrategias para la expresión de antígenos exógenos

En el presente documento se proporcionan antígenos que son presentados por CHD que expresan antígenos exógenos. En algunas realizaciones, un antígeno es capaz de interactuar con una diana, p. ej., para asociarse o unirse a una diana. Un antígeno puede comprender o puede consistir esencialmente en un polipéptido. En algunas realizaciones, el antígeno comprende un polipéptido, un hidrato de carbono, un ácido nucleico, un lípido, una molécula pequeña o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los antígenos no interactúan con una diana, sino que actúan como cargas útiles para administrar por la CHD que expresa antígeno exógeno a una célula, tejido u otro sitio en el cuerpo de un sujeto.

Polipéptidos antigénicos, quimeras y fusiones

En algunas realizaciones, los antígenos comprenden polipéptidos. El tamaño de los polipéptidos receptores puede variar de 6 aminoácidos a 3000 aminoácidos y puede superar los 6, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400 o puede superar los 500 aminoácidos. El tamaño de los polipéptidos receptores puede variar de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 500 aminoácidos, de aproximadamente 30 aminoácidos a aproximadamente 500 aminoácidos o de aproximadamente 40 aminoácidos a aproximadamente 500 aminoácidos.

En algunas realizaciones, el polipéptido antigénico comprende una proteína quimérica o de fusión que puede comprender dos o más dominios proteicos distintos. Estos antígenos quiméricos son heterólogos o exógenos en el sentido de que los diversos dominios proceden de diferentes fuentes y, así pues, no se encuentran juntos en la naturaleza y pueden estar codificados, p. ej., por ácidos nucleicos recombinantes. Se pueden producir polipéptidos antigénicos mediante varios procedimientos, muchos de los cuales son bien conocidos en la técnica y también se describen en el presente documento. Por ejemplo, se pueden obtener polipéptidos antigénicos mediante extracción (p. ej., de células aisladas), mediante expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido antigénico o mediante síntesis química. Se pueden producir polipéptidos antigénicos mediante, por ejemplo, tecnología recombinante y vectores de expresión que codifican el polipéptido introducido en células hospedadoras (p. ej., mediante transformación o transfección) para la expresión del polipéptido antigénico codificado.

Existen diversos cambios conservadores que se pueden realizar, en general, en una secuencia de aminoácidos sin alterar la actividad. Estos cambios se denominan sustituciones o mutaciones conservadoras; es decir, un aminoácido que pertenece a un agrupamiento de aminoácidos que tiene un tamaño particular, carga u otra característica puede sustituir a otro aminoácido. Las sustituciones de una secuencia de aminoácidos pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina y tirosina. Los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. No se espera que dichas alteraciones afecten sustancialmente al peso molecular aparente determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida o punto isoeléctrico. Las sustituciones conservadoras también incluyen la sustitución de otros isómeros ópticos por isómeros ópticos de las secuencias, específicamente L aminoácidos por D aminoácidos para uno o más restos de una secuencia. Por otra parte, todos los aminoácidos de una secuencia pueden experimentar una sustitución de isómero D por L. Las sustituciones conservadoras ilustrativas incluyen, pero sin limitación, Arg por Lys y viceversa para mantener una carga positiva; Asp por Glu y viceversa para mantener una carga negativa; Thr por Ser de modo que se mantenga un ~ OH libre; y Asn por Gln para mantener un NH₂ libre. Por otra parte, pueden realizarse, en algunos casos, mutaciones puntuales, supresiones e inserciones de las secuencias polipeptídicas o secuencias de ácido nucleico correspondientes sin pérdida de función del polipéptido o fragmento de ácido nucleico. Las sustituciones pueden incluir, p. ej., 1, 2, 3 o más restos. Cualquier enseñanza de una secuencia de aminoácidos específica o un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido o enseñanza del nombre del mismo incluye cualquier mutación puntual de sustitución conservadora, supresiones e inserciones de esas secuencias polipeptídicas o secuencias de ácido nucleico correspondientes y cualquier secuencia depositada para la proteína o el gen en una base de datos que se puede realizar sin una pérdida de función del polipéptido o fragmento de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, el polipéptido antigénico está asociado con la membrana de la CHD que expresa antígeno exógeno. En otras realizaciones, el polipéptido antigénico no está asociado con la membrana de la CHD que expresa

antígeno exógeno.

En una realización, la relación de masa de lípido con respecto a antígeno en la CHD que expresa antígeno exógeno es menor de 1:1000, aproximadamente 1:1000, aproximadamente 1:500, aproximadamente 1:250, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:9, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 250:1, aproximadamente 500:1, aproximadamente 1000:1, aproximadamente 10 000:1, aproximadamente 100 000:1, aproximadamente 1 000 000:1, aproximadamente 10 000 000:1, aproximadamente 100 000 000:1, aproximadamente 1 000 000 000:1 o superior a aproximadamente 1 000 000 000:1.

En una realización, la relación de masa de polipéptido antigénico no exógeno con respecto a antígeno en la CHD que expresa antígeno exógeno es menor de 1:1000, aproximadamente 1:1000, aproximadamente 1:500, aproximadamente 1:250, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:9, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 250:1, aproximadamente 500:1, aproximadamente 1000:1, aproximadamente 10 000:1, aproximadamente 100 000:1, aproximadamente 1 000 000:1, aproximadamente 10 000 000:1, aproximadamente 100 000 000:1, aproximadamente 1 000 000 000:1 o superior a aproximadamente 1 000 000 000:1.

En determinadas realizaciones, el antígeno polipeptídico está ubicado en la superficie y se expone al entorno alrededor de la CHD que expresa antígeno exógeno. En algunas realizaciones, el antígeno polipeptídico está ubicado en el interior y frente al lado no expuesto de la CHD que expresa antígeno exógeno.

En determinadas realizaciones, el antígeno polipeptídico comprende al menos uno de los siguientes dominios, un dominio S (superficie), un dominio A (anclaje) y/o un dominio U (no expuesto), en el que el dominio S es un dominio de superficie expuesto al entorno alrededor de la CHD que expresa antígeno exógeno, en el que el dominio A es un anclaje y en el que el dominio U está ubicado dentro y/o se frente al lado no expuesto de la CHD que expresa antígeno exógeno.

Opcionalmente, el polipéptido antigénico comprende i) uno o más dominios S adicionales, denominados dominios S' o ii) uno o más dominios U adicionales, denominados dominios U'.

En algunas realizaciones, el dominio S y el dominio A forman parte de la misma cadena polipeptídica.

En algunas realizaciones, el dominio A y el dominio U forman parte de la misma cadena polipeptídica.

En algunas realizaciones, uno cualquiera o más del dominio S, A, U se añade de forma externa al CHD que expresa antígeno exógeno.

En algunas realizaciones, uno cualquiera o más del dominio S, A, U se produce dentro de la CHD que expresa antígeno exógeno.

En algunas realizaciones, uno cualquiera o más del dominio S, A, U es un polipéptido.

En algunas realizaciones, uno cualquiera o más del dominio S, A, U no es un polipéptido.

Se muestran esquemas de conformaciones ilustrativas de antígenos dentro de o sobre CHD que expresan antígenos exógenos en las figuras 13A, 13B y 13C.

El dominio A

En determinadas realizaciones, el dominio A es un polipéptido de membrana. El dominio A puede ser, p. ej., un polipéptido de membrana integral o un polipéptido asociado a membrana.

El dominio A puede seleccionarse de una de las siguientes clases, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, bitópico alfa-helicoidal, politópico alfa-helicoidal, transmembrana de barril beta, monotópico/periférico todo alfa, monotópico/periférico todo beta, monotópico/periférico alfa/beta, monotópico/periférico alfa + beta, péptidos alfa helicoidales, péptidos de horquilla beta, péptidos beta-helicoidales, proteína transmembrana de tipo 1 (extremo N extracelular), proteína transmembrana de tipo 2 (extremo N intracelular), proteína transmembrana de tipo 3, proteína transmembrana de tipo 4A, proteína transmembrana de tipo 4B, proteína anclada a lípidos, proteína anclada a glucosilfosfatidilinositol (GPI), proteína anclada a cadena de prenilo o péptidos de estructura irregular.

En determinadas realizaciones, el dominio A es endógeno, p. ej., endógeno para una CHD, una plaqueta o una célula

hematopoyética. En algunas realizaciones, el dominio A es endógeno para una célula de mamífero.

En determinadas realizaciones, el dominio A es exógeno, p. ej., exógeno para una CHD, una plaqueta o una célula hematopoyética. En algunas realizaciones, el dominio A es exógeno para una célula de mamífero.

El dominio A puede seleccionarse de las siguientes moléculas o fragmentos de las mismas, incluyendo, pero sin limitación, CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD12w, CD13, CD14, CD15, CD16, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD68, CD69, CD71, CD72, CD73, CD74, CD80, CD81, CD82, CD83, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD95, CD96, CD100, CD103, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD109, CD117, CD120, CD122, CD123, CD127, CD132, CD133, CD134, CD135, CD138, CD141, CD142, CD143, CD144, CD147, CD151, CD152, CD154, CD155, CD156, CD158, CD163, CD165, CD166, CD168, CD184, CDw186, CD195, CD197, CDw199, CD209, CD202a, CD220, CD221, CD235a, CD271, CD279, CD303, CD304, CD309, CD326, Proteína 1A relacionada con Ras, precursor de la semaporina 7A, calcio y proteína de unión a integrina 1, proteína de membrana de eritrocitos de 55 kDa, flotilina-1, flotilina-2, proteína asociada a la membrana eritroide, factor 2C de iniciación de la traducción eucariota 2, citocromo b5 reductasa, homólogo de la proteína 42 de control de la división celular, proteína KIAA1363, banda 3, anexina VII, acuaporina, ecto-ADP-ribosiltransferasa 4, Kell, LFA-3, miembro 1 de la familia de vehículos de soluto 2, proteína LGALS3, transportador de urea, polipéptido antigénico del grupo sanguíneo CE de Rh, glucoproteína asociada a Rh, dematina, grupos sanguíneos AB0, acuaporina 3, Auberger, banda 3, basigina, C41, CD44, Cis AB, antígeno de Colton, componente 4 del complemento, CR1, DAF, Diego, Duffy, antígeno Hh/Bombay, antígeno ii, grupo sanguíneo indio, Kell, Kidd, antígeno de Lewis, antígeno luterano, sistema de antígenos MNS, grupo Cost, grupo Er, dematina, estomatina, tropomiosina, transportador de glucosa, aducina, rabfilina, C1 tetrahidrofolato sintasa, grupo Vel, antígeno Lan, antígeno At, antígeno Jr, antígeno AnWj, antígeno Sd, Batty, Bilkes, Box, Christiansen, HJK, HOFM, JFV, JONES, Jensen, Katagiri, Livesay, Milne, Oldeide, Peters, Rasmussen, Reid, REIT, SARA, grupo sanguíneo D de Rhesus, aldolasa, tropomodulina, arginasa, creatina cinasa, proteína B-Cam, Rap1A, Bennett-Goodspeed, sistema de antígenos P, sistema de antígenos del grupo sanguíneo Xg de Rh, proteína XK, sistema de antígenos Yt/Cartwright, CD58, Rh, Scianna, Radin, DARC (Duffy), CR1 Knops-McCoy, DAF Cromer, Gerbich (GYPC), CD47, glucoforina A, banda 3 (AE3), GYPB Ss, C4A, C4B Chido, componente Rodgers C4 del complemento, HLA Bg HLA de clase I, transporte de amonio asociado a Rh RHAG, glucoproteína, proteína del canal de agua Colton (Co), acetilcolinesterasa ACHE Cartwright (Yt), glutatión transferasa, glucoforina C, acuaporina, proteína de membrana asociada a eritroblastos, CD44, sinaptobrevina 2, ribonucleasa, citocromo B duodenal, glucosil transferasas AB0, CD59, CD44 indio (In), receptor de adhesión AnWj, MER2, ADP-ribosiltransferasa DOK Dombrock, receptor de adhesión potencial SEMA7A JMH, proteína UMOD Sda Tamm-Horsfall (uromodulina), Diego (Di), proteína del canal aniónico Wright (Wr) (banda 3, AE1), transportador de urea Kidd (Jk), alfa(1,3) fucosiltransferasa Lewis (Le) FUT3, neurotelina OK Oka, molécula de adhesión potencial, receptor de adhesión LW, alfa(1,2) fucosiltransferasa secretora (Se) FUT2, alfa (1,2) fucosiltransferasa FUT1 Hh, receptor de adhesión luterano (Lu) LU, P1 glucosiltransferasa, transportador de neurotransmisores potencial XK Kx, XG Xg denominado anteriormente PBDX, MIC2, hemoglobina, anquirina, espectrina, metaloproteinasas KEL Kell (formas K, k, Kp, Js), antígeno de Torkildsen, coenzima Q10, Rab 35, proteína de unión a Ral A, proteína de unión a la zona pelúcida, proteína Lyn B, proteína KlAa1741, DC38, ATPasa transportadora de calcio, GPIX, GPIIb, GPIIb, GPV, GPIb-IX-V, GPVI, GPIa/IIa, GPIIb/IIIa, GPV/IIa.

El dominio S

En algunas realizaciones, el dominio S es una proteína o un polipéptido. En otras realizaciones, el dominio S es un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el dominio S es un producto químico. En determinada realización, el dominio S es una molécula pequeña.

En algunas realizaciones, el dominio S es un polipéptido seleccionado o derivado de una o más de las siguientes clases, incluyendo, pero sin limitación, un conector flexible, un marcador epitópico, una enzima, una proteasa, una nucleasa, un antígeno, una molécula de tipo anticuerpo, un ligando de un anticuerpo, un factor de crecimiento, una citocina, una quimiocina, un receptor del factor de crecimiento, un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, una secuencia de reconocimiento enzimático, una secuencia de reconocimiento de transpeptidasa, una secuencia de reconocimiento de proteasa, un dominio escindible, una inteína, una proteína de unión a ADN y una proteína de unión a ARN, una molécula reguladora del complemento, una molécula de cascada del complemento, una molécula de cascada de coagulación, un quelante, un dominio regulador del complemento, un dominio SCR, un dominio CCP, un dominio de inmunoglobulina o similar a la inmunoglobulina, una repetición armadillo, una cremallera de leucina, un dominio efector de muerte, una repetición de cadherina, una mano EF, un dominio de unión a fosfotirosina, un dominio de homología de pleckstrina, un dominio de homología 2 de SCR, un dominio de dedos de cinc, un péptido cíclico, un péptido de penetración celular.

En algunas realizaciones, el dominio S es una molécula no polipeptídica, por ejemplo, un ácido nucleico, un hidrato de carbono o una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el dominio S es un ácido nucleico seleccionado de una o más de las siguientes clases, incluyendo, pero sin limitación, un aptámero de ADN, un aptámero de ARN, un ARNip, un ARNhc, una sonda de ARN monocatenario, una sonda de ADN monocatenario, un ARNm, un

oligonucleótido químicamente modificado. En algunas realizaciones, el dominio S es una molécula pequeña seleccionada de una o más de las siguientes clases, incluyendo, pero sin limitación, un quelante, DOTA, un radionúclido, un isótopo, un agente de captura de imágenes, una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, un gas.

5 El dominio U

En algunas realizaciones, el dominio U es una proteína o un polipéptido. En otras realizaciones, el dominio U es un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el dominio U es un producto químico. En determinada realización, el dominio U es una molécula pequeña.

10 En algunas realizaciones, el dominio U es un polipéptido seleccionado o derivado de una o más de las siguientes clases, incluyendo, pero sin limitación, un conector flexible, un marcador epitópico, una enzima, una proteasa, una nucleasa, un antígeno, una molécula de tipo anticuerpo, un ligando de un anticuerpo, un factor de crecimiento, una citocina, una quimiocina, un receptor del factor de crecimiento, un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, una secuencia de reconocimiento enzimático, una secuencia de reconocimiento de transpeptidasa, una secuencia de reconocimiento de proteasa, un dominio escindible, una inteína, una proteína de unión a ADN y una proteína de unión a ARN, una molécula reguladora del complemento, una molécula de cascada del complemento, una molécula de cascada de coagulación, un quelante, un dominio regulador del complemento, un dominio SCR, un dominio CCP, un dominio de inmunoglobulina o similar a la inmunoglobulina, una repetición armadillo, una cremallera de leucina, un dominio efector de muerte, una repetición de cadherina, una mano EF, un dominio de unión a fosfotirosina, un dominio de homología de pleckstrina, un dominio de homología 2 de SCR, un dominio de dedos de cinc, un péptido cíclico, un péptido de penetración celular, un dominio de cinasa, un dominio de fosfatasa, una proteína citoesquelética, una proteína que interactúa con la proteína citoesquelética, un receptor acoplado a proteína G, una tirosina cinasa, un dominio ITIM, un dominio ITAM.

25 En algunas realizaciones, el dominio U es una molécula no polipeptídica, por ejemplo, un ácido nucleico, un hidrato de carbono o una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el dominio U es un ácido nucleico seleccionado de una o más de las siguientes clases, incluyendo, pero sin limitación, un aptámero de ADN, un aptámero de ARN, un ARNip, un ARNhc, una sonda de ARN monocatenario, una sonda de ADN monocatenario, un ARNm, un oligonucleótido químicamente modificado. En algunas realizaciones, el dominio U es una molécula pequeña seleccionada de una o más de las siguientes clases, incluyendo, pero sin limitación, un quelante, DOTA, un radionúclido, un isótopo, un agente de captura de imágenes, una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, un gas.

30 Ejemplos de polipéptidos antigénicos

Los ejemplos de polipéptidos antigénicos incluyen: el antígeno polipeptídico comprende glucoforina A con marcador epitópico HA en el extremo N; el antígeno polipeptídico comprende la secuencia líder de glucoforina A, marcador epitópico HA y la secuencia corporal de glucoforina A; el antígeno polipeptídico comprende el receptor 1 del complemento (CR1); el antígeno polipeptídico comprende la secuencia líder de CR1, marcador epitópico HA, la secuencia corporal de CR1; el antígeno polipeptídico comprende la secuencia líder de CR1, marcador epitópico HA, seis dominios SCR de LHR-A y LHR-B de CR1, los dos dominios SCR proximales de la membrana de CR1, la región transmembrana de CR1 y la región intracelular de CR1; el antígeno polipeptídico comprende la secuencia líder de CR1, marcador epitópico HA, nueve dominios SCR de LHR-A y LHR-B y LHR-C de CR1, los dos dominios SCR proximales de la membrana de CR1, la región transmembrana de CR1 y la región intracelular de CR1; el antígeno polipeptídico comprende la secuencia líder de CR1, LHR-A de CR1, LHR-B de CR1, LHR-C de CR1, los dos dominios SCR proximales de la membrana de CR1, la región transmembrana de CR1 y la región intracelular de CR1; el antígeno polipeptídico comprende secuencia líder de CR1, LHR-A de CR1, LHR-B de CR1, LHR-C de CR1, los dos dominios SCR proximales de la membrana de CR1, la región transmembrana y la región intracelular de glucoforina A; el antígeno polipeptídico comprende la secuencia líder de glucoforina A, un anticuerpo scFv contra el antígeno de la superficie de la hepatitis B (scFv), un conector flexible (Gly3Ser)₂, marcador epitópico HA y el cuerpo de glucoforina A; el antígeno polipeptídico comprende Kell, un conector flexible (Gly3Ser)₂, marcador epitópico HA y scFv; el antígeno polipeptídico comprende el marcador epitópico Kell y HA; el antígeno polipeptídico comprende un fragmento N-terminal de 71 aminoácidos de Kell y un marcador epitópico HA; el antígeno polipeptídico comprende un fragmento N-terminal de 71 aminoácidos de Kell, un conector flexible (Gly3Ser)₂ y un marcador epitópico HA; el antígeno polipeptídico comprende un fragmento N-terminal de 79 aminoácidos de Kell y un marcador epitópico HA; el antígeno polipeptídico comprende un fragmento N-terminal de 79 aminoácidos de Kell, un conector flexible (Gly3Ser)₂ y un marcador epitópico HA; el antígeno polipeptídico comprende un fragmento N-terminal de 71 aminoácidos de Kell, un conector flexible (Gly3Ser)₂, scFv y un marcador epitópico HA; el antígeno polipeptídico comprende un fragmento N-terminal de 79 aminoácidos de Kell, un conector flexible (Gly3Ser)₂, scFv y un marcador epitópico HA; el antígeno polipeptídico comprende la secuencia líder de CD55, scFv, un marcador epitópico HA y los 37 aminoácidos terminales de CD55; el antígeno polipeptídico comprende la secuencia líder de CD55, un marcador epitópico HA y el cuerpo de CD55. En una realización, el antígeno polipeptídico comprende la secuencia líder de CD59, scFv, un marcador epitópico HA y el cuerpo de CD59; el antígeno polipeptídico comprende la secuencia líder de CD59 y el marcador epitópico HA y el cuerpo de CD59; el antígeno polipeptídico comprende adenosina desaminasa y un marcador epitópico HA; el antígeno polipeptídico comprende fenilalanina hidroxilasa y un marcador epitópico HA; el antígeno polipeptídico comprende

adenosina desaminasa, un conector flexible (Gly3Ser)₂, fenilalanina hidroxilasa y un marcador epitópico HA; el antígeno polipeptídico comprende glucoforina A, adenosina desaminasa en el extremo C citoplasmático y un marcador epitópico HA; el antígeno polipeptídico comprende glucoforina A, fenilalanina hidroxilasa en el extremo C citoplasmático y un marcador epitópico HA.

- 5 En determinadas realizaciones, el antígeno es capaz de interactuar con un macrófago. El polipéptido antigénico puede comprender uno o más de: el receptor del complemento (Rieu y col., *J. Cell Biol.* 127: 2081-2091 (1994)), el receptor depurador (Brewer y col., *Photochem. Photobiol.* 69: 345-352 (1999)), el receptor de transferrina (Dreier y col., *Bioconjug. Chem.* 9: 482-489 (1998); Hamblin y col., *J. Photochem. Photobiol.* 26: 4556 (1994)); el receptor de Fc (Rojanasakul y col., *Pharm. Res.* 11: 1731-1733 (1994)); y el receptor de manosa (Frankel y col., *Carbohydr. Res.* 300: 251-258 (1997); Chakrabarty y col., *J. Protozool.* 37: 358-364 (1990)).

- 10 Otros antígenos capaces de interactuar con un macrófago incluyen: lipoproteínas de baja densidad (Mankertz y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 112-115 (1997); von Baeyer y col., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 31: 382-386 (1993)), lipoproteínas de muy baja densidad (Tabas y col., *J. Cell Biol.* 115: 1547-1560 (1991)), restos de manosa y otras fracciones de hidratos de carbono (Pittet y col., *Nucl. Med. Biol.* 22: 355-365 (1995)), moléculas policatiónicas, tales como poli-L-lisina (Hamblin y col., *J. Photochem. Photobiol.* 26: 45-56 (1994)), liposomas (Bakker-Woudenberg y col., *J. Drug Target.* 2: 363-371 (1994); Betageri y col., *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 48-53 (1993)) y 2-macroglobulina (Chu y col., *J. Immunol.* 152: 1538-1545 (1994)).

- 15 En el presente documento se proporcionan composiciones que contienen CHD que comprenden un antígeno que tiene actividades funcionales que i) no están presentes en las CHD nativas del mismo linaje o ii) están presentes en las CHD nativas del mismo linaje en niveles reducidos o niveles de actividad reducidos en comparación con las CHD que comprende el antígeno. Dichas actividades funcionales incluyen inhibición del complemento, aclaramiento de inmunocomplejos, presentación de antígenos artificiales, modulación de la cascada de coagulación, transferencia de oxígeno, suministro de fármacos, adsorción de citotoxina, evitación de la fagocitosis y extensión del tiempo en circulación.

- 20 En algunas realizaciones, las CHD tienen niveles mayores de un polipéptido receptor del complemento, tales como CR1, que las CHD nativas del mismo linaje en virtud de que comprenden un antígeno CR-1. En una realización alternativa, las CHD que comprenden un antígeno tienen niveles mayores de un polipéptido agonista del receptor del complemento o un polipéptido asociado al complemento que las CHD nativas del mismo linaje, incluyendo, pero sin limitación, los polipéptidos enumerados en la tabla 6 y la tabla 8. El polipéptido antigénico del receptor del complemento comprende un polipéptido del receptor-1 del complemento (CR1) humano, variante o fragmento funcional de los mismos. El polipéptido antigénico CR1 puede proceder de uno o más de uno de los alelos nativos de CR1, p. ej., el alelo A (también denominado alelo F o alelo CR1*1), el alelo B (también denominado alelo S o alelo CR1*2), el alelo C (también denominado alelo F' o alelo CR1*3) o el alelo D (también denominado alelo CR1*4). Las secuencias y los números de referencia de la base de datos para estas formas nativas se proporcionan en la tabla 3. En algunas realizaciones, el polipéptido antigénico CR1 contiene un dominio de un polipéptido CR1. Por ejemplo, el polipéptido CR1 puede comprender uno o más dominios de repeticiones de consenso cortas (SCR), también denominados módulos de proteína de control del complemento (CCP) o dominios Sushi, p. ej., número de referencia de Genbank AAV65577.1. En una realización, el polipéptido antigénico CR1 comprende una o más repeticiones de consenso cortas (SCR), p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o más de 44 SCR. En otra realización, el polipéptido antigénico CR1 comprende una o más unidades de repeticiones homólogas largas (LHR) de CR1, p. ej., LHR-A, LHR-B, LHR-C o LHR-D, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de 6 dominios LHR. En otra realización, el polipéptido antigénico CR1 puede comprender uno o más de un dominio extracelular de CR1 fusionados con otra proteína de la membrana celular, p. ej., glucoforina A, glucoforina B, glucoforina C, glucoforina D, kell, banda 3, acuaporina 1, glut 1, proteína antigénica Kidd, antígeno rhesus, incluyendo, pero sin limitación, los restos de la superficie celular enumerados en la tabla 1 y la tabla 6.

- 25 En algunas realizaciones, una CHD contiene un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido antigénico del receptor del complemento o, como alternativa o en combinación, un polipéptido antigénico agonista del receptor del complemento o polipéptido antigénico asociado al complemento incluyendo pero sin limitación, los polipéptidos y agonistas de los polipéptidos, enumerados en la tabla 8. En algunas realizaciones, las CHD contienen además un polipéptido factor de aceleración de la descomposición exógeno (CD59, GenBank: CAG46523.1) o un polipéptido cofactor de membrana exógeno (CD46, GenBank: BAA12224.1), o una variante o fragmento funcional de los mismos, o una combinación de los mismos.

- 30 Las actividades de CR1 incluyen la unión a inmunocomplejos que contienen C3b y el transporte de estos inmunocomplejos desde la circulación a macrófagos del hígado y el bazo del sistema reticuloendotelial. Al encontrarse con células del sistema reticuloendotelial, el inmunocomplejo es endocitado por la célula fagocítica, pero el glóbulo rojo puede continuar con su circulación. La eliminación del inmunocomplejo da lugar en ocasiones a la escisión proteolítica de CR1 de la superficie del glóbulo rojo. Para medir la actividad de unión, se puede realizar un ensayo de unión *in vitro* entre CHD e inmunocomplejos. Para medir la conservación de la CHD, se puede realizar un ensayo de fagocitosis *in vitro* con células fagocíticas y CHD cargadas con inmunocomplejos. Para medir el aclaramiento *in vivo* de los inmunocomplejos circulantes al hígado, se puede realizar un ensayo de aclaramiento y biodistribución usando

inmunocomplejos radiomarcados.

Se proporcionan composiciones que contienen CHD que contienen un antígeno que comprende un polipéptido nativo a un nivel mayor que el de una célula hematopoyética del mismo linaje que no comprende el polipéptido antigénico. Por ejemplo, las poblaciones de CHD contienen antígenos, tales como niveles del receptor 1 del complemento al menos aproximadamente 1,1, p. ej., 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10 000 o más de 10 000 veces mayor que las células hematopoyéticas correspondientes del mismo linaje que carecen del polipéptido antigénico CR1. Los niveles de CR1 en reticulocitos y eritrocitos se encuentran normalmente entre 50 y 2000 moléculas por célula (Lach-Trifileff, J Immunol 1999, 162: 7549). Se proporcionan composiciones que contienen poblaciones de CHD con niveles de CR1 de al menos aproximadamente 2500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10 000, 15 000, 20 000, 25 000, 30 000, 40 000, 50 000, 100 000, 200 000, 300 000, 400 000, 500 000, 600 000, 700 000, 800 000, 900 000, 1 000 000 o más de 1 000 000 moléculas por célula. Los niveles de CR1 en las CHD que expresan antígenos de tipo silvestre y exógenos se pueden medir y cuantificar mediante, por ejemplo, citometría de flujo con anticuerpos específicos para CR1.

Se proporcionan en el presente documento, en algunas realizaciones, CHD que comprenden un antígeno, poblaciones de CHD que comprenden un antígeno y composiciones de CHD que comprenden un antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno interactúa con un patógeno circulante, tal como un virus o una bacteria. En algunas realizaciones, la CHD expresa un gen recombinante que codifica un anticuerpo, scFv o nanocuerpo específico para el patógeno circulante. El anticuerpo, scFv o nanocuerpo puede expresarse como una proteína de fusión. En otras realizaciones, el anticuerpo, scFv o antígeno de nanocuerpo u otro antígeno con afinidad por los patógenos circulantes se carga en o sobre la CHD. El anticuerpo, scFv o antígeno de nanocuerpo o el otro antígeno con afinidad por los patógenos circulantes pueden localizarse intracelular o extracelularmente. En algunas realizaciones, el antígeno es específico para un antígeno vírico o bacteriano, tal como un antígeno de superficie, envoltura o cápside.

Se proporcionan en el presente documento, en determinadas realizaciones, CHD que comprenden un antígeno, poblaciones de CHD que comprenden un antígeno y composiciones de CHD que comprenden un antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno interactúa con una toxina, preferentemente una toxina extraña, tal como procedente de un patógeno o de otro medio del medio ambiente. En algunas realizaciones, la CHD expresa un gen recombinante que codifica un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP), proteína bactericida/que aumenta la permeabilidad (BPI), componente amiloide P o una proteína catiónica. Los antígenos de unión a toxina pueden expresarse como una proteína de fusión. En otras realizaciones, los antígenos de unión a toxina pueden cargarse en la CHD. Los antígenos de unión a toxina pueden localizarse intracelular o extracelularmente. En algunas realizaciones, el antígeno de unión a la toxina es específico de una toxina bacteriana tal como botulínica o del carbunco.

Además, las CHD que expresan antígenos exógenos pueden expresar un antígeno capaz de mejorar su capacidad para inmovilizar una diana. Los posibles antígenos de potenciación de la inmovilización incluyen los transportadores de polipéptidos incluyendo, pero sin limitación, los de la tabla 1.

En una realización, el antígeno comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos procedente del receptor de antígeno de Duffy para quimiocinas (DARC). En una realización, la CHD expresa un gen recombinante que codifica una secuencia de aminoácidos procedente del receptor de antígeno de Duffy para quimiocinas (DARC). El antígeno DARC puede expresarse como una proteína de longitud completa o un fragmento de la misma. DARC se puede expresar como una proteína de fusión. En otras realizaciones, la proteína DARC se carga en o sobre la CHD. En algunas realizaciones, el DARC cargado se funcionaliza adicionalmente o se modifica de otro modo. La molécula de antígeno DARC puede localizarse intracelular o extracelularmente.

DARC se identificó como un potente receptor de quimiocinas de múltiples ligandos. DARC pertenece a la familia de proteínas transmembrana de siete hélices de tipo rodopsina. Además de los eritrocitos, el DARC se expresa en células endoteliales venulares poscapilares, que son el sitio principal de transmigración de leucocitos en la mayoría de los tejidos. DARC proporciona un sitio de unión muy específico para quimiocinas tanto CC como CXC. Se cree que DARC posee una mayor afinidad por las quimiocinas CXC del motivo ELR. Las quimiocinas CXC son quimioatrayentes de neutrófilos y potencialmente pueden ser proangiogénicas.

La interacción entre DARC y CXCL8 ha demostrado una constante de disociación (K_d) de 5 nmol/l y los sitios de unión al receptor se estiman en 1000-9000 por eritrocito (Hadley, Blood, 1997). A diferencia de otros receptores de quimiocinas de siete dominios transmembrana, DARC carece del motivo de acoplamiento de proteína G muy conservado ubicado en el segundo bucle citoplasmático (Meny, Immunohematology, 2010). DARC no está acoplado a proteína G y no tiene ningún mecanismo de señalización alternativo conocido. La función biológica de DARC no se comprende completamente. Se cree que DARC es a) multiespecífico; b) incapaz de iniciar las señales intracelulares y c) se cree que las quimiocinas unidas a la superficie de los eritrocitos son inaccesibles para sus células inflamatorias diana normales (Neote, J Biol Chem, 1993). Los eritrocitos pueden desempeñar una función en la regulación de los procesos inflamatorios a través de la presencia de DARC.

Moléculas de señalización inflamatoria, tales como citocinas, puede desencadenar daño tisular local y sistémico

cuando están presentes en altas concentraciones. Los brotes de citocinas están implicados en la patogenia de la septicemia bacteriana, artritis reumatoide y varias otras enfermedades inflamatorias. Las CHD modificadas que expresan de forma exógena receptores de citocinas naturales o miméticos de receptores de tipo anticuerpo sintéticos pueden inmovilizar las citocinas inflamatorias. Un receptor de quimiocinas ilustrativo es DARC. Se proporcionan en el presente documento CHD que comprenden un antígeno que es un receptor de citocinas o un receptor de quimiocinas, incluyendo, pero sin limitación, DARC. Por ejemplo, las CHD que expresan el antígeno DARC (aumentando de este modo la cantidad presente en los eritrocitos nativos) pueden usarse para modular los niveles de quimiocinas en la circulación y/o dentro de los tejidos periféricos del cuerpo. Las CHD que comprenden un antígeno DARC pueden marcarse para su destrucción o pueden liberar lentamente los mediadores inflamatorios de vuelta a la circulación, pero a una concentración baja y difusa. La CHD que comprende un antígeno que comprende un receptor de quimiocinas o citocinas puede actuar como un depósito para péptidos de transducción de señales.

En una realización, el antígeno comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de un anticuerpo. En una realización, la CHD expresa un gen recombinante que codifica una secuencia de aminoácidos procedente de un anticuerpo. El antígeno del anticuerpo puede expresarse como una proteína de longitud completa o un fragmento de la misma. El anticuerpo puede expresarse como una proteína de fusión. En otras realizaciones, la proteína del anticuerpo se carga en o sobre la CHD. En algunas realizaciones, el anticuerpo cargado se funcionaliza adicionalmente o se modifica de otro modo. El antígeno del anticuerpo puede localizarse intracelular o extracelularmente. En una realización, el antígeno comprende una secuencia de aminoácidos del anticuerpo que es específica para una diana deseada. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un scFv. En otras realizaciones, el anticuerpo es un nanocuerpo.

En determinadas realizaciones, las CHD comprenden un antígeno que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo que es específico para una diana y está ubicado en la superficie celular. Por ejemplo, un fragmento variable (Fv) de un anticuerpo específico para la unión a la toxina botulínica se expresa en la superficie de la CHD. Se conocen en la técnica anticuerpos de unión a la toxina botulínica (Amersdorfer, *Inf and Immunity*, 1997), así como la expresión de la parte Fv de un anticuerpo (Hoedemaeker, *Journ of Bio Chemistry*, 1997). Tras la unión, la toxina es retenida por la CHD a través de la región Fv, se inmoviliza y se transporta a través del sistema circulatorio al hígado para su eliminación del cuerpo.

En una realización, el antígeno comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de un anticuerpo scFv. En una realización, la CHD expresa un gen recombinante que codifica una secuencia de aminoácidos procedente de un anticuerpo scFv. El antígeno del anticuerpo scFv puede expresarse como una proteína de longitud completa o un fragmento de la misma. El anticuerpo scFv puede expresarse como una proteína de fusión. En otras realizaciones, la proteína scFv se carga en o sobre la CHD. Los polipéptidos antigénicos scFv adecuados que pueden ser expresados por CHD incluyen, pero sin limitación, los enumerados en la tabla 6.

Los anticuerpos scFv se han construido principalmente a partir del hibridoma, células del bazo de ratones inmunizados y linfocitos B del ser humano. La región variable de un anticuerpo está formada por el heterodímero no covalente de los dominios variables de los dominios V(H) y V(L), que después se puede usar en la construcción de un anticuerpo scFv recombinante.

La producción de scFv es conocida en la técnica y requiere que el ARNm se aísle primero del hibridoma (o también del bazo, las células linfáticas y la médula ósea) seguido de la transcripción inversa en ADNc para que actúe como un molde para la amplificación de genes de anticuerpos (PCR). Con este procedimiento, se pueden crear grandes bibliotecas con un conjunto diverso de scFv derivados de anticuerpos (un conjunto comparable al de los anticuerpos originales a partir de los cuales se modelan los scFv).

El antígeno scFv puede hacerse específico para cualquier molécula diana, incluyendo, pero sin limitación, la de la tabla 4.

En un ejemplo, un antígeno scFv específico para la toxina del carbunco puede expresarse en una CHD. Tras la administración a un sujeto que lo necesite, se puede usar una dosis eficaz de una población de CHD que comprende una molécula de antígeno específica para la toxina del carbunco, para capturar e inmovilizar la toxina del carbunco. La CHD migra al hígado en el que se produce la eliminación.

En determinadas realizaciones, los eritrocitos comprenden un antígeno que comprende un nanocuerpo procedente de camélido expresado en la superficie de la célula. Los nanocuerpos son habitualmente de 12-15 kDa. Son considerablemente más pequeños que los anticuerpos y scFv. Por tanto, los nanocuerpos pueden ser más fáciles de transfectar y el antígeno del nanocuerpo se expresará más fácilmente, se traducirá y/o se transportará a la superficie celular en una CHD. En determinadas realizaciones, los antígenos de nanocuerpos se emplean para minimizar los efectos inmunogénicos provocados por un antígeno específico. Los nanocuerpos, debido a su pequeño tamaño, ofrecerán un potencial inmunogénico reducido. En determinadas realizaciones, se emplean nanocuerpos antigénicos porque limitan los cambios en el comportamiento mecánico y morfológico de la membrana plasmática de la CHD. Esto puede permitir que la CHD presente un comportamiento normal de los glóbulos rojos circulatorios. En determinadas realizaciones, se emplean nanocuerpos de antígeno porque tienen una mayor capacidad para reconocer epítomos ocultos o poco habituales en comparación con los anticuerpos convencionales. Por ejemplo, pueden unirse a

pequeñas cavidades enzimáticas de una diana y modular el comportamiento molecular de la diana.

En determinadas realizaciones, las CHD comprenden nanocuerpos antigénicos con especificidad por epítomos diana de moléculas en el sistema del complemento humano. Dichas CHD se pueden administrar a un sujeto que lo necesite para agotar selectivamente uno o más factores hiperactivos del sistema del complemento. Por ejemplo, C5 puede ser dirigido por CHD que comprenden nanocuerpos antigénicos con especificidad por epítomos diana de C5 y eliminado del sistema por las CHD tras la administración de las células a un sujeto. Este enfoque es adecuado para proporcionar un efecto terapéutico, p. ej., para un trastorno del complemento, como hemoglobinuria paroxística nocturna. En determinadas realizaciones, las CHD comprenden nanocuerpos antigénicos con especificidad por epítomos diana de moléculas, incluyendo, pero sin limitación, los enumerados en la tabla 4.

En algunas realizaciones, el antígeno comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de proteasas, nucleasas, amilasa, liasa (sacarasa) o hidrolasa (DNasa, lipasa). En una realización, la CHD expresa un gen recombinante que codifica una secuencia de aminoácidos procedente de proteasas, nucleasas, amilasa, liasa (sacarasa) o hidrolasa (DNasa, lipasa). Pueden expresarse proteasas, nucleasas, amilasas, liasas e hidrolasas antigénicas como una proteína de longitud completa o un fragmento de la misma. Pueden expresarse proteasas, nucleasas, amilasas, liasas e hidrolasas antigénicas como una proteína de fusión. En otras realizaciones, se cargan proteasas, nucleasas, amilasas, liasas o hidrolasas antigénicas en o sobre la CHD. En algunas realizaciones, las proteasas, nucleasas, amilasas, liasas o hidrolasas antigénicas cargadas se funcionalizan adicionalmente o se modifican de otro modo. La molécula de antígeno de proteasa, nucleasa, amilasa, liasa o hidrolasa antigénica puede localizarse intracelular o extracelularmente.

En determinadas realizaciones, las CHD comprenden un antígeno que comprende una proteasa, una nucleasa, una amilasa, una liasa o una hidrolasa. La CHD que comprende una proteasa, una nucleasa, una amilasa, una liasa o una hidrolasa antigénica es capaz de degradar una diana en la CHD independientemente del aclaramiento circulatorio, p. ej., por macrófagos en el hígado. En determinadas realizaciones, las CHD que comprenden un antígeno que comprende una proteasa, una nucleasa, una amilasa, una liasa o una hidrolasa se pueden administrar a un sujeto que lo necesite para tratar un cáncer degradando selectivamente los metabolitos que son esenciales para el crecimiento de las células cancerosas. Por ejemplo, se usa asparaginasa para disminuir los niveles locales de asparagina para tratar la leucemia linfoblástica aguda y la leucemia mieloide aguda. Los antígenos adecuados pueden, p. ej., comprender una o ambas de las dos clases principales de enzimas capaces de degradar las moléculas diana, liasas e hidrolasas. En determinadas realizaciones, se proporcionan CHD que comprenden un antígeno que comprende una molécula, incluyendo, pero sin limitación, los enumerados en la tabla 6.

En determinadas realizaciones, los eritrocitos comprenden un antígeno que comprende una liasa. En una realización, la liasa es valina descarboxilasa. El antígeno de valina descarboxilasa se puede expresar dentro del espacio intracelular de la CHD. Las CHD que comprenden un antígeno de valina descarboxilasa se pueden administrar a un sujeto que lo necesite para modular los niveles de valina en la sangre. Las CHD que comprenden un antígeno de valina descarboxilasa son adecuadas para tratar la valinemia, un trastorno hereditario que aumenta los niveles del aminoácido valina en la sangre. Los individuos aquejados desarrollan normalmente vómitos, retraso del desarrollo, discapacidad intelectual y fatiga. La valinemia está provocada por una deficiencia de la enzima valina transaminasa y tiene un patrón de herencia autosómico recesivo.

En determinadas realizaciones, los eritrocitos comprenden un antígeno que comprende una hidrolasa. En una realización, la hidrolasa es desoxirribonucleasa I (DNasa I). El antígeno de DNasa I se puede expresar en la superficie de la CHD. Las CHD que comprenden un antígeno de DNasa I se pueden administrar a un sujeto que lo necesite para escindir preferentemente el ADN circulante en los enlaces fosfodiéster adyacentes a un nucleótido de pirimidina, produciendo polinucleótidos terminados en 5'-fosfato con un grupo hidroxilo libre en la posición 3'. En promedio, se producen tetranucleótidos. Las CHD que comprenden un antígeno de DNasa I son adecuadas para tratar afecciones agravadas por altos niveles de ADN inmunogénico en circulación, tales como lupus eritematoso sistémico (LES).

En determinadas realizaciones, el antígeno es capaz de responder a un estímulo externo, p. ej., tras su unión a un ligando o entrar en contacto con el estímulo, en el que la respuesta implica, por ejemplo, movimiento, replegamiento, cambio de conformación, formación de un dímero, formación de un homodímero, formación de un heterodímero, formación de un multímero, transducción de una señal, emisión de energía en una forma detectable (p. ej., fluorescencia), interacción funcional con otro antígeno, o interacción funcional con un polipéptido antigénico no exógeno.

Dianas

En el presente documento se proporcionan CHD que expresan antígenos exógenos que comprenden un polipéptido antigénico exógeno capaz de interactuar con una diana. También se proporcionan en el presente documento CHD que expresan antígenos exógenos que comprenden un antígeno exógeno no polipeptídico capaz de interactuar con una diana. Las CHD que expresan antígenos exógenos se pueden administrar a un sujeto que lo necesite para modular la cantidad o concentración de una diana que reside en el sistema circulatorio del sujeto. Puede elegirse un antígeno exógeno adecuado para interactuar con una diana específica. Las dianas adecuadas incluyen entidades que están asociadas con una enfermedad, trastorno o afección específicos. Sin embargo, las dianas también pueden elegirse

independientemente de una enfermedad, trastorno o afección específicos.

En algunas realizaciones, la diana es un anticuerpo o una molécula de tipo anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo autoinmunitario o autoanticuerpo, o un anticuerpo extraño o un anticuerpo terapéutico, incluyendo, pero sin limitación, p. ej., un anticuerpo contra la glucoproteína 1 beta-2, un anticuerpo contra el antígeno I/i, un anticuerpo contra el dominio NC1 del colágeno a3(IV), un anticuerpo contra una glucoproteína plaquetaria, un anticuerpo contra el receptor de fosfolipasa A2, un anticuerpo contra la glucoforina A, B, o C de eritrocitos o un anticuerpo contra el antígeno Rh de eritrocitos.

En algunas realizaciones, la diana es una molécula de la cascada del complemento, por ejemplo, C1, C1r, C1s, C1q, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4b, C4a, C3bBb, C3bBb3b, C4b2b, C4b2b3b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, poli-C9, complejo de ataque a la membrana factor B, factor D, properdina, C3, C3a, C3b, iC3b, C3c, C3dg, C3dk, C3e, Bb, factor I, C1q, C1r, C1s, C4, C4a, C4b, C2, C4bp, lectina de unión a manosa (MBL), serina proteasa 1 asociada a MBL (MASP1), serina proteasa 2 asociada a MBL (MASP2), C5, C5a, C6, C7, C8, C9, CR1, CR2, CR3, CR4, C3aR, C3eR, factor de aceleración de la descomposición (DAF), proteína cofactor de membrana (MCP), CD59, receptor de cadena Beta C3, inhibidor de C1, proteína de unión a C4, factor I, factor H.

En algunas realizaciones, la diana es un inmunocomplejo, por ejemplo, un inmunocomplejo IgG, un inmunocomplejo IgA, un inmunocomplejo IgM.

En algunas realizaciones, la diana es una placa amiloide, por ejemplo, una placa comprendida por amiloide beta, IAPP (amilina), alfa-sinucleína, PrPSc, huntingtina, calcitonina, factor natriurético auricular, apolipoproteína AI, amiloide A sérico, medina, prolactina, transtiretina, lisozima, microglobulina beta 2, gelsolina, queratoepitelina, cistatina, cadena ligera de inmunoglobulina AL, S-IBM.

En algunas realizaciones, la diana es una bacteria, por ejemplo, *Enterococcus*, *Streptococcus* o *Mycobacteria*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria meningitides*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Legionella*, *Vibrio cholerae*, estreptococos, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacteria diphtheriae*, *Clostridium* spp., *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Bacillus anthracis*. Otros patógenos para los que se ha detectado bacteriemia en algún nivel incluyen los siguientes: *Rickettsia*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Coxiella burnetii*, clamidia, *Mycobacterium leprae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Treponema pallidum*, *Leptospira*, *Borrelia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Francisella*, *Brucella melitensis*, *Campylobacter jejuni*, *Enterobacter*, *Proteus mirabilis*, *Proteus*; y *Klebsiella pneumoniae*.

En algunas realizaciones, la diana es un virus, incluyendo, pero con limitación, aquellos cuya infección implica la inyección de material genético en células huésped tras la unión a receptores de superficie celular, virus cuya infección está mediada por receptores de superficie celular. Se pueden seleccionar ejemplos no limitantes de estos virus de *Paramyxoviridae* (p. ej., neumovirus, morbilivirus, metaneumovirus, respirovirus o rubulavirus), *Adenoviridae* (p. ej., adenovirus), *Arenaviridae* (p. ej., arenavirus tal como el virus de la coriomeningitis linfocítica), *Arteriviridae* (p. ej., virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino o virus de la arteritis equina), *Bunyaviridae* (p. ej., flebovirus o hantavirus), *Caliciviridae* (p. ej., virus Norwalk), *Coronaviridae* (p. ej., coronavirus o torovirus), *Filoviridae* (p. ej., virus similares al Ébola), *Flaviviridae* (p. ej., hepacivirus o flavivirus), *Herpesviridae* (p. ej., simplexvirus, varicelovirus, citomegalovirus, roseolovirus o linfocriptovirus), *Orthomyxoviridae* (p. ej., virus de la gripe o togotovirus), *Parvoviridae* (p. ej., parvovirus), *Picornaviridae* (p. ej., enterovirus o hepatovirus), *Poxviridae* (p. ej., ortopoxvirus, avipoxvirus o leporipoxvirus), *Retroviridae* (p. ej., lentivirus o espumavirus), *Reoviridae* (p. ej., rotavirus), *Rhabdoviridae* (p. ej., lisavirus, novirhabdovirus o vesiculovirus) y *Togaviridae* (p. ej., alfavirus o rubivirus). Los ejemplos específicos de estos virus incluyen coronavirus respiratorio humano, virus de la gripe A-C, virus de la hepatitis A a G y virus del herpes simple 1-9.

En algunas realizaciones, la diana es un parásito, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, parásitos intestinales o transmitidos por la sangre, protozoos, tripanosomas; hemoprotozoos y parásitos capaces de provocar paludismo; cestodos entéricos y sistémicos, incluyendo cestodos ténidos; coccidios entéricos; protozoos flagelados entéricos; nematodos filariales; nematodos y anquilostomas gastrointestinales y sistémicos.

En algunas realizaciones, la diana es un hongo, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus*, *T. glabrata*, *Candida tropicalis*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*.

En algunas realizaciones, la diana es una toxina bacteriana, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, toxina AB, toxina alfa, toxina del carbunco, bacteriocina, toxina botulínica, citolisina dependiente del colesterol, toxina de *Clostridium botulinum* C3, toxina A de *Clostridium difficile*, toxina B de *Clostridium difficile*, enterotoxina de *Clostridium*, toxina alfa de *Clostridium perfringens*, toxina beta de *Clostridium perfringens*, factor de cordón, Cry1Ac, criptocina, endotoxina delta, toxina diftérica, enterotoxina de tipo B, toxina eritrogénica, exfoliatina, hemolisina E, enterotoxina termolábil, enterotoxina termoestable, hemolisina, leucocidina, lipopolisacárido, listeriolisina O, microcina, leucocidina de Pantón-Valentine, isla de patogenicidad, modulina soluble en fenol, neumolisina, toxina formadora de poros, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina RTX, sakacina, toxina alfa de *Staphylococcus aureus*, toxina beta de

Staphylococcus aureus, toxina delta de *Staphylococcus aureus*, estreptolisina, simplocamida A, tabtoxina, tetanolisina, tetanospasmina, citolisina activada por tiol, tolasina, toxina del síndrome de choque tóxico, toxoflavina, dimicolato de trehalosa, verocitotoxina y vibriocina.

5 En algunas realizaciones, la diana es una proteína priónica, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, PRP, PRPc, PRPsc, PRPres.

10 En algunas realizaciones, la diana es una citocina o una quimiocina o un factor de crecimiento, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, proteína estimulante de la acilación, adipocina, albinterferón, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, factor estimulante de colonias, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL9, eritropoyetina, Gc-MAF, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, factor de crecimiento de hepatocitos, familia de IL 10, familia de IL 17, IL1A, IL1B, interferón, interferón beta 1a, interferón beta 1b, interferón gamma, interferón de tipo I, interferón de tipo II, interferón de tipo III, interleucina, familia de la interleucina 1, antagonista del receptor de interleucina 1, interleucina 10, interleucina 12, subunidad beta de interleucina 12, interleucina 13, interleucina 16, interleucina 2, interleucina 23, subunidad alfa de interleucina 23, interleucina 34, interleucina 35, interleucina 6, interleucina 7, interleucina 8, interleucina 36, factor inhibidor de la leucemia, factor promotor de leucocitos, linfocina, linfotoxina alfa, linfotoxina beta, factor estimulante de colonias de macrófagos, proteína inflamatoria de macrófagos, factor activador de macrófagos, monocina, miocina, mionectina, nicotinamida fosforribosiltransferasa, oncostatina M, oprelvekina, factor plaquetario 4, citocina proinflamatoria, promegapoyetina, RANKL, factor 1 derivado de células estromales, talimogén laherparepvec, factor de necrosis tumoral alfa, factores de necrosis tumoral, XCL1, XCL2, XCR1, angiopoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos básico, betacelulina, proteína morfogenética ósea, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteína de señalización intercelular CCN, CTGF, darbepoyetina alfa, endoglina, factor de crecimiento epidérmico, epoyetina alfa, epoyetina beta, eritropoyetina, FGF15, FGF15/19, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos 23, filgrastim, factor de maduración GLIA, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, factor de diferenciación del crecimiento-9, heberprot-P, factores de crecimiento hematopoyéticos, factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor insulínico de crecimiento, factor insulínico de crecimiento 1, factor insulínico de crecimiento 2, factor de crecimiento de queratinocitos, miostatina, factor de crecimiento nervioso, neurotrofina-3, neurotrofina-4, oncomodulina, osteopromotor, palifermina, PDGFB, factor de crecimiento placentario, gránulo alfa de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, índice proliferativo, trombopoyetina, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento endotelial vascular.

35 En algunas realizaciones, la diana es una molécula pequeña, por ejemplo, un producto químico, un aminoácido, un átomo, un elemento, un ácido orgánico, <2000 Da, <1000 Da, <500 Da, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, hierro, cobre, calcio, potasio, etanol, metanol, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, cisteína, selenocisteína, treonina, metionina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina, lisina, arginina, aspartato, glutamato, asparagina, glutamina.

En algunas realizaciones, la diana es un lípido, complejo lipídico, complejo proteolipídico o colesterol, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, LDL, VLDL, HDL, HDL2B, triglicéridos, LP(a), colesterol.

40 En algunas realizaciones, la diana es una célula de mamífero, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, una célula humana, una célula circulante, una célula inmunitaria, un neutrófilo, un eosinófilo, un basófilo, un linfocito, un monocito, un linfocito B, un linfocito T, un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+, un linfocito T gamma-delta, un linfocito T regulador, un linfocito citolítico natural, un linfocito T citolítico natural, un macrófago, una célula de Kupffer, una célula dendrítica, una célula cancerosa, una célula madre cancerosa, una célula tumoral circulante, una célula cancerosa de uno de los siguientes cánceres, incluyendo, pero sin limitación, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), cáncer anal, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de intestino, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de origen primario desconocido, cáncer extendido a los huesos, cáncer extendido al cerebro, cáncer extendido al hígado, cáncer extendido al pulmón, carcinoide, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide crónica (LMC), cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de ojo, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores trofoblásticos gestacionales (TTG), tricoleucemias, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, cáncer de piel melanoma, mesotelioma, cáncer masculino, embarazo molar, cáncer de boca y orofaringe, mieloma, cánceres nasales y de los senos nasales, cáncer de nasofaringe, linfoma no hodgkiniano (NHL), cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de próstata, cánceres raros, cáncer rectal, cáncer de glándula salival, cánceres secundarios, cáncer de piel (distinto de melanoma), sarcoma de tejido blando, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer primario desconocido, cáncer de útero, cáncer de vagina y cáncer de vulva.

Expresión, conjugación, y carga de antígenos

60 En determinadas realizaciones, el antígeno polipeptídico se expresa dentro de la CHD que expresa antígeno exógeno. El antígeno polipeptídico puede presentarse en la superficie de la CHD que expresa antígeno exógeno o puede residir

dentro de la CHD que expresa antígeno exógeno.

En determinadas realizaciones, el antígeno polipeptídico se conjuga con la CHD que expresa antígeno exógeno. El antígeno polipeptídico normalmente se conjuga con la superficie de la CHD que expresa antígeno exógeno. La conjugación se puede lograr química o enzimáticamente, mediante procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. Los antígenos no polipeptídicos también se pueden conjugar con una CHD que expresa antígeno exógeno. En algunas realizaciones, el antígeno no está conjugado con la CHD que expresa antígeno exógeno.

En determinadas realizaciones, el antígeno polipeptídico se carga en la CHD que expresa antígeno exógeno. Los antígenos no polipeptídicos también pueden cargarse dentro de una CHD que expresa antígeno exógeno. En algunas realizaciones, el antígeno no se carga en ni sobre la CHD que expresa antígeno exógeno.

En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno comprende un antígeno que se expresa opcionalmente a partir de un ácido nucleico recombinante, conjugado con la CHD, cargado en o sobre la CHD y cualquier combinación de los mismos. Opcionalmente, la CHD que expresa antígeno exógeno comprende un agente terapéutico u otra carga útil.

En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno se genera mediante el contacto de una célula aislada adecuada, p. ej., una CHD, un reticulocito, un precursor de CHD, una plaqueta o un precursor plaquetario, con un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido antigénico. En algunas realizaciones, el polipéptido antigénico está codificado por un ADN, que se pone en contacto con una célula precursora de eritroide nucleada o una célula precursora de plaquetas nucleada. En algunas realizaciones, el polipéptido antigénico está codificado por un ARN, que se pone en contacto con una plaqueta, una CHD nucleada, una célula precursora de plaquetas nucleada o un reticulocito. En algunas realizaciones, el antígeno es un polipéptido, que se pone en contacto con una plaqueta primaria, una CHD nucleada, una célula precursora de plaquetas nucleadas, un reticulocito o un eritrocito.

Un polipéptido antigénico puede expresarse a partir de un transgén introducido en una CHD por electroporación, transfección química o polimérica, transducción vírica, rotura mecánica de la membrana u otro procedimiento; un polipéptido antigénico que se expresa a partir de ARNm que se introduce en una célula por electroporación, transfección química o polimérica, transducción vírica, rotura mecánica de la membrana u otro procedimiento; un polipéptido antigénico que se sobreexpresa a partir del locus nativo mediante la introducción de un factor externo, p. ej., un activador de la transcripción, represor de la transcripción o potenciador de la ruta secretora; y/o un polipéptido antigénico que se sintetiza, extrae o produce a partir de una célula de producción u otro sistema externo e incorporado en la CHD.

En algunas realizaciones, el antígeno es una proteína de longitud completa. En algunas realizaciones, el antígeno está comprendido por uno o más polipéptidos contenidos en la proteína de longitud completa, de cualquier longitud superior a aproximadamente 7 aminoácidos. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más de 20 aminoácidos, p. ej., 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 aminoácidos. Los polipéptidos que comprenden el antígeno pueden comprender uno o más epítomos inmunológicos que pueden ser epítomos conformacionales o pueden ser epítomos lineales. El antígeno puede estar comprendido por uno o más polipéptidos de una o más proteínas diferentes.

El antígeno de interés se puede expresar en la célula circulante mediante fusión con una proteína celular endógena, incluyendo, pero sin limitación, las enumeradas en la tabla B y la tabla C. La fusión con una proteína endógena puede ser necesaria porque se cree que durante el proceso natural de diferenciación y desnucleación, la CHD desprende y descarta muchas de las proteínas endógenas necesarias para la eritropoyesis, pero no para la función de los eritrocitos maduros, tales como, p. ej., c-Kit (receptor SCF) y transferrina. Véase, p. ej., Keerthivasan y col., *Stem Cells International* 2011; Migliaccio, *Haematologica* 2010. Las proteínas que se conservan incluyen determinadas proteínas de membrana tales como, p. ej., glucoforina A, banda 3 y acuaporina; determinadas proteínas citoplasmáticas tales como, p. ej., hemoglobina alfa, hemoglobina beta y adenosina desaminasa; y proteínas citoesqueléticas.

El antígeno de interés se puede expresar en el espacio intracelular de la CHD mediante varios procedimientos, incluyendo expresión directa del transgén, fusión con una proteína intracelular endógena tal como, p. ej., hemoglobina, fusión con el dominio intracelular de proteínas endógenas de superficie celular tales como, p. ej., banda 3, glucoforina A, Kell o fusión con un componente estructural del citoesqueleto eritroide.

El antígeno de interés se puede expresar en la superficie extracelular de la CHD mediante varios procedimientos, incluyendo expresión directa del transgén si contiene un dominio transmembrana u otro dominio de unión a la membrana, fusión con una proteína de la membrana eritroide endógena o el dominio transmembrana de dicha proteína tal como, p. ej., banda 3, glucoforina A o Kell; o fusión con el péptido aceptor del conector GPI de una proteína de la superficie celular unida a GPI eritroide endógena tal como, p. ej., acetilcolinesterasa, CD55, CD58 o CD59 (véase, p. ej., Kooyman y col., *Science* 1995).

El antígeno de interés se puede conjugar con la superficie de una CHD cultivada mediante diversos medios químicos y enzimáticos, incluyendo, pero sin limitación, los enumerados en la tabla D, tabla D1 y tabla E. Estos procedimientos incluyen la conjugación química con agentes reticulantes bifuncionales tales como, p. ej., un reticulante

heterobifuncional de éster-maleimida de NHS para conectar un grupo amina primario con un grupo tiol reducido. Estos procedimientos también incluyen estrategias enzimáticas tales como, p. ej., reacción de transpeptidasa mediada por una enzima sortasa para conectar un polipéptido que contiene la secuencia aceptora LPXTG o LPXTA con un polipéptido que contiene la secuencia donante N-terminal GGG, véase, p. ej., Swee y col., PNAS 2013. Los procedimientos también incluyen procedimientos de combinación, tales como, p. ej., conjugación mediada por sortasa de asas de química clic (una azida y un alquino) en el antígeno y la célula, respectivamente, seguido de una reacción de cicloadición para unir químicamente el antígeno a la célula, véase, p. ej., Neves y col., Bioconjugate Chemistry, 2013.

Si se desea, se puede expresar un dominio polipeptídico formador de enlaces catalíticos en o sobre una CHD, ya sea intracelular o extracelularmente. Existen muchos polipéptidos formadores de enlaces catalíticos, incluyendo transpeptidasas, sortasas e isopeptidasas, incluyendo los derivados de Spy0128, una proteína aislada de *Streptococcus pyogenes*.

Se ha demostrado que la división de la subunidad formadora de enlaces isopeptídicos autocatalíticos (dominio CnaB2) de Spy0128 da lugar a dos polipéptidos distintos que conservan la actividad catalítica con especificidad entre sí. Los polipéptidos de este sistema se denominan SpyTag y SpyCatcher. Tras mezclar, SpyTag y SpyCatcher experimentan formación de enlaces isopeptídicos entre Asp117 en SpyTag y Lys31 en SpyCatcher (Zakeri y Howarth, JACS 2010, 132: 4526). La reacción es compatible con el entorno celular y muy específica para la conjugación de proteína/péptido (Zakeri, B.; Fierer, J. O.; Celik, E.; Chittock, E. C.; Schwarz-Linek, U.; Moy, V. T.; Howarth, M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2012, 109, E690-E697). Se ha mostrado que SpyTag y SpyCatcher dirigen la modificación topológica postraducciona en una proteína similar a la elastina. Por ejemplo, la colocación de SpyTag en el extremo N y SpyCatcher en el extremo C dirige la formación de proteínas circulares similares a la elastina (Zhang y col., Journal of the American Chemical Society, 2013).

Los componentes SpyTag y SpyCatcher se pueden intercambiar de modo que un sistema en el que la molécula A se fusiona con SpyTag y la molécula B se fusiona con SpyCatcher es funcionalmente equivalente a un sistema en el que la molécula A se fusiona con SpyCatcher y la molécula B se fusiona con SpyTag. Para los fines del presente documento, cuando se usan SpyTag y SpyCatcher, debe entenderse que la molécula complementaria podría sustituirse en su lugar.

Un polipéptido formador de enlaces catalíticos, tal como un sistema SpyTag/SpyCatcher, se puede usar para unir un antígeno exógeno de interés a la superficie de una CHD. La secuencia polipeptídica de SpyTag se puede expresar en la superficie extracelular de la CHD. El polipéptido SpyTag puede estar, por ejemplo, fusionado con el extremo N de una proteína transmembrana de tipo 1 o tipo 3, p. ej., glucoforina A, fusionado con el extremo C de una proteína transmembrana de tipo 2, p. ej., Kell, insertado en marco en el extremo extracelular o en un bucle extracelular de una proteína de múltiples dominios transmembrana, p. ej., banda 3, fusionado con un polipéptido aceptor de GPI, p. ej., CD55 o CD59, fusionado con un polipéptido anclado a cadena lipídica o fusionado con una proteína de membrana periférica. La secuencia de ácido nucleico que codifica la fusión de SpyTag se puede expresar dentro de una CHD. Un antígeno exógeno de interés se puede fusionar con SpyCatcher. La secuencia de ácido nucleico que codifica la fusión SpyCatcher se puede expresar y secretar a partir de la misma CHD que expresa la fusión SpyTag. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico que codifica la fusión SpyCatcher se puede producir de forma exógena, por ejemplo, en un sistema de producción bacteriano, fúngico, de insecto, de mamífero o sin células. Tras la reacción de los polipéptidos SpyTag y SpyCatcher, se formará un enlace covalente que une el antígeno exógeno de interés a la superficie de la CHD.

En una realización, el polipéptido SpyTag puede expresarse como una fusión con el extremo N de la glucoforina A bajo el control del promotor Gata1 en una CHD. Un antígeno exógeno de interés, por ejemplo, los antígenos exógenos enumerados en la tabla F, tabla G, tabla H, tabla I y tabla J, fusionados con la secuencia polipeptídica de SpyCatcher se puede expresar bajo el control del promotor Gata1 en la misma CHD. Tras la expresión de ambos polipéptidos de fusión, se formará un enlace isopeptídico entre los polipéptidos SpyTag y SpyCatcher, formando un enlace covalente entre la superficie de CHD y el antígeno exógeno de interés.

En otra realización, el polipéptido SpyTag puede expresarse como una fusión con el extremo N de la glucoforina A bajo el control del promotor Gata1 en una CHD. Un antígeno exógeno de interés, por ejemplo, los antígenos exógenos enumerados en la tabla F, tabla G, tabla H, tabla I y tabla J, fusionado con la secuencia polipeptídica de SpyCatcher se puede expresar en un sistema de expresión celular de mamífero adecuado, por ejemplo, células HEK293. Tras la expresión del polipéptido de fusión SpyTag en la CHD, el polipéptido de fusión SpyCatcher se puede poner en contacto con la célula. En condiciones de reacción adecuadas, se formará un enlace isopeptídico entre los polipéptidos SpyTag y SpyCatcher, formando un enlace covalente entre la superficie de CHD y el antígeno exógeno de interés.

Un polipéptido formador de enlaces catalíticos, tal como un sistema SpyTag/SpyCatcher, se puede usar para anclar el antígeno exógeno de interés al espacio intracelular de una CHD. La secuencia polipeptídica de SpyTag se puede expresar en el espacio intracelular de la CHD mediante varios procedimientos, incluyendo expresión directa del transgén, fusión con una proteína intracelular endógena tal como, p. ej., hemoglobina, fusión con el dominio intracelular de proteínas endógenas de superficie celular tales como, p. ej., banda 3, glucoforina A, Kell o fusión con un componente estructural del citoesqueleto eritroide. La secuencia de SpyTag no se limita a un extremo polipeptídico y

puede integrarse dentro de la secuencia interior de un polipéptido endógeno de modo que no se altere la traducción y localización del polipéptido. Un antígeno exógeno de interés se puede fusionar con SpyCatcher. La secuencia de ácido nucleico que codifica la fusión SpyCatcher se puede expresar dentro de la misma CHD que expresa la fusión SpyTag. Tras la reacción de los polipéptidos SpyTag y SpyCatcher, se formará un enlace covalente que actúa para anclar el antígeno de interés en el espacio intracelular de la CHD.

En una realización, una CHD puede expresar SpyTag fusionado con hemoglobina beta intracelularmente. La CHD puede modificarse genéticamente con una secuencia génica que incluye un promotor de hemoglobina, gen de la beta globina y una secuencia de SpyTag de modo que, tras la traducción, la beta globina intracelular se fusiona con SpyTag en su extremo C. Además, la CHD expresa un gen dirigido por el promotor Gata1 que codifica SpyCatcher que impulsa la expresión de fenilalanina hidroxilasa (PAH) de modo que, tras la traducción, la PAH intracelular se fusiona con SpyCatcher en su extremo N. Tras la expresión de ambas proteínas de fusión, la beta globina unida a SpyTag se une a través de un enlace isopeptídico al PAH unido a SpyCatcher en el espacio intracelular, permitiendo que la PAH se ancle a la beta globina y se conserve durante la maduración.

En otra realización, el polipéptido SpyTag se puede expresar como una fusión con el antígeno exógeno de interés dentro de una CHD. El polipéptido SpyCatcher se puede expresar como una fusión con el extremo C (intracelular) de la glucoforina A dentro de la misma CHD. Tras la expresión de ambos polipéptidos de fusión, se formará un enlace isopeptídico entre los polipéptidos SpyTag y SpyCatcher, formando un enlace covalente entre el polipéptido eritroide endógeno anclado a la membrana y el antígeno exógeno de interés.

En otro ejemplo, el antígeno exógeno de interés puede cargarse físicamente en una CHD cultivada (en lugar de expresarse) mediante varios procedimientos, incluyendo carga osmótica o ciclo hipotónico-hipertónico en los que el antígeno exógeno se difunde a través de poros introducidos en la membrana de la CHD (véase, p. ej., Cremel y Godfrin, *Int J Pharm* 2013) y fusión con un péptido de penetración celular, tal como uno derivado de una toxina bacteriana, véase, p. ej., Kwon y col., *J Contr Rel* 2009.

El antígeno exógeno de interés puede expresarse partir de un transgén introducido en una CHD por electroporación, transfección química o polimérica, transducción vírica, rotura mecánica de la membrana u otro procedimiento; un antígeno exógeno que se expresa a partir de ARNm que se introduce en una célula por electroporación, transfección química o polimérica, transducción vírica, rotura mecánica de la membrana u otro procedimiento; un polipéptido antigénico exógeno que se sobreexpresa a partir del locus nativo mediante la introducción de un factor externo, p. ej., un activador de la transcripción, represor de la transcripción o potenciador de la ruta secretora; un antígeno exógeno que se sintetiza, extrae o produce a partir de una célula de producción u otro sistema externo e incorporado en la CHD.

Las CHD de la divulgación pueden opcionalmente cargarse con materiales (carga útil) tales como péptidos, proteínas, ADN, ARN, ARNip y otras macromoléculas aplicando lesión controlada a la célula durante un periodo de tiempo predeterminado con el fin de provocar perturbaciones en la membrana celular de modo que los materiales se puedan administrar al interior de la célula (p. ej., citoplasma).

En realizaciones preferidas, la CHD es un reticulocito. Por ejemplo, los reticulocitos pueden cargarse con un ARNm que codifica un antígeno exógeno mediante lesión celular controlada. El ARNm puede estar desnudo o modificado, según se desee. La modificación del ARNm que mejora la estabilidad del ARNm y/o disminuye la inmunogenicidad incluye, p. ej., ARCA: análogo de caperuza anti-inverso ($m_2^{7,3'-O}GP_3G$), GP_3G (análogo de caperuza sin metilar), m^7GP_3G (análogo de caperuza monometilado), $m_3^{2,2,7}GP_3G$ (análogo de caperuza trimetilado), m_5CTP (trifosfato de 5'-metil-citidina), m_6ATP (N6-metil-adenosina-5'-trifosfato), s_2UTP (trifosfato de 2-tiouridina) y Ψ (trifosfato de pseudouridina).

En otra realización preferida, la CHD es un eritrocito. Por ejemplo, los eritrocitos pueden cargarse con un antígeno exógeno mediante lesión celular controlada. La lesión celular puede ser estar provocada por, por ejemplo, presión inducida por deformación mecánica o fuerzas cortantes, aplicación de deformación a la célula, constricción, estiramiento rápido, compresión rápida o pulso de alta velocidad de corte. La lesión celular controlada conduce a la absorción de material (carga útil) en el citoplasma de la célula del medio celular circundante.

El uso de una lesión celular controlada basada en la deformación celular controlada (p. ej., la deformación mecánica de la célula a medida que pasa a través de la constricción) conduce a la captación de material (carga útil) por difusión en lugar de endocitosis. El material (carga útil) está presente en el citoplasma en lugar de en los endosomas después de la captación celular tras la lesión controlada, lo que hace que el material esté fácilmente disponible para la célula. La lesión celular controlada, p. ej., por deformación controlada, preserva la viabilidad celular (p. ej., más del 50 %, 70 % o más del 90 %). En determinadas realizaciones, la lesión celular controlada, p. ej., por deformación controlada, preserva el estado de diferenciación y actividad celular. Si se desea, se usa un tratamiento combinado, p. ej., lesión controlada por deformación seguida o precedida de, p. ej., electroporación u otro procedimiento de aumento de la permeabilidad de la membrana celular. Opcionalmente, se pueden usar tensioactivos.

Los procedimientos de deformación mecánica son particularmente adecuados para células que no toleran bien otros procedimientos de aumento de la permeabilidad de la membrana, p. ej., muestran una disminución de la viabilidad o un estado de diferenciación diferente después de realizar dichos procedimientos. Los procedimientos de deformación

mecánica también son adecuados para material (carga útil) que no tolera bien otros procedimientos de aumento de la permeabilidad de la membrana. Como alternativa o adicionalmente, la carga útil puede no introducirse lo suficiente en la célula usando procedimientos alternativos, p. ej., debido a, p. ej., la carga, la hidrofobicidad o el tamaño de la carga útil.

- 5 Se describe un procedimiento ilustrativo de lesión controlada por deformación y dispositivos adecuados para dichos procedimientos, p. ej., en la publicación PCT n.º WO2013059343.

En una realización específica, se proporciona una población de reticulocitos que se ha sometido a una lesión celular controlada por deformación controlada. Las células pueden, p. ej., comprimirse y deformarse al pasar a través de un microcanal que tiene un diámetro menor que el de un reticulocito individual, provocando de este modo alteraciones en la membrana celular, de modo que la membrana se vuelva porosa. Las células se mueven, p. ej., se empujan, a través de los canales o conductos mediante la aplicación de presión. La compresión y deformación se produce en un medio de suministro que comprende una carga útil, p. ej., un polipéptido u oligonucleótido exógeno (p. ej., ADN, ARN, tal como ARNm). Por ejemplo, el medio de suministro puede comprender un antígeno exógeno enumerado en la tabla F, tabla G, tabla H, tabla I y tabla J o ARNm codificante del mismo. Tras la deformación, el reticulocito capta y retiene el material exógeno. Después de una lesión controlada de la célula por constricción, estiramiento y/o un pulso de alta velocidad de corte, las células se incuban opcionalmente en un medio de suministro que contiene el material (carga útil). Las células se pueden mantener en el medio de administración durante varios minutos para que se recuperen, p. ej., para cerrar la herida provocada al atravesar la constricción. Esto puede ocurrir a temperatura ambiente.

La lesión celular controlada como se usa en el presente documento incluye: i) transfección mediada por virus (p. ej., virus del herpes simple, adenovirus, virus adenoasociado, virus vaccinia o virus Sindbis), ii) transfección mediada químicamente, p. ej., polímero catiónico, fosfato cálcico, lípido catiónico, polímeros y nanopartículas, tales como ciclodextrina, liposomas, liposomas catiónicos, DEAE-dextrano, polietilénimina, dendrímero, polibreno, fosfato cálcico, lipofectina, DOTAP, lipofectamine, CTAB/DOPE, DOTMA; y iii) transfección mediada físicamente, incluyendo inyección directa, suministro por partículas biolísticas, electroporación, irradiación por láser, sonoporación, nanopartículas magnéticas y deformación controlada (p. ej., compresión celular), ilustrado por microaguja, nanoaguja, femtojeringa, punta de microscopía de fuerzas atómicas (MFA), pistola génica (p. ej., nanopartículas de oro), Nucleofector Amaxa, fototransfección (láser multifotónico), infección por ensartado y magnetofección, y otros procedimientos adecuados conocidos en la técnica. Puede usarse cualquier procedimiento adecuado para obtener las CHD descritas en el presente documento que comprenden uno o más ADN, ARN (p. ej., ARNm) o polipéptidos deseados que comprenden antígeno.

El antígeno exógeno de interés se puede detectar en la CHD de la divulgación. La presencia del antígeno exógeno puede validarse y cuantificarse usando procedimientos convencionales de biología molecular, p. ej., transferencia de Western o análisis de FACS. Los antígenos exógenos presentes en el entorno intracelular pueden cuantificarse tras la lisis celular o usando detección fluorescente.

35 **Fabricación**

En algunas realizaciones, la CHD se genera usando una célula hematopoyética precursora, p. ej., una célula CD34+, un eritrocito, una plaqueta, un megacariocito o un neutrófilo como fuente. En algunas realizaciones, la célula hematopoyética precursora se aísla de un donante humano mediante un procedimiento compatible con GMP. En algunas realizaciones, las células de partida proceden de un donante autólogo. En algunas realizaciones, las células de partida proceden de un donante alogénico. Se pueden tipificar polimorfismos de antígenos de células sanguíneas del donante y/o se genotipan antígenos de células sanguíneas del donante. El donante puede ser un donante de sangre universal. En algunas realizaciones, el donante tiene el fenotipo Bombay, es decir, no expresa el antígeno H. En algunas realizaciones, el donante tiene grupo sanguíneo O de ABO y es Rh negativo.

En algunas realizaciones, la CHD se genera usando células progenitoras hematopoyéticas CD34+, células CD34+ periféricas movilizadas o células CD34+ procedentes de la médula ósea como fuente para el material de partida. En algunas realizaciones, las células iniciales se obtienen de sangre del cordón umbilical, son células madre pluripotentes inducidas o son células madre embrionarias.

La CHD que expresa antígeno exógeno puede cultivarse. Las CHD cultivadas se pueden aumentar desde una escala de sobremesa hasta una escala de biorreactor. Por ejemplo, las CHD se cultivan hasta que alcanzan la densidad de saturación, p. ej., 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 o superior a 1×10^7 CHD por ml. Opcionalmente, tras alcanzar la densidad de saturación, las CHD se pueden transferir a un volumen mayor de medio nuevo. Las CHD que expresan antígenos exógenos se pueden cultivar en un biorreactor, tal como, p. ej., un biorreactor de tipo onda, un biorreactor de tanque agitado. Se conocen en la técnica diversas configuraciones de biorreactores y se puede elegir una configuración adecuada según se desee. Las configuraciones adecuadas para cultivar y/o expandir poblaciones de CHD que expresan antígenos exógenos pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la materia sin experimentación indebida. El biorreactor puede estar oxigenado. El biorreactor puede contener opcionalmente uno o más impulsores, una corriente de reciclaje, una corriente de entrada de medios y componentes de control para regular la entrada de medios y nutrientes o para regular la salida de medios, nutrientes y productos de desecho.

En algunas realizaciones, el biorreactor puede contener una población de CHD humanas que comprenden un antígeno exógeno que desprende su ADN intracelular durante el transcurso del procedimiento de cultivo. Por ejemplo, el biorreactor puede contener una población de CHD humanas, CHD desnucleadas y pirenocitos después del cultivo. En una realización específica, las CHD humanas y las CHD desnucleadas comprenden un antígeno exógeno y el antígeno exógeno es retenido por la CHD desnucleada, mientras que el ácido nucleico recombinante que codifica el antígeno exógeno no es retenido por la célula desnucleada. En determinadas realizaciones, el CHD enucleado que comprende el antígeno exógeno presenta sustancialmente la misma fragilidad de la membrana osmótica que una CHD correspondiente aislada sin modificar, sin cultivar.

En una realización, la población de CHD que expresan antígenos exógenos generadas a partir de CHD o precursores de CHD en el biorreactor experimenta una expansión total de más de 20 000 veces en 14 días o más. En algunas realizaciones, el antígeno exógeno se introduce en un precursor de CHD cultivado o recién aislado y, después de la introducción de un ácido nucleico recombinante que codifica el antígeno exógeno, la población de CHD que expresan antígenos exógenos generadas a partir de los precursores de CHD en el biorreactor se expande en el biorreactor a partir de las células precursoras más de 20 000 veces.

En algunas realizaciones, el biorreactor es un biorreactor de ondas o un agitador impulsado por impulsor. El biorreactor puede airearse por medio de un rociador. En una realización, el biorreactor es desechable. En una realización, el biorreactor es LIS (de limpieza *in situ*). El número final de CHD que expresan antígenos exógenos que pueden obtenerse en un entorno de biorreactor como se describe en el presente documento puede ser superior a 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o mayor de 10^{13} CHD. La densidad de las CHD que expresan antígenos exógenos se puede supervisar durante el cultivo midiendo la densidad celular mediante el recuento por hemocitómetro o mediante lectura de la densidad óptica a 600 nm. Opcionalmente, el procedimiento de cultivo se supervisa para determinar los niveles de pH, oxigenación, velocidad de agitación y/o tasa de reciclaje.

Procedimientos y propiedades

La identidad de las CHD que expresan antígenos exógenos se puede evaluar mediante ensayos *in vitro*. Por ejemplo, la identidad de las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa contando el número de CHD en una población, p. ej., por microscopia, por citometría de flujo o por hemocitometría. Como alternativa o adicionalmente, la identidad de las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa mediante el análisis del contenido de proteína de las CHD, p. ej., mediante citometría de flujo, transferencia de Western, inmunoprecipitación, espectroscopia de fluorescencia, quimioluminiscencia, espectrometría de masas o espectroscopia de absorbancia. En una realización, el contenido de proteína ensayado es una proteína que no es de superficie, p. ej., una proteína integral de membrana, hemoglobina, hemoglobina del adulto, hemoglobina fetal, hemoglobina embrionaria, una proteína citoesquelética. En una realización, el contenido de proteína ensayado es una proteína de superficie, p. ej., un marcador de diferenciación, un receptor, un correceptor, un transportador, una glucoproteína. En una realización, la proteína de superficie se selecciona de la lista que incluye, pero sin limitación, glucoforina A, CKIT, receptor de transferrina, banda 3, Kell, CD45, CD46, CD47, CD55, CD59, CR1. En algunas realizaciones, la identidad de las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa mediante el análisis del contenido de antígenos exógenos de las CHD, p. ej., mediante citometría de flujo, transferencia de Western, inmunoprecipitación, espectroscopia de fluorescencia, quimioluminiscencia, espectrometría de masas o espectroscopia de absorbancia. Por ejemplo, la identidad de las CHD que expresan antígenos exógenos se puede evaluar por el contenido de ARNm de las CHD, p. ej., mediante RT-PCR, citometría de flujo o transferencia de Northern. La identidad de las CHD que expresan antígenos exógenos se puede evaluar por el contenido del material nuclear, p. ej., mediante citometría de flujo, microscopia o transferencia de Southern, usando, p. ej., una tinción nuclear o una sonda de ácido nucleico. Como alternativa o adicionalmente, la identidad de las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa por el contenido de lípidos de las CHD, p. ej., mediante citometría de flujo, cromatografía líquida o mediante espectrometría de masas.

En algunas realizaciones, la identidad de las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa por la actividad metabólica de las CHD, p. ej., mediante espectrometría de masas, quimioluminiscencia, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de absorbancia. La actividad metabólica se puede evaluar por la tasa de consumo de ATP y/o la actividad metabólica se evalúa midiendo el nivel de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) en la CHD que expresa antígeno exógeno. La actividad metabólica se puede evaluar como la tasa de metabolismo de uno de los siguientes, incluyendo, pero sin limitación, ácido acetilsalicílico, N-acetilcisteína, 4-aminofenol, azatioprina, bunolol, captoprilo, clorpromazina, dapsona, daunorrubicina, deshidroepiandrosterona, didanosina, dopamina, epinefrina, esmolol, estradiol, estrona, etopósido, haloperidol, heroína, insulina, isoproterenol, dinitrato de isosorbida, LY 217896, 6-mercaptopurina, misonidazol, nitroglicerina, norepinefrina, ácido para-aminobenzoico. En algunas realizaciones, la identidad de las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa dividiendo un sustrato por las CHD, p. ej., mediante espectrometría de masas, quimioluminiscencia, espectroscopia de fluorescencia o espectroscopia de absorbancia. El sustrato puede ser uno de los siguientes, incluyendo, pero sin limitación, acetazolamida, arbutina, bumetamida, creatinina, darstina, desetildorzolamida, digitoxósido de digoxigenina, digoxina-16'-glucurónido, epinefrina, gentamicina, ácido hipúrico, metformina, norepinefrina, ácido p-aminohipúrico, papaverina, penicilina G, fenol rojo, serotonina, ácido sulfosalicílico, tacrolimus, tetraciclina, tucaresol y vancomicina.

En una realización, la población de CHD que expresan antígenos exógenos se diferencia de una célula precursora. En esta realización, El estado de diferenciación de la población de CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa

mediante un ensayo *in vitro*. Los ensayos *in vitro* incluyen los descritos en el presente documento para evaluar la identidad de las CHD, incluyendo, pero sin limitación, la velocidad de expansión, el número, el contenido de proteínas o el nivel de expresión, el contenido de ARNm o el nivel de expresión, el contenido de lípidos, la división de un sustrato, la actividad catalítica o la actividad metabólica.

- 5 En algunas realizaciones, las CHD que expresan antígenos exógenos se cultivan y el estado de diferenciación de las CHD se evalúa en múltiples puntos temporales durante el transcurso del procedimiento de cultivo.

Pueden generarse CHD que expresan antígenos exógenos usando reticulocitos como fuente de material de partida. La pureza de los reticulocitos aislados se puede evaluar usando microscopia, ya que los reticulocitos se caracterizan por una red reticular (en forma de malla) de ARN ribosómico que se hace visible al microscopio con determinadas tinciones tales como azul de metileno nuevo o azul de cresilo brillante. La expresión en superficie del receptor de transferrina (CD71) también es mayor en los reticulocitos y disminuye y maduran a eritrocitos, lo que permite el enriquecimiento y análisis de poblaciones de reticulocitos usando anticuerpos anti-CD71 (véase, p. ej., el prospecto del producto de microperlas Miltenyi CD71 n.º 130-046-201). Como alternativa, el análisis del contenido de creatina y hemoglobina A1C y la actividad enzimática de piruvato cinasa, aspartato aminotransferasa y porfobilinógeno desaminasa puede usarse para evaluar las propiedades de los reticulocitos aislados en relación con los eritrocitos maduros (véase, p. ej., Brun y col., *Blood* 76: 2397-2403 (1990)). Por ejemplo, la actividad de la porfobilinógeno desaminasa es casi 9 veces mayor mientras que el contenido de hemoglobina A1C es casi 10 veces menor en los reticulocitos en relación con los eritrocitos maduros.

En algunas realizaciones, las células adecuadas para generar CHD que expresan antígenos exógenos se diferencian *ex vivo* y/o *in vivo* de una o más células madre. En una realización, la o las células madre son una o más células madre hematopoyéticas. Se pueden realizar diversos ensayos para confirmar la diferenciación *ex vivo* de células madre hematopoyéticas cultivadas en reticulocitos y eritrocitos, incluyendo, por ejemplo, microscopia, hematología, citometría de flujo, medidas de deformabilidad, actividades enzimáticas y análisis de hemoglobina y propiedades funcionales (Giarratana y col., *Nature Biotech.* 23: 69-74 (2005)). El fenotipo de las células madre hematopoyéticas cultivadas se puede evaluar mediante microscopia de células teñidas, por ejemplo, con azul brillante de cresilo. Los reticulocitos, por ejemplo, presentan una red reticular de ARN ribosómico en estas condiciones de tinción, mientras que los eritrocitos carecen de tinción. Las células desnucleadas también pueden supervisarse para determinar las variables hematológicas convencionales incluyendo el volumen globular medio (VGM; femtolitros (fl)), concentración globular media de hemoglobina (CGMH; %) y hemoglobina globular media (HGM; pg/célula) usando, por ejemplo, un sistema automático XE2100 (Sysmex, Roche Diagnostics).

En algunas realizaciones, las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúan para determinar sus propiedades físicas básicas, p. ej., tamaño, masa, volumen, diámetro, flotabilidad, densidad y propiedades de la membrana, p. ej., la viscosidad, la fluctuación de la deformabilidad y fluidez.

En una realización, el diámetro de las CHD que expresan antígenos exógenos se mide mediante microscopia o instrumentación automática, p. ej., un instrumento de análisis hematológico. En una realización, el diámetro de las CHD que expresan antígenos exógenos está entre aproximadamente 1 y 20 micrómetros. En una realización, el diámetro de las CHD que expresan antígenos exógenos es al menos en una dimensión entre aproximadamente 1 y 20 micrómetros. En una realización, el diámetro de las CHD que expresan antígenos exógenos es inferior a aproximadamente 1 micrómetro. En una realización, el diámetro de las CHD en una dimensión es mayor de aproximadamente 20 micrómetros. En una realización, el diámetro de las CHD que expresan antígenos exógenos está entre aproximadamente 1 micrómetro y aproximadamente 20 micrómetros, entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 20 micrómetros, entre aproximadamente 3 micrómetros y aproximadamente 20 micrómetros, entre aproximadamente 4 micrómetros y aproximadamente 20 micrómetros, entre aproximadamente 5 micrómetros y aproximadamente 20 micrómetros, entre aproximadamente 6 micrómetros y aproximadamente 20 micrómetros, entre aproximadamente 5 micrómetros y aproximadamente 15 micrómetros o entre aproximadamente 10 micrómetros y aproximadamente 30 micrómetros.

En una realización, el volumen globular medio de las CHD que expresan antígenos exógenos se mide usando un instrumento de análisis hematológico. En una realización, el volumen del volumen globular medio de las CHD es superior a 10 fl, 20 fl, 30 fl, 40 fl, 50 fl, 60 fl, 70 fl, 80 fl, 90 fl, 100 fl, 110 fl, 120 fl, 130 fl, 140 fl, 150 fl o superior a 150 fl. En una realización, el volumen globular medio de las CHD es inferior a 30 fl, 40 fl, 50 fl, 60 fl, 70 fl, 80 fl, 90 fl, 100 fl, 110 fl, 120 fl, 130 fl, 140 fl, 150 fl, 160 fl, 170 fl, 180 fl, 190 fl, 200 fl o inferior a 200 fl. En una realización, el volumen globular medio de las CHD está entre 80 y 100 femtolitros (fl).

En una realización, la masa flotante promedio de las CHD que expresan antígenos exógenos (pg/célula) se mide usando un resonador de microcanal suspendido o un resonador de microcanal de doble suspensión (véase, p. ej., Byun y col. *PNAS* 2013 110 (19): 7580 y Bryan y col., *Lab Chip* 2014 14 (3): 569).

En una realización, la densidad seca de las CHD que expresan antígenos exógenos se mide mediante masa flotante en un ensayo de intercambio H₂O-D₂O (véase, p. ej., Feijo Delgado y col., *PLOS One* 2013 8 (7): e67590).

En algunas realizaciones, las CHD que expresan antígenos exógenos tienen una fluctuación de deformabilidad de la

membrana promedio de desviación típica superior a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o superior a 100 mrad según lo medido por microscopia de interferencia de luz espacial (SLIM) (véase, p. ej., Bhaduri y col., Sci Reports 2014, 4: 6211).

5 En una realización, la viscosidad promedio de la membrana de una población de CHD que expresan antígenos exógenos se mide detectando la fluorescencia promedio tras la incubación con fluoróforos de rendimiento cuántico dependientes de la viscosidad (véase, p. ej., Haidekker y col., Chem & Biol 2001 8 (2): 123).

En una realización, la fluidez de la membrana de las CHD que expresan antígenos exógenos se mide mediante polarización de fluorescencia, p. ej., con lector de microplacas BMG Labtech POLARstar Omega.

10 Por ejemplo, para medir la deformabilidad, los reticulocitos pueden separarse de las células nucleadas el día 15 de cultivo, por ejemplo, mediante el paso a través de un filtro de desleucocitación (p. ej., Leucolab LCG2, Macopharma) y posteriormente se ensayan mediante ektacitometría. Las células desnucleadas se suspenden en una solución de polivinilpirrolidona al 4 % y después se exponen a un gradiente osmótico creciente de 60 a 450 mosM. Los cambios en el patrón de difracción por láser (índice de deformabilidad) de las células se registran en función de la osmolaridad, para evaluar la deformabilidad dinámica de la membrana celular. El índice de deformabilidad máximo alcanzado con
15 una osmolaridad fisiológicamente relevante está relacionado con el área superficial media de los eritrocitos.

En algunas realizaciones, las CHD que expresan antígenos exógenos se analizan para determinar el contenido de hemoglobina. Se pueden usar ensayos de hemoglobina para evaluar el fenotipo de células diferenciadas (Giarratana y col., Nature Biotech. 23: 69-74 (2005)). Por ejemplo, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando un
20 analizador de Hb Bio-Rad Variant II (Bio-Rad Laboratories) puede usarse para evaluar el porcentaje de diversas fracciones de hemoglobina. El equilibrio de oxígeno puede medirse usando un procedimiento continuo con un espectrofotómetro de longitud de onda doble (p. ej., analizador de hemox, TCS). Las propiedades de unión de la hemoglobina pueden evaluarse mediante fotólisis ultrarrápida. En este procedimiento, la unión de nuevo del CO a tetrámeros de hemoglobina intracelular se analiza a 436 nm después de la fotólisis con un pulso de 10 nanosegundos a 532 nm.

25 Las CHD que expresan antígenos exógenos descritas en el presente documento pueden purificarse después de la fabricación si se desea. Se conocen en la técnica muchos procedimientos adecuados de purificación. Por ejemplo, las CHD que expresan antígenos exógenos se purifican mediante centrifugación, magnetoforesis, irradiación, acustoforesis y desnucleación química o física. En una realización, las CHD que expresan antígenos exógenos se purifican mediante maduración *ex vivo* con, p. ej., un cocultivo de células estromales. En una realización, las CHD que
30 expresan antígenos exógenos se purifican mediante tratamiento químico o enzimático de las CHD, p. ej., mediante tratamiento con una enzima de desglucosilación.

En una realización, las CHD que expresan antígenos exógenos se purifican inhabilitando cualquier potencial replicativo residual de las CHD que expresan antígenos exógenos. En una realización, las CHD que expresan antígenos
35 exógenos se someten a radiación, p. ej., rayos X, rayos gamma, partículas beta, partículas alfa, neutrones, protones, núcleos elementales, rayos UV para dañar los ácidos nucleicos competentes para replicación residuales.

La radiación ionizante es energía transmitida por rayos X, rayos gamma, partículas beta (electrones de alta velocidad), partículas alfa (el núcleo del átomo de helio), neutrones, protones y otros iones pesados tales como los núcleos de argón, nitrógeno, carbono y otros elementos. Los rayos X y rayos gamma son ondas electromagnéticas como la luz, pero su energía es mucho mayor que la de la luz (sus longitudes de onda son mucho más cortas). La luz ultravioleta
40 (UV) es una radiación de energía intermedia que puede dañar las células, pero la luz UV se diferencia de las formas de radiación electromagnética mencionadas anteriormente porque no provoca ionización (pérdida de un electrón) en átomos o moléculas, sino más bien excitación (cambio en el nivel de energía de un electrón). Las otras formas de radiación, partículas, tienen carga negativa (electrones), carga positiva (protones, rayos alfa y otros iones pesados) o son eléctricamente neutros (neutrones).

45 Las ionizaciones inducidas por radiación pueden actuar directamente sobre las moléculas componentes celulares o indirectamente sobre moléculas de agua, provocando radicales derivados de agua. Los radicales reaccionan con moléculas cercanas en muy poco tiempo, lo que da lugar a rotura de enlaces químicos u oxidación (adición de átomos de oxígeno) de las moléculas afectadas. El principal efecto en las células son roturas del ADN. Ya que el ADN consiste en un par de cadenas dobles complementarias, pueden producirse roturas de una sola hebra o de ambas hebras. Sin
50 embargo, se cree que esta última es mucho más importante desde el punto de vista biológico. La mayoría de las roturas de una sola hebra se pueden reparar normalmente gracias a la naturaleza bicatenaria de la molécula de ADN (las dos hebras se complementan entre sí, de modo que una hebra intacta puede actuar como molde para la reparación de su hebra opuesta dañada). En el caso de roturas de doble hebra, sin embargo, la reparación es más difícil y puede producirse una unión errónea de los extremos rotos. Estos denominados errores de reparación dan lugar a la inducción
55 de mutaciones, aberraciones cromosómicas o muerte celular.

La supresión de segmentos de ADN es la forma predominante de daño por radiación en células que sobreviven a la irradiación. Puede ser provocada por (1) reparación incorrecta de dos roturas de doble cadena separadas en una molécula de ADN con unión de los dos extremos externos y pérdida del fragmento entre las roturas o (2) el proceso

de limpieza (digestión enzimática de nucleótidos, las moléculas componentes del ADN) de los extremos rotos antes de volver a unirse para reparar una rotura de doble hebra.

- Las radiaciones difieren no solo en sus constituyentes (electrones, protones, neutrones, etc.) sino también en su energía. Las radiaciones que provocan ionización densa a lo largo de su trayectoria (tales como neutrones) se denominan radiaciones de transferencia lineal de energía alta (TLE alta), un parámetro físico para describir la energía promedio liberada por unidad de longitud de la trayectoria. (Véase la figura adjunta). Las radiaciones de TLE bajo producen ionizaciones solo escasamente a lo largo de su trayectoria y, por lo tanto, casi de forma homogénea dentro de una célula. La dosis de radiación es la cantidad de energía por unidad de material biológico (p. ej., número de ionizaciones por célula). Por tanto, las radiaciones de TLE alta son más destructivas para el material biológico que las radiaciones de TLE baja, tales como rayos X y gamma, porque, a la misma dosis, las radiaciones de TLE baja inducen el mismo número de radicales más escasamente dentro de una célula, mientras que las radiaciones de TLE alta, tales como neutrones y partículas alfa, transfieren la mayor parte de su energía a una región pequeña de la célula. El daño de ADN localizado provocado por ionizaciones densas de radiaciones de TLE alta es más difícil de reparar que el daño difuso de ADN provocado por las escasas ionizaciones de radiaciones de TLE baja.
- En una realización, una población de CHD que expresan antígenos exógenos se somete a irradiación gamma usando una dosis de irradiación de más de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 kGy.
- En una realización, una población de CHD que expresan antígenos exógenos se somete a irradiación de rayos X usando una dosis de irradiación de más de 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10 000 o superior a 10 000 mSv.
- La pureza de una población de CHD que expresan antígenos exógenos se puede evaluar midiendo la homogeneidad de la población. En una realización, la amplitud de distribución promedio de las CHD que expresan antígenos exógenos se mide mediante un instrumento de análisis hematológico. En una realización, la población de CHD que expresan antígenos exógenos tiene una relación de reticulocitos con respecto a no reticulocitos superior a 10, 100, 1000, 10^4 , 10^5 , 10^6 o superior a 10^6 . La homogeneidad de la población de CHD que expresan antígenos exógenos se puede evaluar midiendo el contenido de células estromales de la población. En una realización, la población de CHD que expresan antígenos exógenos tiene menos de 1 ppb de células estromales. Como alternativa o adicionalmente, la homogeneidad de la población de CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa midiendo el título vírico y/o un potencial de formación de colonias bacterianas de la población.
- En una realización, la homogeneidad de una población de CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa mediante un ensayo *in vitro*. Los ensayos *in vitro* incluyen los descritos en el presente documento para evaluar la identidad de las CHD, incluyendo, pero sin limitación, la velocidad de expansión, el número, el contenido de proteínas o el nivel de expresión, el contenido de ARNm o el nivel de expresión, el contenido de lípidos, la división de un sustrato, la actividad catalítica o la actividad metabólica.
- Los eritrocitos maduros para su uso en la generación de CHD que expresan antígenos exógenos pueden aislarse usando diversos procedimientos tales como, por ejemplo, una lavadora de células, un separador de celdas de flujo continuo, separación por gradiente de densidad, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), agotamiento inmunomagnético de Miltenyi (MACS) o una combinación de estos procedimientos (véase, p. ej., van der Berg y col., Clin. Chem. 33: 1081-1082 (1987); Bar-Zvi y col., J. Biol. Chem. 262: 17719-17723 (1987); Goodman y col., Exp. Biol. Med. 232: 1470-1476 (2007)).
- Se pueden aislar eritrocitos de la sangre completa mediante centrifugación sencilla (véase, p. ej., van der Berg y col., Clin. Chem. 33: 1081-1082 (1987)). Por ejemplo, la sangre entera anticoagulada con EDTA se puede centrifugar a $800 \times g$ durante 10 min a 4 °C. El plasma rico en plaquetas y la capa leucocitaria se eliminan y los glóbulos rojos se lavan tres veces con solución salina isotónica (NaCl, 9 g/l).
- Como alternativa, los eritrocitos se pueden aislar usando centrifugación en gradiente de densidad con diversos medios de separación tales como, por ejemplo, Ficoll, Hypaque, Histopaque, Percoll, Sigmacell o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un volumen de Histopaque-1077 se coloca sobre un volumen igual de Histopaque-1119. Se coloca sangre entera anticoagulada con EDTA diluida 1:1 en un volumen igual de solución salina isotónica (NaCl, 9 g/l) sobre el Histopaque y la muestra se centrifuga a $700 \times g$ durante 30 min a temperatura ambiente. En estas condiciones, los granulocitos migran a la interfaz 1077/1119, linfocitos, otras células mononucleares y plaquetas permanecen en la interfaz plasma/1077 y los glóbulos rojos se sedimentan. Los glóbulos rojos se lavan dos veces con solución salina isotónica.
- Como alternativa, los eritrocitos pueden aislarse por centrifugación usando un gradiente escalonado de Percoll (véase, p. ej., Bar-Zvi y col., J. Biol. Chem. 262: 17719-17723 (1987)). Por ejemplo, se mezcla sangre fresca con una solución anticoagulante que contiene citrato de sodio 75 mM y ácido cítrico 38 mM y las células se lavan brevemente en solución salina tamponada con Hepes. Los leucocitos y plaquetas se eliminan por adsorción con una mezcla de α -celulosa y Sigmacell (1:1). Los eritrocitos se aíslan adicionalmente de reticulocitos y glóbulos blancos residuales mediante centrifugación a través de un gradiente escalonado de Percoll al 45/75 % durante 10 min a 2500 rpm en un rotor Sorvall SS34. Los eritrocitos se recuperan en el sedimento, mientras que los reticulocitos se agrupan en la interfaz

de 45/75 % y los glóbulos blancos restantes se agrupan en la interfaz de 0/45 %. El Percoll se elimina de los eritrocitos mediante varios lavados en solución salina tamponada con Hepes. Otros materiales que pueden usarse para generar gradientes de densidad para el aislamiento de eritrocitos incluyen OptiPrep™, una solución al 60 % de iodixanol en agua (de Axis-Shield, Dundee, Escocia).

- 5 Los eritrocitos se pueden separar de los reticulocitos, por ejemplo, usando citometría de flujo (véase, p. ej., Goodman y col., Exp. Biol. Med. 232: 1470-1476 (2007)). En este caso, se centrifuga sangre completa (550 x g, 20 min, 25 °C) para separar las células del plasma. El sedimento celular se resuspende en solución salina tamponada con fosfato y se fracciona adicionalmente en Ficoll-Paque (densidad 1,077), por ejemplo, por centrifugación (400 x g, 30 min, 25 °C) para separar los eritrocitos de los glóbulos blancos. El sedimento celular resultante se resuspende en RPMI
10 complementado con suero bovino fetal al 10 % y se clasifica en un instrumento FACS tal como, por ejemplo, un Becton Dickinson FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, N.J., EE. UU.) según el tamaño y la granularidad.

- 15 Los eritrocitos se pueden aislar por agotamiento inmunomagnético (véase, p. ej., Goodman, y col., (2007) Exp. Biol. Med. 232: 1470-1476). En este caso, se usan perlas magnéticas con anticuerpos específicos de tipo celular para eliminar células distintas de eritrocitos. Por ejemplo, se aíslan eritrocitos de la mayoría de los otros componentes
15 sanguíneos usando un gradiente de densidad como se describe en el presente documento seguido de agotamiento inmunomagnético de cualquier reticulocito residual. Las células se pretratan con suero de anticuerpos humanos durante 20 min a 25 °C y después se tratan con anticuerpos contra antígenos específicos de reticulocitos tales como, por ejemplo, CD71 y CD36. Los anticuerpos se pueden unir directamente a perlas magnéticas o conjugar con PE, por
20 ejemplo, a las que reaccionarán las perlas magnéticas con anticuerpo anti-PE. El complejo de anticuerpo-perla magnética es capaz de extraer selectivamente reticulocitos residuales, por ejemplo, de la población de eritrocitos.

- 25 Los eritrocitos también se pueden aislar usando aféresis. El procedimiento de aféresis implica la extracción de sangre completa de un paciente o donante, separación de componentes sanguíneos usando centrifugación o clasificación celular, extracción de una o más de las partes separadas y transfusión de los componentes restantes al paciente o donante. Actualmente se usan varios instrumentos para este fin, tal como, por ejemplo, los instrumentos Amicus y Alyx
25 de Baxter (Deerfield, Ill., EE. UU.), el instrumento Trima Accel de Gambro BCT (Lakewood, Colo., EE. UU.) y el instrumento MCS 9000 de Haemonetics (Braintree, Mass., EE. UU.). Pueden ser necesarios procedimientos de purificación adicionales para lograr el grado apropiado de pureza celular.

- 30 En algunas realizaciones, las CHD que expresan antígenos exógenos se diferencian *ex vivo* y/o *in vivo* de uno o más reticulocitos. Pueden usarse reticulocitos para generar CHD que expresan antígenos exógenos. Los reticulocitos son
30 glóbulos rojos inmaduros y componen aproximadamente el 1 % de los glóbulos rojos del cuerpo humano. Los reticulocitos se desarrollan y maduran en la médula ósea. Una vez puestos en circulación, los reticulocitos experimentan rápidamente una diferenciación terminal a eritrocitos maduros. Como eritrocitos maduros, los reticulocitos no tienen un núcleo celular. A diferencia de los eritrocitos maduros, los reticulocitos mantienen la capacidad de realizar la síntesis de proteínas. En algunas realizaciones, el ácido nucleico recombinante (tal como
35 ARNm) que codifica un antígeno exógeno se introduce en los reticulocitos para generar CHD que expresan antígenos exógenos.

- 40 Pueden aislarse reticulocitos de diferentes edades de la sangre periférica en función de las diferencias en la densidad celular a medida que maduran los reticulocitos. Los reticulocitos se pueden aislar de sangre periférica usando centrifugación diferencial a través de diversos gradientes de densidad. Por ejemplo, los gradientes de Percoll pueden
40 usarse para aislar reticulocitos (véase, p. ej., Noble y col., Blood 74: 475-481 (1989)). Las soluciones isotónicas estériles de Percoll de densidad 1,096 y 1,058 g/ml se preparan diluyendo Percoll (Sigma-Aldrich, San Luis, Mo., EE. UU.) hasta una concentración final de trietanolamina 10 mM, NaCl 117 mM, glucosa 5 mM y seroalbúmina bovina (BSA) 1,5 mg/ml. Estas soluciones tienen una osmolaridad entre 295 y 310 mOsm. Se añaden cinco mililitros, por
45 ejemplo, de la primera solución de Percoll (densidad 1,096) a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml estéril. Se colocan dos mililitros, por ejemplo, de la segunda solución de Percoll (densidad 1,058) sobre la primera solución de Percoll de mayor densidad. Se colocan capas de dos a cuatro mililitros de sangre completa en la parte superior del tubo. El tubo se centrifuga a 250 x g durante 30 min en una centrifuga refrigerada con soportes de tubo abatibles. Los reticulocitos y algunos glóbulos blancos migran a la interfaz entre las dos capas de Percoll. Las células en la interfaz se transfieren a un tubo nuevo y se lavan dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con glucosa 5 mM, azida de sodio 0,03 mM y BSA 1 mg/ml. Los glóbulos blancos residuales se eliminan mediante cromatografía en PBS sobre
50 una columna de exclusión por tamaño.

- 55 Como alternativa, los reticulocitos pueden aislarse mediante selección positiva usando un enfoque de separación inmunomagnética (véase, p. ej., Brun y col., Blood 76: 2397-2403 (1990)). Este enfoque aprovecha la gran cantidad de receptores de transferrina que se expresan en la superficie de los reticulocitos en relación con los eritrocitos antes de la maduración. Pueden usarse perlas magnéticas recubiertas con un anticuerpo contra el receptor de transferrina para aislar selectivamente reticulocitos de una población mixta de células sanguíneas. Están disponibles anticuerpos
55 contra el receptor de transferrina de diversas especies de mamíferos, incluyendo ser humano, de fuentes comerciales (p. ej., Affinity BioReagents, Golden, Colo., EE. UU.; Sigma-Aldrich, San Luis, Mo., EE. UU.). El anticuerpo de transferrina se puede unir directamente a las perlas magnéticas. Como alternativa, el anticuerpo de transferrina puede
60 unirse indirectamente a las perlas magnéticas mediante un anticuerpo secundario. Por ejemplo, se puede mezclar anticuerpo monoclonal de ratón 10D2 (Affinity BioReagents, Golden, Colo., EE. UU.) contra la transferrina humana

con perlas inmunomagnéticas recubiertas con una inmunoglobulina G de oveja antirratón (Dyna/Invitrogen, Carlsbad, Calif., EE. UU.). Las perlas inmunomagnéticas se incuban después con una fracción de glóbulos rojos empobrecida en leucocitos. Las perlas y los glóbulos rojos se incuban a 22 °C con una mezcla suave durante 60-90 min seguido del aislamiento de las perlas con reticulocitos adheridos usando un campo magnético. Los reticulocitos aislados pueden eliminarse de las perlas magnéticas usando, por ejemplo, solución DETACHaBEAD® (de Invitrogen, Carlsbad, Calif., EE. UU.). Como alternativa, los reticulocitos pueden aislarse de crecimiento y maduración *in vitro* de células madre hematopoyéticas CD34+ usando los procedimientos descritos en el presente documento.

Se pueden separar eritrocitos desnucleados diferenciados terminalmente de otras células en función de su contenido de ADN. En un ejemplo no limitante, las células se marcan primero con un colorante de ADN vital, como Hoechst 33342 (Invitrogen Corp.). Hoechst 33342 es una contratinción nuclear que penetra en las células que emite fluorescencia azul cuando se une a ADN bicatenario. Las células precursoras indiferenciadas, los macrófagos u otras células nucleadas en el cultivo se tiñen con Hoechst 33342, mientras que los eritrocitos desnucleados son negativos para Hoechst. Las células positivas para Hoechst se pueden separar de los eritrocitos desnucleados usando clasificadores de células activados por fluorescencia u otras técnicas de clasificación de células. El colorante Hoechst puede eliminarse de los eritrocitos aislados mediante diálisis u otros procedimientos adecuados.

Una población de CHD que expresan antígenos exógenos puede purificarse reduciendo el contenido de material nuclear de la población de CHD. Por ejemplo, aumenta la tasa de desnucleación de la población de CHD y/o aumenta o enriquece el número de CHD que expresan antígenos exógenos desnucleados.

Las poblaciones de CHD que expresan antígenos exógenos se pueden incubar con una molécula pequeña, p. ej., un inhibidor de actina, p. ej., citocalasina A, B, C, D, E, F, H, J y después se centrifugan para eliminar el material nuclear. Como alternativa o adicionalmente, una población de CHD que expresan antígenos exógenos puede manipularse mecánicamente atravesando filtros de tamaño restrictivo progresivamente más pequeños para eliminar el material nuclear. La población de CHD que expresan antígenos exógenos también se puede incubar en una superficie de plástico recubierta de fibronectina para aumentar la eliminación de material nuclear. En una realización, la población de CHD que expresan antígenos exógenos se incuba en cocultivo con células estromales, p. ej., macrófagos, para incrementar la eliminación de material nuclear.

En algunas realizaciones, la población de CHD que expresan antígenos exógenos es superior al 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o superior al 99,9 % desnucleadas.

En algunas realizaciones, las CHD que expresan antígenos exógenos no se cultivan conjuntamente con células de apoyo, p. ej., con una capa estromal adherente. En algunas realizaciones, la población de CHD que expresan antígenos exógenos se genera poniendo en contacto las CHD con un antígeno exógeno y diferenciando las CHD para obtener una población de células desnucleadas que comprenden el antígeno exógeno. La población de CHD que expresan antígenos exógenos se obtiene sin una etapa de enriquecimiento, tal como separación gravitacional, clasificación magnética o fluorescente, irradiación, envenenamiento de células nucleadas y similares para seleccionar células desnucleadas.

En algunas realizaciones, la población de CHD que expresan antígenos exógenos está compuesta por más del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, o más del 99,9 % de CHD que expresan antígenos exógenos que carecen de material nuclear según se evalúa mediante un ensayo para detectar material nuclear tal como los descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, se evalúa la presencia, actividad biológica y/o función de un antígeno exógeno, tal como un polipéptido antigénico exógeno presentado por CHD que expresan antígenos exógenos. Hay muchos ensayos adecuados disponibles y conocidos en la técnica.

En una realización, el antígeno exógeno es un polipéptido en la superficie de la CHD que expresa antígeno exógeno. La presencia del antígeno exógeno se puede evaluar mediante ensayos que incluyen, pero sin limitación, citometría de flujo, transferencia de Western, RT-PCR, transferencia de Northern, prueba de rosetas de Coombs, espectrometría de masas. En una realización, el antígeno exógeno es un polipéptido en el interior de la CHD que expresa antígeno exógeno. La presencia del antígeno exógeno se puede evaluar mediante ensayos que incluyen, pero sin limitación, transferencia de Western, RT-PCR, transferencia de Northern, PCR, transferencia de Southern, espectrometría de masas.

En una realización, el antígeno exógeno es un ácido nucleico en la superficie de la CHD que expresa antígeno exógeno. La presencia del antígeno exógeno se puede evaluar mediante ensayos que incluyen, pero sin limitación, citometría de flujo, citometría de flujo con una sonda fluorescente homóloga, transferencia de Southern, transferencia de Northern, PCR. En una realización, el antígeno exógeno es un ácido nucleico en el interior de la CHD que expresa antígeno exógeno. La presencia del antígeno exógeno se puede evaluar mediante ensayos que incluyen, pero sin limitación, transferencia de Southern, transferencia de Northern, PCR.

En una realización, el antígeno exógeno es una molécula pequeña en la superficie de la CHD que expresa antígeno exógeno. La presencia del antígeno exógeno se puede evaluar mediante ensayos que incluyen, pero sin limitación,

citometría de flujo, espectrometría de masas. En una realización, el antígeno exógeno es una molécula pequeña en el interior de la CHD que expresa antígeno exógeno. La presencia del antígeno exógeno se puede evaluar mediante ensayos que incluyen, pero sin limitación, espectrometría de masas, espectroscopia de fluorescencia.

5 En una realización, el antígeno exógeno es un lípido en la membrana de la CHD que expresa antígeno exógeno. La presencia del antígeno exógeno se puede evaluar mediante ensayos que incluyen, pero sin limitación, espectrometría de masas, citometría de flujo, solubilidad de la membrana, polarización de fluorescencia, microscopia de interferencias de luz espacial.

10 En una realización, el antígeno exógeno es fluorescente o está fusionado con una molécula fluorescente o se coexpresa a partir de un ácido nucleico recombinante (p. ej., en un vector) con una proteína indicadora fluorescente como GFP. La presencia del antígeno exógeno en o sobre la CHD que expresa antígeno exógeno se puede evaluar mediante ensayos que incluyen, pero sin limitación, citometría de flujo, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de absorbancia.

15 En una realización, el antígeno exógeno es una molécula gaseosa. La presencia del antígeno exógeno en o sobre la CHD que expresa antígeno exógeno se puede evaluar mediante ensayos que incluyen, pero sin limitación, ensayos de quimioluminiscencia, espectroscopia de masas.

20 La presencia del antígeno exógeno en o sobre la CHD que expresa antígeno exógeno se puede evaluar mediante citometría de flujo de forma cuantitativa usando perlas de calibración tales como perlas de calibración de citometría disponibles en el mercado para cuantificar el número de antígenos exógenos en una CHD individual. Como alternativa o adicionalmente, la presencia del antígeno exógeno en o sobre la CHD que expresa antígeno exógeno se puede evaluar mediante transferencia de Western de forma cuantitativa usando un patrón de concentración conocida que sea detectable usando los mismos reactivos de detección que el antígeno exógeno, y de esta manera se puede cuantificar el número de antígenos exógenos en una CHD individual.

25 En algunas realizaciones, la presencia de dos o más antígenos exógenos diferentes se puede evaluar por el mismo procedimiento o por procedimientos diferentes, ya sea simultáneamente, de forma secuencial o en paralelo. Por ejemplo, en una realización, se puede evaluar un antígeno exógeno en la superficie mediante citometría de flujo usando un anticuerpo específico para el antígeno exógeno y se puede evaluar un antígeno exógeno diferente que no está en la superficie que es fluorescente mediante señal fluorescente usando un canal diferente en citometría de flujo. En un ejemplo diferente, un antígeno exógeno en la superficie se puede evaluar mediante citometría de flujo y un antígeno exógeno diferente que no se encuentra en la superficie se puede evaluar mediante transferencia de Western.

30 En una realización específica, el antígeno exógeno se retiene en la CHD que expresa el antígeno exógeno después de la diferenciación terminal de la fuente celular. Por ejemplo, la CHD que expresa antígeno exógeno se genera a partir de una CHD cultivada y la expresión o presencia del antígeno exógeno se evalúa después de la diferenciación terminal de la célula mediante un procedimiento adecuado, p. ej., mediante citometría de flujo, transferencia de Western, inmunoprecipitación, espectroscopia de fluorescencia, quimioluminiscencia, transferencia de Southern, transferencia de Northern o espectroscopia de absorbancia.

35 En una realización específica, el antígeno exógeno se retiene en la CHD que expresa antígeno exógeno después de la circulación *in vivo* tras la administración de la CHD que expresa antígeno exógeno a un sujeto. La CHD que expresa antígeno exógeno se puede inyectar en un animal de laboratorio o en un modelo animal, tal como un ratón, por vía intravenosa, p. ej., a través de la vena de la cola, o se inyecta en un ser humano por vía intravenosa. A continuación, se extrae sangre y se evalúa la presencia del antígeno exógeno en la CHD que expresa antígeno exógeno mediante un ensayo adecuado, p. ej., mediante citometría de flujo, transferencia de Western, inmunoprecipitación, espectroscopia de fluorescencia, quimioluminiscencia, transferencia de Southern, transferencia de Northern o espectroscopia de absorbancia.

40 En algunas realizaciones, la actividad biológica del antígeno exógeno en o sobre la CHD que expresa antígeno exógeno, la actividad biológica general de la CHD y la actividad general de una población de CHD se pueden evaluar mediante ensayos *in vitro*.

45 En algunas realizaciones, la actividad de la CHD que expresa antígeno exógeno se reitera rápidamente usando una línea celular modelo. Por ejemplo, se expresa una biblioteca de antígenos exógenos adecuados en una línea celular modelo, p. ej., HEK293T o K562, y la actividad se evalúa mediante un ensayo adecuado; entonces el mejor candidato a antígeno exógeno, p. ej., el que se expresa al nivel más alto o uno que demuestra la actividad más alta en el ensayo adecuado, se expresa, p. ej., en CHD cultivadas para generar CHD que expresan antígenos exógenos.

50 En una realización, la actividad de la CHD que expresa antígeno exógeno se reitera rápidamente usando un modelo de ratón cultivado. Por ejemplo, se expresa una biblioteca de antígenos exógenos adecuados en CHD de ratón cultivadas; la actividad se evalúa en un modelo de enfermedad de ratón adecuado o en un sistema de modelo de ratón adecuado para evaluar la actividad; el mejor candidato a antígeno exógeno, p. ej., el que se expresa al nivel más alto o el que demuestra la actividad más alta en el ensayo adecuado, se expresa a continuación, p. ej., en CHD cultivadas para generar CHD que expresan antígenos exógenos.

En algunos casos, el antígeno exógeno es una enzima y la actividad del antígeno exógeno se puede evaluar mediante un ensayo enzimático en el que se detecta la desaparición de una molécula de sustrato específica o se detecta la aparición de una molécula de producto específica. Dichos ensayos incluyen, pero sin limitación, ensayos colorimétricos, espectrometría de masas, HPLC, ensayos fluorescentes.

- 5 Por ejemplo, a) el antígeno exógeno es adenosina desaminasa (ADA) y el ensayo enzimático detecta la conversión de adenosina en inosina; b) el antígeno exógeno es fenilalanina hidroxilasa (PAH) y el ensayo detecta la conversión de fenilalanina en tirosina; c) el antígeno exógeno es fenilalanina amoníaco liasa (PAL) y el ensayo detecta la conversión de fenilalanina en ácido *trans*-cinámico; d) el antígeno exógeno es timidina fosforilasa (TP) y el ensayo detecta la conversión de timidina en timina y 2-desoxi-ribosa; e) el antígeno exógeno es purina nucleósido fosforilasa (PNP) y el ensayo detecta la conversión de inosina en hipoxantina, adenosina en adenina y guanosina en guanina; f) el antígeno exógeno es homogentisato 1,2-dioxigenasa (HDG) y el ensayo detecta la conversión de homogentisato en maleilacetato; g) el antígeno exógeno es cistationina beta sintasa y el ensayo detecta la conversión de serina y homocisteína en cistationina; h) el antígeno exógeno es oxalato oxidasa y el ensayo detecta la oxidación de oxalato.

- 15 En algunas realizaciones, la actividad de la CHD que expresa antígeno exógeno se evalúa en un modelo animal, por ejemplo, un modelo de ratón y un ratón inmunodeficiente o un ratón NSG, de una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad metabólica o una deficiencia enzimática, o que pueda demostrar el efecto de la CHD que expresa antígeno exógeno, por ejemplo, un ratón en el que se inyecta un sustrato y se mide el producto de la conversión mediada por antígeno exógeno.

- 20 En una realización, el antígeno exógeno es el polipéptido del receptor 1 del complemento (CR1), un derivado o fragmento funcional del mismo. La actividad del antígeno exógeno CR1 se puede evaluar de varias formas incluyendo, por ejemplo, la captura específica de inmunocomplejos por el antígeno exógeno CR1, la transferencia eficiente de los inmunocomplejos a los macrófagos, o el aclaramiento *in vivo* de inmunocomplejos de un ratón.

- 25 La funcionalidad de las CHD que sobreexpresan el antígeno exógeno CR1 se puede evaluar mediante uno o más procedimientos: captura de inmunocomplejos en la superficie de CHD que comprende antígeno exógeno CR1, liberación de los inmunocomplejos a los macrófagos mientras se evita la CHD que comprende el antígeno exógeno CR1 y la circulación adecuada de las CHD que comprenden el antígeno exógeno CR1. Estos tres parámetros pueden ensayarse *in vitro*. Los ensayos de captura de inmunocomplejos se describen en la técnica, p. ej., Oudin y col., J Immunol 2000 y Schifferli y col., J Immunol 1991. Por ejemplo, se incuban inmunocomplejos marcados con CHD que expresan CR1 nativo o polipéptido antigénico exógeno CR1 o un fragmento de los mismos y el número de inmunocomplejos capturados por las CHD se ensaya mediante citometría de flujo. Se describen en la técnica ensayos de transferencia de macrófagos, p. ej., Kuhn y col., J Immunol 1998. Por ejemplo, se incuban inmunocomplejos marcados cargados en eritrocitos que expresan CR1 nativo o polipéptido antigénico exógeno CR1 o un fragmento de los mismos con macrófagos. La transferencia de inmunocomplejos de la superficie de los eritrocitos a los macrófagos y el consumo o conservación de eritrocitos por parte de los macrófagos, se puede medir mediante citometría de flujo.
- 35 La circulación adecuada se puede predecir analizando la morfología y la deformabilidad de CHD. La morfología de las CHD que expresan CR1 nativo o polipéptido antigénico exógeno CR1 o un fragmento de los mismos se puede evaluar visualmente usando técnicas de microscopía convencionales, como se describe, p. ej., en Giarratana y col., Blood 2011 y Repik y col., Clin Exp Immunol 2005. La deformabilidad de las CHD que expresan CR1 nativo o polipéptido antigénico exógeno CR1 o un fragmento de los mismos se puede evaluar mediante ektacitometría, también conocida como análisis óptico de células rotacional por láser (LORCA), como se describe, p. ej., Giarratana y col., Blood 2011.

- 40 Por ejemplo, Se incuba una CHD que expresa el antígeno CR1 exógeno (la CHD comprende un antígeno exógeno polipeptídico CR1) con inmunocomplejos, tales como inmunocomplejos generados *in vitro* o inmunocomplejos procedentes del paciente. La captura de los inmunocomplejos por el antígeno exógeno CR1 se evalúa mediante, por ejemplo, citometría de flujo usando un marcador fluorescente en el inmunocomplejo o mediante citometría de flujo usando un agente de detección secundario contra un elemento del inmunocomplejo.
- 45

- En una realización, la CHD que expresa el antígeno CR1 exógeno se incuba en primer lugar con inmunocomplejos y después se incuba con macrófagos, tales como macrófagos primarios, monocitos primarios, macrófagos cultivados, monocitos cultivados, células U937, células U937 activadas por PMA, células AA9, células RAW 264.7, células J774, células THP1, células KG-1, células NR8383, células MV-4-11, células 3D4/31, células MD, células Fcwf-4, células DH82. Los macrófagos se analizan mediante, por ejemplo, citometría de flujo o radiografía, para determinar la presencia de inmunocomplejos transferidos por la CHD que expresa el antígeno CR1 exógeno. La transferencia de inmunocomplejos capturados de CHD cultivados a macrófagos es un ensayo convencional en la técnica, véase, por ejemplo: Repik y col., 2005 Clin Exp Immunol. 140: 230; Li y col., 2010 Infection Immunity 78 (7): 3129.
- 50

- En una realización, la actividad de la CHD que expresa el antígeno CR1 exógeno se evalúa en un modelo animal. Por ejemplo, se puede usar un modelo de ratón adecuado, tal como un ratón inmunodeficiente o un ratón NSG. El modelo de enfermedad del ratón puede ser, por ejemplo, una enfermedad por inmunocomplejos, tal como el lupus. Los modelos de ratón incluyen NZBWF1/J, MRL/MpJ, MRL/MpJ-Fas (lpr), Smn.C3-Fasl/J, NZM2410/Aeg, 129S4-Cd48, Cg-Sle1, NZM-Sle1 Sle2 Sle3/LmoJ y BXSB.129P2. Como alternativa o adicionalmente, se puede introducir un fenotipo de enfermedad en un ratón, p. ej., mediante inyección de inmunocomplejos. Las CHD que expresan el antígeno CR1 exógeno se pueden inyectar en cualquier ratón adecuado (u otro modelo animal) para probar uno o más efectos
- 55
- 60

biológicos de la CHD, p. ej., el aclaramiento de los inmunocomplejos inyectados por la CHD que expresa el antígeno CR1 exógeno.

5 En una realización, el antígeno exógeno es una molécula reguladora del complemento o tiene actividad reguladora del complemento. Esta actividad del antígeno exógeno se puede evaluar mediante ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, la actividad del antígeno exógeno se puede evaluar midiendo la reducción en un ensayo de activación del complemento *in vitro*, p. ej., ensayo CH50 que mide la lisis mediada por el complemento de eritrocitos de oveja sensibilizados, o ensayo AH50 que mide la lisis mediada por el complemento de rutas alternativas de eritrocitos de conejo no sensibilizados. Como alternativa, la actividad del antígeno exógeno se puede evaluar detectando la escisión o ausencia de escisión, que puede exponer o no un neoepítipo, de un componente del complemento recombinante que se ha incubado con el antígeno exógeno, incluyendo, pero sin limitación, p. ej., la escisión de C2 recombinante 10 en C2a y C2b, la escisión del factor B en factor Ba y factor Bb, la escisión del factor C3b en iC3bH e iC3bL, la escisión de C3bBb en C3b y Bb, la escisión de C4bBb en C4b y Bb o la escisión del factor C4b en iC4bH e iC4bL. La escisión o ausencia de escisión de un componente del complemento recombinante adecuado se puede evaluar mediante procedimientos de análisis de proteínas conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, p. ej., cromatografía, electroforesis en gel, ELISA y transferencia de Western. Los ensayos *in vivo* adecuados para determinar la actividad de antígenos exógenos incluyen la inyección de la CHD que expresa antígeno exógeno en un animal, por ejemplo, un ratón, y examinando la deposición de factores del complemento, por ejemplo, complejo de ataque a la membrana, por tinción histológica.

20 En una realización, el antígeno exógeno es capaz de unirse a o capturar una diana y la actividad del antígeno exógeno se puede evaluar detectando la diana capturada en el antígeno exógeno *in vitro* o *in vivo*.

En una realización, la CHD que expresa antígeno exógeno se incuba con la diana *in vitro* y la captura de la diana por el antígeno exógeno se detecta usando un ensayo *in vitro* incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, citometría de flujo, inmunohistoquímica, separación magnética, radiografía, ensayos formadores de colonias, microscopia.

25 En una realización, la CHD que expresa antígeno exógeno se incuba con la diana *in vitro* y la captura de la diana por el antígeno exógeno se detecta usando un ensayo de cocultivo *in vitro* incluyendo, pero sin limitación, pero sin limitación, un ensayo de consumo de macrófagos de CHD que expresa antígeno exógeno opsonizado, un ensayo de activación de linfocitos T, un ensayo de estimulación de linfocitos B, un ensayo de desgranulación de mastocitos, un ensayo de potencial infeccioso.

30 En una realización, la CHD que expresa antígeno exógeno se incuba con la diana *in vitro* y la tasa de liberación o disociación de la diana capturada se mide usando un ensayo *in vitro* incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, citometría de flujo, inmunohistoquímica, separación magnética, radiografía, ensayos formadores de colonias, microscopia.

35 La captura de la diana por la CHD que expresa antígeno exógeno se puede ensayar en un ensayo *in vivo*, por ejemplo, en un animal, incluyendo un modelo de ratón de enfermedades en las que la diana está presente de forma natural en el ratón. Las enfermedades adecuadas incluyen infecciones bacterianas, infecciones víricas, infecciones fúngicas, enfermedades por inmunocomplejos, enfermedades por autoanticuerpos, hiperlipidemia, hiperglucemia. En otros modelos de ratón, la diana se administra al ratón de forma externa, p. ej., mediante inyección o mediante alimentación. En estos ensayos, la captura de la diana por la CHD que expresa antígeno exógeno se analiza examinando al animal, p. ej., el plasma, el tejido, para determinar la reducción o retención de la diana o aislando o recogiendo la CHD que 40 expresa antígeno exógeno del animal, p. ej., de la sangre, del plasma, de un tejido, y analizando la presencia de la diana en el antígeno exógeno usando un ensayo *in vitro* incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, citometría de flujo, inmunohistoquímica, separación magnética, radiografía, ensayos formadores de colonias, microscopia.

45 En algunas realizaciones, el antígeno exógeno es capaz de unirse a o capturar una diana y aumentar sustancialmente el aclaramiento de la diana *in vivo* o reducir sustancialmente la concentración de la diana en circulación. La actividad del antígeno exógeno en la CHD que expresa antígeno exógeno se puede evaluar detectando el aclaramiento mejorado de la diana *in vitro* o *in vivo*.

50 En una realización, la CHD que expresa antígeno exógeno se incuba con la diana *in vitro* y la captura de la diana por el antígeno exógeno se detecta usando un ensayo *in vitro* incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, citometría de flujo, inmunohistoquímica, separación magnética, radiografía, ensayos formadores de colonias, microscopia. Posteriormente, la CHD que expresa antígeno exógeno se incuba en un ensayo de cocultivo con una célula que se sabe que promueve el aclaramiento, por ejemplo, un macrófago o un monocito, y el aclaramiento de la CHD diana y que expresa antígeno exógeno se evalúa mediante, por ejemplo, citometría de flujo, inmunohistoquímica, separación magnética, radiografía, ensayos formadores de colonias, microscopia.

55 En una realización, la CHD que expresa antígeno exógeno se incuba con la diana *in vitro* y la captura de la diana por el antígeno exógeno se detecta usando un ensayo *in vitro* incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, citometría de flujo, inmunohistoquímica, separación magnética, radiografía, ensayos formadores de colonias, microscopia. Posteriormente, la CHD que expresa antígeno exógeno se incuba en un sistema físico que imita el mecanismo de aclaramiento de la CHD *in vivo*, por ejemplo, un bazo artificial, un microcanal, una columna rellena, una resina, un

explante de tejido, una centrifuga y el aclaramiento de la CHD diana y que expresa antígeno exógeno se evalúa mediante, por ejemplo, citometría de flujo, inmunohistoquímica, separación magnética, radiografía, ensayos formadores de colonias, microscopia.

5 En una realización, el aclaramiento de la diana por la CHD que expresa antígeno exógeno se analiza en un ensayo *in vivo*, por ejemplo, en un animal, incluyendo, por ejemplo, un modelo de ratón de enfermedades en las que la diana está presente de forma natural en el ratón, por ejemplo, infección bacteriana, infección vírica, infección fúngica, enfermedad por inmunocomplejos, enfermedad por autoanticuerpos, hiperlipidemia, hiperglucemia o, por ejemplo, un modelo de ratón en el que la diana se administra al ratón de forma externa, p. ej., mediante inyección o mediante alimentación. En estos ensayos, el aclaramiento de la diana por la CHD que expresa antígeno exógeno se analiza examinando al animal, p. ej., el plasma, el tejido, para determinar la reducción de la diana o aislando o recogiendo la CHD que expresa antígeno exógeno del animal, p. ej., de la sangre, del plasma, de un tejido, y analizando la presencia de la diana en el antígeno exógeno usando un ensayo *in vitro* incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, citometría de flujo, inmunohistoquímica, separación magnética, radiografía, ensayos formadores de colonias, microscopia.

15 En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno es capaz de administrar un antígeno exógeno adecuado a un compartimento subcelular específico, por ejemplo, un lisosoma.

Por ejemplo, se puede suministrar un antígeno exógeno al compartimento lisosómico de una célula diana, p. ej., un macrófago. El suministro satisfactorio del antígeno exógeno al compartimento lisosómico de una célula diana se evalúa mediante microscopia y la detección de manchas puntiformes correspondientes a un antígeno exógeno fluorescente o un agente de detección de antígeno exógeno fluorescente. Como alternativa o adicionalmente, se evalúa mediante microscopia el suministro satisfactorio del antígeno exógeno al compartimento lisosómico de una célula diana y la colocalización de un agente de detección de antígeno exógeno fluorescente con un agente de detección fluorescente para un marcador lisosómico conocido, p. ej., lysotracker, LAMP-1.

25 En algunas realizaciones, el antígeno exógeno es una enzima que puede degradar los componentes tóxicos que se han acumulado en el lisosoma de una célula que presenta el genotipo o fenotipo de, o procedente de un paciente con, una enfermedad del almacenamiento lisosómico. Por ejemplo, el antígeno exógeno es capaz de degradar el material tóxico acumulado en la célula y rescatar el fenotipo celular, p. ej., prevenir la muerte celular.

La población de CHD que expresan antígenos exógenos se puede evaluar para determinar la incapacidad de las CHD para replicarse, la capacidad de las CHD para circular de forma segura a través de la vasculatura y la falta de inmunogenicidad de las CHD.

30 En algunas realizaciones, la seguridad de la población de CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa midiendo el potencial de replicación de la población de CHD usando un ensayo *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las pruebas para detectar una incapacidad sustancial de las CHD que expresan antígenos exógenos para autorreplicarse incluyen: a) una incapacidad sustancial para formar un tumor cuando se inyecta en un ratón inmunodeprimido; b) una incapacidad sustancial para formar una colonia cuando se cultiva en agar blando; c) una incapacidad sustancial para incorporar timidina en un ensayo de incorporación de timidina; d) una falta sustancial de señal positiva tras la transfección con ADN que codifica un indicador fluorescente, p. ej., inferior al 10 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %, 1 ppm, 10 ppb, 100 ppt, 1 ppt o inferior a 1 ppt de señal positiva; e) una falta sustancial de señal positiva al teñir con un colorante nuclear, p. ej., inferior al 10 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %; y 0,001 %, 1 ppm, 100 ppb, 10 ppb, 1 ppb, 100 ppt, 10 ppt, 1 ppt o inferior a 1 ppt de señal positiva; f) una falta sustancial de señal positiva tras la tinción con marcadores celulares de neoplasia hematológica, p. ej., CKIT, CD34, EpCam, p. ej., inferior al 10 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %, 1 ppm, 100 ppb, 10 ppb, 1 ppb, 100 ppt, 10 ppt, 1 ppt o inferior a 1 ppt de señal positiva. En determinadas realizaciones, se proporcionan CHD que expresan antígenos exógenos que no contienen una cantidad sustancial de un ácido nucleico replicante.

45 En algunas realizaciones, la seguridad de la población de CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa midiendo la capacidad de una CHD administrada para circular *in vivo* (en el sistema circulatorio de un sujeto) sin provocar una oclusión vascular sustancial o inducción de la cascada de coagulación. Opcionalmente, se puede evaluar la farmacocinética de la circulación de las CHD que expresan antígenos exógenos.

50 En una realización, la farmacocinética de la circulación de las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa inyectando la CHD en un animal por vía intravenosa, tal como un ratón. El ratón puede ser un ratón inmunodeficiente NSG (nod-SCID-gamma). Se agotan los macrófagos del ratón antes de la inyección con la CHD, p. ej., mediante inyección intraperitoneal de glóbulos rojos humanos o mediante inyección intravenosa con liposomas de clodronato. Las CHD que expresan antígenos exógenos se pueden marcar con un colorante fluorescente, p. ej., CFSE. Después de la inyección de las CHD, se extrae sangre y el número de CHD que expresan antígenos exógenos restantes se evalúa mediante, p. ej., citometría de flujo, transferencia de Western, y la tasa de aclaramiento de las CHD que expresan antígenos exógenos se deduce de estos datos. Los glóbulos rojos humanos se pueden inyectar en el mismo modelo animal que las CHD que expresan antígenos exógenos y se comparan las tasas de aclaramiento de las CHD y los glóbulos rojos humanos.

En una realización, el riesgo de activación de la cascada de coagulación por la CHD que expresa antígeno exógeno

se evalúa con un ensayo *in vitro*. En una realización, la CHD que expresa antígeno exógeno se incuba con sangre humana y la activación de la cascada de coagulación se evalúa midiendo el tiempo necesario para la coagulación en presencia de caolín, fosfolípidos con carga negativa y calcio (prueba de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT)), véase, p. ej., Exner y Rickard, *Biomedicine* 1977 27 (2): 62, o midiendo el tiempo necesario para la coagulación en presencia de tromboplastina y calcio (prueba de tiempo de protrombina (PT)), véase, p. ej., Jaques y Dunlop 1945, *Am J Physiol* 145: 67. El intervalo normal para la prueba de aPTT es de aproximadamente 25 a 38 segundos. El intervalo normal para la prueba de PT es de aproximadamente 10 a 12 segundos.

En una realización, cualquier acontecimiento adverso inducido por las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa inyectando las CHD en un animal por vía intravenosa y evaluando la activación de la cascada de coagulación. El nivel de inducción de la cascada de coagulación se evalúa extrayendo sangre y evaluando los niveles de los componentes de la cascada de coagulación en el plasma mediante, p. ej., transferencia de Western o ELISA. Los componentes de la cascada de coagulación son normalmente productos de degradación del fibrinógeno, p. ej., fibrinopéptido A y fibrinopéptido B. Por ejemplo, el nivel de inducción de la cascada de coagulación se evalúa extrayendo sangre y evaluando los niveles de actividad de coagulación en el plasma mediante ensayo de activación plaquetaria, p. ej., incubando el plasma con plaquetas y evaluando la activación de las plaquetas mediante citometría de flujo, p. ej., mediante tinción de marcadores de activación, p. ej., mediante tinción para PAC-1, CD62p o CD40L.

En una realización, cualquier acontecimiento adverso inducido por las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa inyectando las CHD en un animal por vía intravenosa y evaluando la activación de rutas inflamatorias. El nivel de inflamación se puede evaluar extrayendo sangre y evaluando los niveles de citocinas inflamatorias en el plasma mediante, p. ej., transferencia de Western o ELISA. En una realización, las citocinas inflamatorias son interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa o fragmento p70 de IL-12.

En una realización, cualquier acontecimiento adverso inducido por las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa inyectando las CHD en un animal por vía intravenosa y evaluando el estado de los tejidos, p. ej., hígado, bazo, corazón, pulmones, cerebro, piel, riñones. El estado del tejido se puede evaluar mediante necropsia macroscópica, disección del tejido, tinción histológica y captura de imágenes por microscopia.

En una realización, la capacidad de la CHD que expresa antígeno exógeno para circular *in vivo* sin provocar oclusión vascular sustancial o activación de la cascada de coagulación se evalúa midiendo la deformabilidad de las CHD. La deformabilidad de la CHD que expresa antígeno exógeno se evalúa usando un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, el ensayo es un ensayo de fragilidad osmótica. La fragilidad mecánica de la CHD que expresa antígeno exógeno se puede evaluar midiendo la integridad estructural en respuesta al esfuerzo de cizallamiento en un sistema de cizallamiento de tipo Couett. En una realización, la deformabilidad de la CHD que expresa antígeno exógeno se evalúa usando un ektacitómetro. En una realización, la deformabilidad de la CHD que expresa antígeno exógeno se evalúa midiendo el índice de elongación a una presión definida mediante difracción por láser usando un instrumento analizador óptico de células rotacional por láser (LORCA). En una realización, la deformabilidad de la CHD que expresa antígeno exógeno se evalúa midiendo el tiempo de tránsito a través de una serie de constricciones a escala micrométrica de dimensiones definidas a una presión fija en un dispositivo microfluídico. En una realización, la deformabilidad de la CHD que expresa antígeno exógeno se evalúa midiendo la tasa de supervivencia a través de una serie de constricciones a escala micrométrica de dimensiones definidas a una presión fija en un dispositivo microfluídico. El dispositivo microfluídico se puede seleccionar de uno de los siguientes, incluyendo, pero sin limitación, un chip de polidimetilsiloxano (PDMS) con constricciones de escala micrométrica (p. ej., Hoelzle y col., *J Vis Exp* 2014 91: e51474); un chip con constricciones en forma de embudo (p. ej., Guo y col., *Lab Chip* 2012 12: 1143); un chip PDMS con pilares (p. ej., Zhang y col., *PNAS* 2012 109 (46): 18707); o una columna rellena de microperlas de bazo artificial *in vitro* (Guillaume DePlaine y col., *Blood* 2011, 117(8)).

En una realización, la capacidad de la CHD que expresa antígeno exógeno para circular *in vivo* sin provocar oclusión vascular sustancial o activación de la cascada de coagulación se evalúa midiendo la oclusión vascular de las CHD. La oclusión vascular de la CHD que expresa antígeno exógeno se puede evaluar usando un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, la oclusión vascular de la CHD que expresa antígeno exógeno se evalúa usando un ensayo *ex vivo*. La CHD que expresa antígeno exógeno se incuba en una relación de 1:1 con glóbulos rojos humanos de referencia y se evalúa la inducción de rosetas multicelulares mediante microscopia óptica en comparación con un ensayo de referencia con sangre con incompatibilidad de Rh. La oclusión vascular de la CHD que expresa el antígeno exógeno se evalúa midiendo la adhesión de las CHD a las células endoteliales vasculares humanas en condiciones de flujo, véase, p. ej., Kaul DK, Finnegan E y Barabino GA (2009) *Microcirculación* 16 (1): 97-111. Como alternativa o adicionalmente, la oclusión vascular se evalúa midiendo el aumento de la unidad de resistencia periférica (URP) en un ensayo de perfusión *ex vivo* del endotelio vascular de rata, véase, p. ej., Kaul, Fabry y Nagel, *PNAS* 1989, 86: 3356. Además, la oclusión vascular se evalúa mediante microscopia intravital, véase, p. ej., Zennadi y col., 2007 *Blood* 110 (7): 2708. La oclusión vascular también se puede evaluar midiendo caudales y la adhesión de las cámaras de flujo de altura graduada *in vitro* de CHD, véase, p. ej., Zennadi y col., 2004, *Blood* 104 (12): 3774.

En algunas realizaciones, la seguridad de la población de CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa midiendo la inmunogenicidad de la población de CHD usando un ensayo *in vitro* o *in vivo* adecuado.

Por ejemplo, la población de CHD que expresan antígenos exógenos a) no induce la aglutinación en una prueba de

Coombs usando suero del *sujeto receptor previsto o b)* no induce la aglutinación en una prueba de Coombs usando suero *humano agrupado*.

5 En una realización, la población de CHD que expresan antígenos exógenos se obtiene de una célula progenitora que se ha genotipado con respecto a los antígenos del grupo sanguíneo predominante y emparejado con el genotipo del antígeno del grupo sanguíneo del receptor.

En una realización, la población de CHD que expresan antígenos exógenos comprende un antígeno exógeno u otra proteína exógena que tiene menos del 10 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %) o menos del 0,001 % de la reactividad prevista de linfocitos T mediante un algoritmo de predicción de epítomos de linfocitos T por ordenador.

10 En una realización, la población de CHD que expresan antígenos exógenos comprende un antígeno exógeno u otra proteína exógena que tiene menos del 10 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 % o menos del 0,001 % de reactividad en un ensayo de activación de linfocitos T *in vitro*, p. ej., ensayo EpiScreen de Antitope Inc.

15 Por ejemplo, las CHD que expresan antígenos exógenos procedentes de eritrocitos se pueden centrifugar y resuspender en una solución adecuada (p. ej., solución convencional de AS-3) para su infusión en sujetos que lo necesiten. En algunas realizaciones, las CHD que expresan antígenos exógenos que se van a infundir tienen el mismo tipo ABO que el del receptor para minimizar el riesgo de reacciones inmunitarias asociadas a la infusión. Las CHD que expresan antígenos exógenos también pueden tratarse previamente para eliminar antígenos específicos del grupo sanguíneo o reducir de otro modo las antigenicidades. Los procedimientos adecuados para este fin incluyen, pero sin limitación, los descritos en las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20010006772 y 20030207247.

20 **Composiciones terapéuticas**

Se proporcionan composiciones que contienen CHD que tienen niveles eficaces de antígeno exógeno de interés. Dichas composiciones contienen una pluralidad de CHD, p. ej., 1×10^3 células o 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} o superior a 1×10^{12} células. Las CHD de la divulgación pueden, por ejemplo, administrarse como concentrado de glóbulos rojos en una solución salina a una concentración del 10 %, 25 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del 90 % de relación de masa con respecto a volumen (% m/v). El tiempo de administración a un paciente puede variar entre 10 minutos y cuatro horas o más.

Las CHD cultivadas de la divulgación se pueden almacenar en un tampón adecuado, p. ej., una solución conservante anticoagulante aprobada por la FDA, tal como el anticoagulante citrato-dextrosa A (ACD-A), citrato-fosfato dextrosa (CPD), citrato-fosfato-dextrosa-dextrosa (CP2D) o citrato-fosfato-dextrosa-adenina (CPDA-1). Las composiciones se 30 pueden almacenar durante hasta 21 días.

Como alternativa, las CHD cultivadas de la divulgación se pueden almacenar en una solución de aditivos aprobada, p. ej., AS-1 (Adsol), AS-3 (Nutricel), AS-5 (Optisol) o AS-7 (SOLX).

35 Como alternativa, las CHD cultivadas de la divulgación se pueden almacenar en una solución de crioprotectora de glicerol. Las composiciones se pueden congelar y almacenar durante hasta 10 años. Las células congeladas se pueden descongelar y desglicerolizar mediante etapas sucesivas de lavado, por ejemplo, con cloruro de sodio al 0,9 % antes de su uso.

40 Teniendo en cuenta la vida útil de los eritrocitos humanos y murinos (120 y 50 días, respectivamente (véase, p. ej., Khandelwal y col., Transfusion 2007), puede ser ventajoso estimular el envejecimiento de los eritrocitos artificiales para aumentar la fagocitosis por células presentadoras de antígenos. El mecanismo fisiológico más importante de eliminación de eritrocitos de la circulación es inmunomediado (Singer y col., PNAS 1986) después de la exposición de nuevos sitios antigénicos en la superficie celular de eritrocitos, tal como la externalización de fosfatidilserina (Schroit y col., J Biol Chem 1985) o agrupación de proteínas de banda 3 (Kay, PNAS 1975; Turrini y col., J Biol Chem 1991) inducida artificialmente con ionóforo de calcio o tratamientos químicos de BS3, respectivamente.

45 Las CHD cultivadas de la divulgación pueden tratarse con un agente inductor de la fagocitosis tal como, p. ej., ionóforo de calcio o BS3. La pluralidad de CHD cultivadas de la divulgación puede comprender CHD que se han tratado con un agente inductor de la fagocitosis, tal como, p. ej., ionóforo de calcio o BS3, durante diferentes periodos de tiempo, de modo que, tras su administración a un sujeto, la pluralidad de CHD cultivadas se fagocitan a diferentes velocidades, p. ej., de forma continua durante un día o varios días en lugar de en forma de embolada.

50 Se proporcionan en el presente documento composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden una pluralidad de CHD cultivadas que comprenden un antígeno exógeno de interés. Las composiciones y composiciones farmacéuticas pueden comprender una solución de tampón de almacenamiento adecuado tal como, p. ej., citrato-dextrosa anticoagulante A. Las composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden la pluralidad de CHD cultivadas que comprenden un antígeno exógeno de interés pueden comprender adicionalmente un aditivo aprobado tal como, p. ej., Adsol. Las composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden la pluralidad de CHD 55 cultivadas que comprenden un antígeno exógeno de interés pueden comprender adicionalmente una solución crioprotectora de glicerol para almacenamiento congeladas.

Se proporcionan en el presente documento CHD que comprenden un antígeno exógeno de interés seleccionado de uno o más de los antígenos de la tabla F, tabla G, tabla H, tabla I y tabla J, tales como, p. ej., proteína básica de mielina, proteína proteolípídica, glucoproteína de oligodendrocitos de mielina, antígeno de células beta pancreáticas, insulina, flagelina, gluten, albúmina 2S, hialuronidasa, factor VIII, factor IX y anti-TNF α , adenosina desaminasa, L-asparaginasa, rasburicasa, globulina antitumoral, L-arginasa, L-metionasa, preproinsulina, proinsulina, insulina, GAD65, GAD67, IA-2, IA-2 β , tiroglobulina, peroxidasa tiroidea, receptor de tirotropina, glucoproteína de oligodendrocitos de mielina, proteína proteolípídica, colágeno II, colágeno IV, receptor de acetilcolina, metaloproteína 1 y 3 de la matriz, proteína de choque térmico 47 de chaperona molecular, fibrilina-1, receptor α de PDGF, receptor β de PDGF, proteína nuclear SS-A, conaraquina (Ara h 1), alérgeno II (Ara h 2), aglutinina de *Arachis* (Ara h 6), α -lactoalbúmina (ALA), lactotransferrina, gluteína, gluteína de bajo peso molecular, α -gliadina, γ -gliadina, hordeína, secalina, avenina y combinaciones de los mismos. Se puede proporcionar una pluralidad de CHD que comprenden un antígeno exógeno de interés como composición o composición farmacéutica.

Se proporcionan en el presente documento vectores de expresión que codifican uno o más antígenos de la tabla F, tabla G, tabla H, tabla I y tabla J, tales como, p. ej., proteína básica de mielina, proteína proteolípídica, glucoproteína de oligodendrocitos de mielina, antígeno de células beta pancreáticas, insulina, flagelina, gluten, Ara h2, albúmina 2S, hialuronidasa, factor VIII, factor IX y anti-TNF α , opcionalmente fusionados con una de las proteínas eritroides endógenas de la tabla C.

En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden CHD que expresan antígenos exógenos que son adecuadas para la administración a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas comprenden en general una población de CHD que expresan antígenos exógenos y un vehículo farmacéuticamente aceptable en una forma adecuada para su administración a un sujeto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el procedimiento particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas que comprenden una población de CHD que expresan antígenos exógenos. (Véase, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18^a ed. (1990)). Las composiciones farmacéuticas se formulan en general como estériles, sustancialmente isotónicas y en total cumplimiento con todas las regulaciones de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) de la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen excipientes que son en general seguros, no tóxicos y deseables, incluyendo excipientes que son aceptables para su uso veterinario así como para su uso farmacéutico en seres humanos. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

Los ejemplos de vehículos o diluyentes incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y seroalbúmina humana al 5 %. Se conoce bien en la técnica el uso de dichos medios y compuestos para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o compuesto convencional sea incompatible con las CHD que expresan antígenos exógenos descritos en el presente documento, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar a las composiciones agentes terapéuticos complementarios. Normalmente, se formula una composición farmacéutica para que sea compatible con su vía de administración prevista. Las CHD que expresan antígenos exógenos se pueden administrar por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intradérmica, transdérmica, rectal, intracraneal, intraperitoneal, intranasal; intramuscular o como inhalantes. Las CHD que expresan antígenos exógenos se pueden administrar opcionalmente en combinación con otros agentes terapéuticos que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de la enfermedad, el trastorno o la afección para los que están destinadas las CHD que expresan antígenos exógenos.

Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; compuestos antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; compuesto quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y compuestos para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición puede ser estéril y debería ser fluida en la medida en que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, p. ej., agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, p. ej., mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de

dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede lograrse prevención de la acción de los microorganismos mediante diversos compuestos antibacterianos y antifúngicos, p. ej., parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir compuesto isotónicos, p. ej., azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. Puede producirse absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un compuesto que retarde la absorción, p. ej., monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando las CHD que expresan antígenos exógenos en una cantidad eficaz y en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en el presente documento, según se desee. En general, se preparan dispersiones incorporando las CHD que expresan antígenos exógenos en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y cualquier otro ingrediente deseado. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, son procedimientos de preparación secado al vacío y liofilización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. Las CHD que expresan antígenos exógenos se pueden administrar en forma de una inyección de depósito o una preparación de implante que se puede formular de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil de las CHD que expresan antígenos exógenos, su o sus antígenos exógenos y/o su o sus cargas útiles opcionales.

Las composiciones orales incluyen en general un diluyente inerte o un transportador comestible. Pueden incluirse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el fin de la administración terapéutica oral, las CHD que expresan antígenos exógenos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. También se pueden preparar composiciones orales usando un vehículo líquido para su uso como un enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo líquido se aplica por vía oral y se agita y expectora o se traga. Pueden incluirse como parte de la composición compuestos aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un compuesto disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un emoliente tal como dióxido de silicio coloidal; un compuesto edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un compuesto aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Para la administración por inhalación, las CHD que expresan antígenos exógenos se suministran en forma de un aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica de composiciones que comprenden CHD que expresan antígenos exógenos también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes adecuados para la barrera que se va a atravesar. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica e incluyen, p. ej., para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los glóbulos rojos modificados se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas como se conoce en general en la técnica.

Las CHD que expresan antígenos exógenos también se pueden preparar como composiciones farmacéuticas en forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En algunas realizaciones, las CHD que expresan antígenos exógenos se preparan con vehículos que disminuirán la velocidad con la que las CHD que expresan antígenos exógenos se eliminan del cuerpo de un sujeto. Por ejemplo, son adecuadas las formulaciones de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de dichas formulaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también se pueden obtener en el mercado de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc.

En una realización, la composición farmacéutica que comprende CHD que expresan antígenos exógenos se administra por vía intravenosa a un sujeto que se beneficiaría de la composición farmacéutica. En otras realizaciones, la composición se administra al sistema linfático, p. ej., mediante inyección intralinfática o mediante inyección intraganglionar (véase, p. ej., Senti y col., 2008 PNAS 105 (46): 17908) o mediante inyección intramuscular, mediante administración subcutánea, mediante inyección directa en el timo o en el hígado.

En una realización, la composición farmacéutica que comprende CHD que expresan antígenos exógenos se administra como una suspensión líquida. En una realización, la composición farmacéutica se administra como una formulación coagulada que es capaz de formar un depósito después de la administración y, en una realización preferida, liberar lentamente a la circulación CHD que expresan antígenos exógenos o, en una realización preferida, permanecer en forma de depósito.

En una realización, la composición farmacéutica que comprende las CHD que expresan antígenos exógenos se almacena usando procedimientos y composiciones de tampón que son capaces de mantener la viabilidad de las CHD que expresan antígenos exógenos. Por ejemplo, se puede usar desoxigenación antes del almacenamiento para mantener un estado anaeróbico, manipulación del pH, complementación de precursores metabólicos, manipulación del equilibrio osmótico, aumento del volumen del medio de suspensión y/o reducción de la tensión oxidativa mediante la adición de moléculas protectoras para mantener la viabilidad de las CHD que expresan antígenos exógenos. Varios estudios que emplean una combinación de estas estrategias han informado de que el mantenimiento de la viabilidad de los eritrocitos permite una extensión del almacenamiento más allá de las 6 semanas (véase, p. ej., Yoshida y Shevkopylas, Blood Transfus 2010 8: 220).

Se pueden usar vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables para administrar las CHD que expresan antígenos exógenos descritos en el presente documento. El excipiente se refiere a una sustancia inerte usada como diluyente o vehículo. Se usan vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, con un compuesto para que el compuesto sea útil para una terapia o como un producto. En general, para cualquier sustancia, un vehículo farmacéuticamente aceptable es un material que se combina con la sustancia para su administración a un sujeto. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares. En algunos casos, el vehículo es esencial para el suministro, p. ej., para solubilizar un compuesto insoluble para suministro de líquido; un tampón para el control del pH de la sustancia para conservar su actividad; o un diluyente para prevenir la pérdida de la sustancia en el recipiente de almacenamiento. En otros casos, sin embargo, el vehículo es, por conveniencia, p. ej., un líquido para administración más conveniente. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en el presente documento se pueden sintetizar según procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

Normalmente, las composiciones farmacéuticamente aceptables son muy purificadas para que estén libres de contaminantes, son biocompatibles y no son tóxicas, y son adecuados para la administración a un sujeto. Si el agua es un constituyente del vehículo, el agua está muy purificada y se procesa para que esté exenta de contaminantes, p. ej., endotoxinas.

El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato cálcico, alginatos, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y/o aceite mineral, pero sin limitación. La composición farmacéutica puede incluir además un lubricante, un agente humectante, un edulcorante, un potenciador del sabor, un agente emulsionante, un agente de suspensión y/o un conservante.

Se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen CHD que expresan antígenos exógenos que tienen niveles eficaces de antígenos exógenos. Dichas composiciones contienen una pluralidad de CHD que expresan antígenos exógenos, p. ej., 1×10^3 CHD, o 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} o superior a 1×10^{12} CHD. En ejemplos específicos, se pueden administrar CHD que expresan antígenos exógenos generadas a partir de CHD como concentrado de glóbulos rojos en una solución salina a una concentración del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del 90 % de relación de masa con respecto a volumen (% m/v). El tiempo de administración a un paciente puede variar entre 10 minutos y cuatro horas o más.

En ejemplos específicos, las CHD que expresan antígenos exógenos generadas a partir de las CHD se pueden almacenar en un tampón adecuado, p. ej., una solución conservante anticoagulante aprobada por la FDA, tal como el anticoagulante citrato-dextrosa A (ACD-A), citrato-fosfato dextrosa (CPD), citrato-fosfato-dextrosa-dextrosa (CP2D) o citrato-fosfato-dextrosa-adenina (CPDA-1). Las composiciones se pueden almacenar durante hasta 21 días.

Como alternativa, las CHD que expresan antígenos exógenos generadas a partir de las CHD se pueden almacenar en una solución aditiva aprobada, p. ej., AS-1 (Adsol), AS-3 (Nutricel), AS-5 (Optisol) o AS-7 (SOLX).

Como alternativa, las CHD que expresan antígenos exógenos generadas a partir de las CHD se pueden almacenar en una solución crioprotectora de glicerol. Las composiciones se pueden congelar y almacenar durante hasta 10 años. Las células congeladas se pueden descongelar y desgllicerolizar mediante etapas sucesivas de lavado, por ejemplo, con cloruro de sodio al 0,9 % antes de su uso.

Se proporcionan en el presente documento composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden una pluralidad de CHD cultivadas que comprenden un antígeno exógeno. Las composiciones y composiciones farmacéuticas pueden comprender una solución de tampón de almacenamiento adecuado tal como, p. ej., citrato-dextrosa anticoagulante A. Las composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden la pluralidad de CHD cultivadas que comprenden un antígeno exógeno pueden comprender adicionalmente un aditivo aprobado tal como, p. ej., Adsol. Las composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden la pluralidad de CHD cultivadas que comprenden antígeno exógeno pueden comprender adicionalmente una solución crioprotectora de glicerol para almacenamiento congeladas.

En una realización, la CHD que expresa antígeno exógeno es capaz de formar un agregado de múltiples complejos, p. ej., un dímero, un trímero, un multímero, con otra CHD que expresa antígeno exógeno.

En una realización, la CHD que expresa antígeno exógeno es capaz de formar un agregado de múltiples complejos,

p. ej., un dímero, un trímero, un multímero, con componente del sistema circulatorio, p. ej., un eritrocito, un reticulocito, una plaqueta, un macrófago, un linfocito, un linfocito T, un linfocito B, un mastocito.

La dosis y frecuencia de la administración de las CHD que expresan antígenos exógenos y composiciones farmacéuticas de las mismas pueden ser determinadas por el médico tratante basándose en diversos factores tales como la gravedad de la enfermedad, la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier inflamación, el tiempo de administración y otros factores clínicos. En un ejemplo, se inicia una administración intravenosa a una dosis que es mínimamente eficaz y la dosis se incrementa durante un periodo de tiempo preseleccionado hasta que se observa un efecto positivo. Posteriormente, se realizan incrementos progresivos de la dosis limitándose a los niveles que producen un aumento correspondiente del efecto, teniendo en cuenta al mismo tiempo cualquier efecto adverso que pueda aparecer.

Los ejemplos no limitados de dosis adecuadas pueden variar, por ejemplo, desde 1×10^3 hasta 1×10^{14} , desde 1×10^3 hasta 1×10^7 , desde 1×10^5 hasta 1×10^6 , desde 1×10^7 hasta 1×10^{11} , desde 1×10^8 hasta 1×10^9 , desde 1×10^{10} hasta 1×10^{14} , desde 1×10^{11} hasta 1×10^{13} o desde 5×10^{11} hasta 5×10^{12} CHD que expresan antígenos exógenos. Los ejemplos específicos incluyen aproximadamente 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , o CHD que expresan antígenos más exógenos. Cada dosis de CHD que expresan antígenos exógenos se puede administrar a intervalos tales como una vez al día, una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez al mes o dos veces al mes. Cada CHD puede expresar una serie de moléculas antigénicas, por ejemplo, de aproximadamente 100 a 10^7 o de aproximadamente 10^3 a 10^6 . Los ejemplos específicos incluyen aproximadamente 1000, 3000, 5000, 1×10^4 , 3×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 3×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 o más moléculas antigénicas exógenas por CHD.

La "dosis proporcional basada en CHD" es el número de CHD que expresan antígenos exógenos administradas como una dosis relativa a una cantidad natural de entidades circulantes. Las entidades circulantes pueden ser células, p. ej., eritrocitos, reticulocitos o linfocitos, o dianas, p. ej., antígenos, anticuerpos, virus, toxinas, citocinas, etc. Las unidades se definen como CHD que expresan antígenos exógenos por entidad circulante, es decir, SCMRC/CE. Esta unidad de dosificación puede incluir 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 .

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden una CHD que expresa antígeno exógeno y, opcionalmente, un agente terapéutico o farmacéuticamente activo. El agente terapéutico puede ser un agente biológico, un agente de moléculas pequeñas o un agente de ácido nucleico.

Se proporcionan formas de dosificación que comprenden una composición farmacéutica que comprende una CHD que expresa antígeno exógeno descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la forma de dosificación está formulada como una suspensión líquida para inyección intravenosa.

Se proporcionan dispositivos médicos que comprenden un recipiente que contiene una composición farmacéutica que comprende una CHD que expresa antígeno exógeno descrita en el presente documento y un aplicador para inyección intravenosa de la composición farmacéutica a un sujeto.

Se proporcionan equipos médicos que comprenden una composición farmacéutica que comprende una CHD que expresa antígeno exógeno descrita en el presente documento y un producto sanitario para inyección intravenosa de la composición farmacéutica a un sujeto.

Una suspensión farmacéuticamente aceptable de CHD que expresan antígenos exógenos se envasa preferentemente en un volumen de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 ml. El envase puede ser una jeringa o una bolsa i.v. apta para transfusiones. Se lleva a cabo la administración de la suspensión, p. ej., por inyección intravenosa o intraarterial, opcionalmente usando un gotero de una bolsa i.v. o similar. La administración se lleva a cabo normalmente por vía intravenosa en el brazo o mediante un catéter central. Para administraciones superiores a 50 ml se prefiere el uso de gotero.

Tratamiento de enfermedades

Se proporcionan procedimientos para inducir inmunotolerancia. Los procedimientos incluyen administrar a un sujeto que necesite inducción de inmunotolerancia una composición farmacéutica de células eritrocitarias que comprenden un antígeno exógeno de interés proporcionado en el presente documento en una cantidad y/o frecuencia de dosificación suficiente para inducir inmunotolerancia en el sujeto.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación proporcionan células eritrocitarias que comprenden un antígeno exógeno de interés que son útiles para promover o mejorar la inmunotolerancia. La inmunotolerancia se puede utilizar para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad, trastorno o afección asociada con la activación inmunitaria.

Las enfermedades de activación inmunitaria incluyen enfermedades autoinmunitarias, tales como, p. ej., esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, artritis reumatoide y nefritis membranosa, y las enumeradas en la tabla F. Las enfermedades de activación inmunitaria también incluyen enfermedades inflamatorias, tales como, p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca u otras enfermedades inflamatorias idiopáticas del intestino, y las enumeradas en la tabla G. Las enfermedades de activación inmunitaria también incluyen enfermedades alérgicas, tales como, p. ej., asma, alergia al cacahuete, alergia al marisco, alergia al polen, alergia a las proteínas de la leche, alergia a picaduras de insectos y alergia al látex, y las enumeradas en la tabla H. Las enfermedades de activación inmunitaria también incluyen activación inmunitaria en respuesta a una proteína terapéutica, administrada para tratar una afección primaria, que disminuye la eficacia de la proteína terapéutica, tal como, p. ej., factor de coagulación VIII en la hemofilia A, factor de coagulación IX en la hemofilia B, anticuerpos antifactor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias, glucocerebrosidasa en la enfermedad de Gaucher o asparaginasa en la leucemia linfoblástica aguda (LLA), y los enumerados en la tabla I, tabla J, tabla 5 y tabla 7.

Se proporcionan además procedimientos para tratar una enfermedad de activación inmunitaria. Los procedimientos incluyen administrar a un sujeto que necesite la inducción del tratamiento una composición farmacéutica de las células eritrocíticas que comprenden un antígeno exógeno de interés proporcionado en el presente documento en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad de activación inmunitaria. Por ejemplo, un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad de activación inmunitaria, tal como enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria o enfermedad alérgica se beneficiaría de los procedimientos de tratamiento proporcionados.

En algunas realizaciones, un paciente padece una enfermedad o afección autoinmunitaria o una enfermedad o afección mediada por autoanticuerpos, en la que el sistema inmunitario del paciente está activo contra una molécula endógena, por ejemplo, un antígeno proteico, de tal manera que el sistema inmunitario ataca la molécula endógena, induce inflamación, daña el tejido y de otro modo provoca los síntomas de la enfermedad o afecciones autoinmunitarias o de autoanticuerpos. La respuesta inmunitaria puede ser impulsada por anticuerpos que se unen a la molécula endógena o puede ser impulsada por linfocitos T hiperactivos que atacan células que expresan la molécula endógena, o puede ser impulsada por otras células inmunitarias tales como linfocitos T reguladores, linfocitos NK, linfocitos NKT o linfocitos B. En estas realizaciones, la proteína antigénica o un fragmento de la misma puede expresarse en una célula hematopoyética desnucleada de la divulgación. Una población de estas células, cuando se administra una o más veces al paciente que padece la enfermedad o afección, sería suficiente para inducir tolerancia a la proteína antigénica de modo que ya no induzca la activación del sistema inmunitario y, por tanto, trataría o aliviaría los síntomas de la enfermedad o afección subyacente.

Por ejemplo, un paciente que padece púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) adquirida tiene una enfermedad aberrante mediada por autoanticuerpos en la que se generan anticuerpos contra la proteína ADAMTS 13 endógena, lo que la hace ineficaz para realizar sus actividades de escisión del factor de von Willebrand, lo que da lugar a la formación de microtrombos en toda la vasculatura y la consiguiente trombocitopenia. En esta realización, el antígeno ADAMTS13 se expresa en una célula hematopoyética desnucleada y se administra a un paciente que padece TTP en una cantidad eficaz para inducir tolerancia a ADAMTS13, reduciendo de este modo la cantidad de autoanticuerpos anti-ADAMTS 13 inhibidores en circulación y restaurando la capacidad del cuerpo para escindir el factor de von Willebrand, reduciendo de este modo los síntomas de la enfermedad. En una realización preferida, solo el fragmento antigénico de ADAMTS13 se expresa en la célula hematopoyética desnucleada. En una realización preferida, el ADAMTS13 de longitud completa se expresa en la célula hematopoyética desnucleada. En una realización preferida, el ADAMTS13 de longitud completa se expresa en la célula hematopoyética desnucleada y es enzimáticamente activo, de modo que el producto celular administrado sea capaz tanto de inducir tolerancia como de escindir terapéuticamente el factor de von Willebrand.

En otro ejemplo, un paciente que padece síndrome anémico hemolítico atípico (SHUa) tiene una respuesta aberrante de autoanticuerpos a la proteína endógena factor del complemento H (FCH), que impide que FCH realice su función reguladora del complemento. Como resultado, se produce sobreactivación del complemento en la vasculatura que conduce a la hemólisis intravascular. En esta realización, el antígeno FCH se expresa en una célula hematopoyética desnucleada y se administra a un paciente que padece SHUa en una cantidad eficaz para inducir tolerancia a FCH, reduciendo de este modo la cantidad de autoanticuerpos anti-FCH inhibidores en circulación y restaurando la capacidad del cuerpo para inhibir la activación del complemento, reduciendo de este modo los síntomas de la enfermedad. En una realización preferida, solo el fragmento antigénico de FCH se expresa en la célula hematopoyética desnucleada. En una realización preferida, el FCH de longitud completa se expresa en la célula hematopoyética desnucleada. En una realización preferida, el FCH de longitud completa se expresa en la célula hematopoyética desnucleada y es terapéuticamente activo, de modo que el producto celular administrado sea capaz tanto de inducir tolerancia como de promover terapéuticamente la regulación del complemento.

En otro ejemplo, un paciente que padece esclerosis múltiple (EM) tiene una respuesta autoinmunitaria al polipéptido mielina que envuelve las neuronas. Como resultado, los linfocitos T atacan la mielina y la inflamación resultante provoca la desmielinización de las fibras nerviosas y deteriora la capacidad de enviar señales eléctricas a lo largo de los nervios que conducen a los síntomas de la esclerosis múltiple. En esta realización, el antígeno de mielina se expresa en una célula hematopoyética desnucleada y se administra a un paciente que padece EM en una cantidad eficaz para inducir tolerancia al antígeno de mielina, reduciendo de este modo la respuesta inmunitaria antimielina y restaurando la capacidad del cuerpo para enviar impulsos eléctricos por las fibras nerviosas mielinizadas, reduciendo

de este modo los síntomas de la enfermedad. En una realización preferida, solo uno o más fragmentos antigénicos de mielina se expresan en la célula hematopoyética desnucleada. En una realización preferida, la proteína de mielina de longitud completa se expresa en la célula hematopoyética desnucleada.

5 En otro ejemplo, un paciente que padece diabetes de tipo 1 (DT1) tiene una respuesta autoinmunitaria a las células beta de los islotes del páncreas. Como resultado, los linfocitos T destruyen las células beta de los islotes reduciendo o eliminando la capacidad del páncreas para producir y secretar insulina, lo que conduce a los síntomas y patología de la DT1. En esta realización, el antígeno de células beta se expresa en una célula hematopoyética desnucleada y se administra a un paciente que padece DT1 en una cantidad eficaz para inducir tolerancia al antígeno de células beta, reduciendo de este modo la respuesta inmunitaria anticélulas beta y restaurando la capacidad del páncreas para producir y secretar insulina, reduciendo de este modo los síntomas de la enfermedad. En una realización preferida, solo uno o más fragmentos antigénicos de antígeno de células beta se expresan en la célula hematopoyética desnucleada. En una realización preferida, la proteína de célula beta de longitud completa se expresa en la célula hematopoyética desnucleada.

15 Se proporcionan además procedimientos para reducir o aliviar una activación inmunitaria en respuesta a un régimen de tratamiento con proteínas terapéuticas. Los procedimientos incluyen administrar a un sujeto que necesite reducir o aliviar una activación inmunitaria en respuesta a un régimen de tratamiento con proteínas terapéuticas, una composición farmacéutica de las células eritrocíticas que comprenden un antígeno exógeno de interés proporcionado en el presente documento en una cantidad suficiente para reducir o aliviar la activación inmunitaria en respuesta a un régimen terapéutico de tratamiento con proteínas.

20 En algunas realizaciones, un paciente padece una enfermedad o afección para la que se puede administrar una proteína terapéutica para tratar o aliviar los síntomas de la enfermedad o afección, pero la proteína terapéutica es inmunogénica de modo que el paciente induce una respuesta inmunitaria contra la proteína terapéutica de modo que ya no es eficaz para tratar o aliviar la enfermedad original. Por ejemplo, la proteína terapéutica inmunogénica podría proceder de una fuente no humana, p. ej., bovina, porcina o de primate no humano, o de una fuente no mamífera, p. ej., de origen bacteriano, fúngico o vegetal, o la proteína terapéutica inmunogénica puede proceder de una fuente humana, pero la exposición repetitiva y la dosificación podrían ser suficientes para inducir inmunogenicidad. La respuesta inmunitaria podría ser impulsada por anticuerpos que se unen a la proteína terapéutica inmunogénica e inhiben su función (anticuerpos neutralizantes) o que se unen a la proteína terapéutica inmunogénica y desencadenan su aclaramiento por otras células inmunitarias (anticuerpos opsonizantes). En estas realizaciones, la proteína terapéutica inmunogénica o un fragmento antigénico de la misma puede expresarse en una célula hematopoyética desnucleada de la divulgación. Una población de estas células, cuando se administra una o más veces al paciente que padece la enfermedad, sería suficiente para inducir tolerancia a la proteína terapéutica inmunogénica de modo que ya no sea neutralizada u opsonizada por el sistema inmunitario. En una realización preferida, la proteína terapéutica inmunogénica expresada en la superficie de la célula hematopoyética desnucleada de la divulgación es terapéuticamente activa en la célula en circulación, de modo que la composición de célula y proteína sea capaz tanto de inducir tolerancia como de tratar o aliviar los síntomas de la enfermedad o afección subyacente cuando se administre al paciente. En otra realización preferida, el fragmento antigénico de la proteína terapéutica inmunogénica expresada en la superficie de la célula hematopoyética desnucleada de la divulgación no es terapéuticamente activo en la célula en circulación, de modo que la composición de célula y proteína sea capaz de inducir tolerancia cuando se administre al paciente, pero se administra una formulación separada de proteína terapéutica inmunogénica para tratar o aliviar los síntomas de la enfermedad o afección subyacente.

45 Por ejemplo, un paciente que padece hemofilia A requiere infusiones de factor de coagulación VIII (FVIII) para restaurar la coagulación adecuada. Sin embargo, muchos pacientes desarrollan anticuerpos neutralizantes del FVIII a pesar de ser de origen humano, lo que hace que el tratamiento sea ineficaz y conduce a un riesgo de hemorragia potencialmente mortal. En una realización, se administra una célula hematopoyética desnucleada que expresa FVIII exógeno al paciente que padece hemofilia A de modo que (1) los niveles de FVIII activo circulante se restablecen a un nivel necesario para aliviar los síntomas y prevenir hemorragias incontroladas graves, y de modo que (2) se induce tolerancia al FVIII.

50 En otro ejemplo, un paciente que padece artritis reumatoide requiere inyecciones de anticuerpo anti-TNF α para reducir la inflamación asociada con esa enfermedad. Sin embargo, los pacientes pueden desarrollar anticuerpos neutralizantes contra el anticuerpo anti-TNF α que hacen que el anticuerpo terapéutico sea ineficaz. En este caso, el paciente normalmente padece un empeoramiento de los síntomas y tiene que aumentar la dosis del anticuerpo anti-TNF α o cambiar a un anticuerpo anti-TNF α diferente con una secuencia codificante de aminoácidos diferente. En esta realización, se administra una célula hematopoyética desnucleada que expresa un fragmento antigénico de anti-TNF α a un paciente con artritis reumatoide que ha desarrollado anticuerpos neutralizantes contra el anticuerpo anti-TNF α . La composición se administra a una dosis suficiente para inducir tolerancia al anticuerpo anti-TNF α , permitiendo la administración eficaz de anti-TNF α para reducir los niveles circulantes de TNF α y de este modo reducir los síntomas de la artritis reumatoide en el paciente.

60 En otro ejemplo, un paciente que padece fenilcetonuria (PKU) es tratado con fenilalanina amoníaco liasa pegilada (PAL), una enzima no humana. El paciente desarrolla anticuerpos opsonizantes y neutralizantes contra PAL que también inducen una reacción alérgica tras la administración de la proteína terapéutica. Esta respuesta inmunitaria no

solo hace que la PAL sea ineficaz, también pone en peligro la salud del paciente. En una realización, se administran células hematopoyéticas desnucleadas que expresan PAL exógena a un paciente que padece PKU en una cantidad suficiente para inducir tolerancia a PAL. En una realización preferida, la PAL expresada en células es activa en la célula y la composición es capaz de reducir los niveles circulantes de fenilalanina y tratar o aliviar los síntomas de la fenilcetonuria además de prevenir una reacción inmunitaria peligrosa contra la PAL. En otra realización preferida, un fragmento antigénico de PAL se expresa en la célula hematopoyética desnucleada y este fragmento expresado en células no es terapéuticamente activo, de modo que se administra al paciente una formulación separada de PAL para tratar o aliviar los síntomas de la fenilcetonuria. La composición de células inductoras de tolerancia se puede administrar antes de administrar la formulación terapéutica de PAL o la composición de células inductoras de tolerancia se puede administrar simultáneamente con la administración de la formulación terapéutica de PAL.

En algunas realizaciones, un paciente padece una enfermedad alérgica, por ejemplo, una alergia a la caspa animal, nogal negro, nuez de Brasil, anacardo, castaña, ácaros del polvo, huevo, pescado, avellana, veneno de insectos, látex, leche, moho, cacahuetes, polen, hierba, marisco, soja, nueces arbóreas o trigo. Un paciente que padece una alergia puede generar una respuesta inmunitaria al entrar en contacto con el fragmento antigénico del alérgeno, por ejemplo, a través de la dieta, contacto con la piel, inyección o exposición ambiental. La respuesta inmunitaria puede implicar anticuerpos IgE, mastocitos sensibilizados, desgranulación, liberación de histamina y anafilaxia, así como células inmunitarias canónicas como linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, linfocitos T reguladores, linfocitos NK, neutrófilos y linfocitos NKT. La reacción alérgica puede provocar malestar o puede ser lo suficientemente grave como para provocar la muerte y, por tanto, requiere vigilancia constante por parte del paciente, así como de su familia y cuidadores. En estas realizaciones, la proteína antigénica o un fragmento de la misma puede expresarse en una célula hematopoyética desnucleada de la divulgación. Una población de estas células, cuando se administra una o más veces al paciente que padece la enfermedad o afección alérgica, sería suficiente para inducir tolerancia a la proteína antigénica de modo que ya no induzca la activación del sistema inmunitario tras la exposición y, por tanto, trataría o aliviaría los síntomas de la enfermedad o afección alérgica subyacente.

En un ejemplo, un paciente que padece alergia al cacahuete tiene una respuesta inmunitaria después de la exposición al antígeno AraH1 del cacahuete. En esta realización, AraH1 se expresa en una célula hematopoyética desnucleada y se administra a un paciente que padece alergia al cacahuete en una cantidad eficaz para inducir tolerancia al antígeno AraH1, reduciendo de este modo la respuesta inmunitaria alérgica y restaurando la capacidad del individuo para consumir cacahuetes de manera segura, reduciendo de este modo los síntomas de la enfermedad. En una realización preferida, solo uno o más fragmentos antigénicos de AraH1 se expresan en la célula hematopoyética desnucleada. En una realización preferida, la proteína AraH1 de longitud completa se expresa en la célula hematopoyética desnucleada.

Determinados aspectos de la divulgación se refieren a CHD que comprenden un antígeno que es reconocido por células inmunitarias en enfermedades mediadas por discrepancias de antígenos leucocitarios humanos (HLA), tal como, p. ej., enfermedad del injerto contra el hospedador o rechazo de trasplante de órganos.

En algunas realizaciones, un paciente padece una enfermedad o afección de discrepancia de antígeno leucocitario humano (HLA) en la que las células inmunitarias se activan contra antígenos HLA en un tejido y atacan el tejido. Esto sucede habitualmente después del trasplante alogénico de un órgano o tejido de un donante que no es una coincidencia perfecta y conduce a la afección médica de rechazo del trasplante, en el que el sistema inmunitario del paciente ataca el tejido u órgano extraño y provoca la muerte del órgano o tejido trasplantado. Otra afección común de discrepancia de HLA es la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) en la que un paciente ha recibido un trasplante alogénico de médula ósea de un donante que no es perfectamente coincidente y en el que las células inmunitarias trasplantadas (injerto) se activan y atacan los órganos receptores (huésped), que son reconocidos como extraños, provocando daños en los tejidos y órganos del huésped, lo que conduce a graves consecuencias, incluyendo la muerte. La activación inmunitaria por discrepancia de HLA está mediada habitualmente por linfocitos T, pero también puede implicar linfocitos T reguladores, linfocitos NK, linfocitos NKT, linfocitos B, anticuerpos, células dendríticas, monocitos, macrófagos y neutrófilos. En estas realizaciones, la molécula de ADN antigénica o un fragmento de la misma puede expresarse en una célula hematopoyética desnucleada de la divulgación. Una población de estas células, cuando se administra una o más veces al paciente que padece la enfermedad o afección por discrepancia de HLA, sería suficiente para inducir tolerancia a la molécula de HLA antigénica de modo que ya no induzca la activación del sistema inmunitario y, por tanto, trataría o aliviaría los síntomas de la enfermedad o afección por discrepancia de HLA, por ejemplo, la supervivencia del órgano trasplantado o la supervivencia del paciente. En una realización preferida, la molécula de HLA expresada en la superficie de la célula también contiene un péptido cargado en la molécula de HLA.

Las células eritrocíticas que comprenden un antígeno exógeno que se usan para los procedimientos descritos en el presente documento pueden obtenerse de forma autóloga, es decir, del mismo sujeto, o pueden obtenerse de forma alogénica, es decir, de un donante de células diferente.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto, por ejemplo, mediante transfusión intravenosa o inyección intramuscular.

Otras realizaciones

Debe entenderse que la presente divulgación no se limita a procedimientos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es únicamente con el fin de describir aspectos particulares y no se pretende que sea limitante.

- 5 Todas las características desveladas en la presente memoria descriptiva pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica desvelada en la presente memoria descriptiva puede reemplazarse por una característica alternativa que cumpla el mismo fin, uno equivalente o similar. Por tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada característica desvelada es solo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.
- 10 En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno que comprende un antígeno exógeno CR1 no se genera en un ratón y/o no se genera a partir de células eritroides de ratón. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno que comprende un antígeno exógeno CR1 no se genera en un animal de laboratorio y/o no se genera a partir de células eritroides procedentes de un animal de laboratorio. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno se genera a partir de megacariocitos o plaquetas. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno se genera a partir de una célula eritroide, tal como, p. ej., un eritrocito o un reticulocito. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no se genera a partir de un neutrófilo, un eosinófilo o un basófilo. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no se genera a partir de un monocito o macrófago. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no se genera a partir de una célula madre hematopoyética CD34⁺Thy-1⁺ o poblaciones de células enriquecidas en células CD34⁺Lin⁻ o CD34⁺Thy-1+Lin⁻.
- 15 En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda un dominio extracelular de un correceptor de VIH. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno capaz de unirse a un virus. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda CD4. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda un correceptor de VIH. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda CXCR4, CCR5, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR8, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR6, GPR15, APJ, CMKLR1 o CX3CR1 o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no contiene un ácido nucleico exógeno que codifique un antígeno de adenosina desaminasa. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda adenosina desaminasa (ADA).
- 20 En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un ácido nucleico exógeno que codifique un oncogén. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda oncogenes. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no contiene un ácido nucleico exógeno que codifique cdx1, cdx2 o cdx4. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda cdx1, cdx2 o cdx4, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda un polipéptido quimérico que comprenda un dominio de unión a ligando. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda un dominio S que sea capaz de unirse a un ligando. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda CD3 ζ , CD3 η , un receptor de IL-2, un receptor de IL-3, un receptor de IL-4, un receptor de IL-7, un receptor de IL-11, un receptor de IL-13, un receptor de GM-CSF, un receptor de LIF, un receptor de CNTF, un receptor de oncostatina M, un receptor de TGF- β , un receptor de EGF, ATR2/neu, un HER2/neu, un HER3/c-erbB-3, Xmrk, un receptor de insulina, un receptor de IGF-1, IRR, receptor de PDGF, un receptor de CSF-1, c-kit, STK-1/flk-2, un receptor de FGF, flg, bek, un receptor de NGF, Ror1 y Ror2 o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda genes E6 o E7 del virus del papiloma humano. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda glucocerebrosidasa. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda asparaginasa. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda arginina desiminasa. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende una molécula de fusión capaz de promover la fusión de la CHD que expresa antígeno exógeno a una célula diana que es i) diferente y/o ii) actúa independientemente del antígeno exógeno, en el que el antígeno exógeno es capaz de interactuar con una diana. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un antígeno exógeno que comprenda sincitina-1. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un compuesto sintético fotosensible, tal como, p. ej., un compuesto que pueda activarse mediante fotones o compuestos inactivables. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un agente de detección molecular activable capaz de producir una respuesta detectable. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un compuesto de diagnóstico. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende un virus o una bacteria. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no se genera a partir de una célula CD34⁺ autóloga o no la comprende. En algunas realizaciones, los procedimientos de tratamiento y prevención que usan CHD que expresan antígenos exógenos generadas a partir de células eritroides descritas en el presente documento no comprenden la etapa de detectar la célula eritroide *in vivo*, p. ej., a través de un agente de detección que está asociado con la célula eritroide. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no se genera a partir de una célula madre hematopoyética pluripotente de un donante humano. En

algunas realizaciones, una población de CHD que expresan antígenos exógenos no se expande en un biorreactor. En algunas realizaciones, la población de CHD que expresan antígenos exógenos después de la expansión y/o diferenciación no comprende una única especie de células sanguíneas humanas diferenciadas. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no es una célula sanguínea humana madura diferenciada. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no se genera a partir de una célula sanguínea procedente de un donante universal, p. ej., grupo sanguíneo 0, factor Rh negativo. En algunas realizaciones, una CHD que expresa un antígeno polipeptídico ADA exógeno no se usa para tratar la inmunodeficiencia combinada grave (ADA-SCID). En algunas realizaciones, los procedimientos de expansión y diferenciación de las CHD que expresan antígenos exógenos no incluyen el cultivo de las CHD que expresan antígenos exógenos en un medio que comprende un ligando del receptor mieloproliferativo (mpl). En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende una carga útil que comprenda un análogo nucleosídico trifosforilado sintético. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende una carga útil que comprenda 2',3'-didesoxicidina-5'-trifosfato (dd-CTP) y/o 3'-azido-3'-desoxitimidina-5'-trifosfato (AZT-TP)). En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no comprende una carga útil que comprenda un bisfosfonato. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno se genera poniendo en contacto una célula eritroide con un antígeno exógeno y, opcionalmente, una carga útil sin lisar y volviendo a sellar las células para incorporar el antígeno exógeno y/o la carga útil. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno se genera al poner en contacto una célula eritroide con un antígeno exógeno y, opcionalmente, una carga útil, en la que el contacto no comprende diálisis hipotónica. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno se genera al poner en contacto una célula eritroide con un antígeno exógeno y, opcionalmente, una carga útil, en la que el contacto no incluye cargar el antígeno exógeno y/o la carga útil en o sobre la célula eritroide. En algunas realizaciones, el antígeno exógeno se genera en una entidad que no es la célula eritroide que se va a poner en contacto y/o el antígeno exógeno se aísla de una muestra que no comprende la célula eritroide que se va a poner en contacto. Por ejemplo, para un antígeno exógeno polipeptídico, las entidades adecuadas incluyen una línea celular, un sistema de expresión *in vitro*, un sistema de expresión bacteriano, etc.

En algunas realizaciones, el polipéptido antigénico exógeno expresado por la CHD está presente en la superficie de la CHD pero no está unido de forma no covalente con la superficie de la CHD. En algunas realizaciones, la unión no covalente del antígeno a la superficie de la CHD no está mediada por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un polipéptido de tipo anticuerpo o un armazón de unión a un polipéptido que no es un anticuerpo. En algunas realizaciones, la unión no covalente del antígeno exógeno a la superficie de la CHD no está dirigida contra un antígeno de células eritroides tal como banda 3 (CD233), acuaporina-1, Glut-1, antígeno de Kidd, RhAg/Rh50 (CD241), Rh (CD240), Rh30 CE (CD240CE), Rh30D (CD240D), Kx, glucoforina B (CD235b), glucoforina C (CD235c), glucoforina D (CD235d), Kell (CD238), Duffy/DARci (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), globósido, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2 (CD99), EMMPRIN/neurotelina (CD147), JMH, glucosiltransferasa, Cartwright, Dombrock, C4A/CAB, Scianna, MER2, estomatina, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD108, CD139 y antígeno H (CD173), u otro resto de unión a eritrocitos.

En algunas realizaciones, el polipéptido antigénico exógeno no se genera aparte de la CHD y después se conjuga con la CHD. En algunas realizaciones, el polipéptido antigénico exógeno no está conjugado enzimáticamente, p. ej., a través de una reacción de formación de enlaces isopeptídicos autocatalíticos tal como la llevada a cabo, p. ej., por una transpeptidasa, una sortasa y/o isopeptidasa. En una realización, el polipéptido antigénico exógeno no se conjuga enzimáticamente usando una sortasa.

En algunas realizaciones, el polipéptido antigénico exógeno no está conjugado químicamente, p. ej., a través de un agente de reticulación tal como una carbodiimida (incluyendo sortasa 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)).

En una realización, el antígeno exógeno no se genera aparte de la CHD y después es encapsulado por la CHD. En una realización, la encapsulación del antígeno exógeno no está mediada por diálisis hipotónica de la CHD en presencia de antígeno exógeno.

Muchas modificaciones y otras realizaciones se le ocurrirán fácilmente a una persona experta en la materia a la que pertenece la presente divulgación que tenga el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. Por lo tanto, debe entenderse que la invención no se limita a las realizaciones específicas desveladas y que se pretende incluir modificaciones y otras realizaciones dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Aunque se emplean en el presente documento términos específicos, estos se usan únicamente en un sentido genérico y descriptivo y no con fines limitativos.

Como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contenido indique claramente otra cosa.

El uso de la alternativa (p. ej., "o") debe entenderse en el sentido de una, ambos o cualquier combinación de los mismos de las alternativas.

Se entiende que el término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, cuando hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, abarca variaciones de hasta $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$,

más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$ y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ con respecto al valor especificado, ya que dichas variaciones son adecuadas para realizar los procedimientos desvelados.

5 Como se usan en el presente documento, debe entenderse que cualquier intervalo de concentraciones, intervalo de porcentajes, intervalo de relaciones o intervalo de números enteros incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando sea adecuado, fracciones de los mismos (tal como una décima y una centésima parte de un número entero), a menos que se indique otra cosa.

10 "Comprender", "que comprende", y "comprende" y "compuesto por", como se usan en el presente documento, son sinónimos de "incluir", "que incluye", "incluye" o "contener", "que contiene", "contiene" y son términos inclusivos o abiertos que especifican la presencia de lo que sigue, p. ej., componente y no excluyen ni impiden la presencia de elementos componentes, características, elementos, miembros, etapas no citados, adicionales, conocidos en la técnica o desvelados en la misma.

Como se usan en el presente documento, se entiende que las expresiones "tal como", "por ejemplo" y similares hacen referencia a realizaciones ilustrativas y no limitan el ámbito de la presente divulgación.

15 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la divulgación. Aunque en la práctica para el análisis de la presente divulgación también se puede usar cualquier procedimiento y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen en el presente documento materiales y procedimientos preferidos.

20 Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Ninguna parte del presente documento debe interpretarse como una admisión de que los inventores descritos en el presente documento no tienen derecho a tener fecha anterior a dicha divulgación en virtud de una invención anterior o por cualquier otro motivo.

Definiciones

25 "Administración", "administrar" y variantes de las mismas significan introducir una composición, tal como una CHD que expresa antígeno exógeno o un agente en un sujeto e incluye la introducción simultánea y secuencial de una composición o agente. La introducción de una composición o agente en un sujeto es por cualquier vía adecuada, incluyendo por vía oral, pulmonar, intranasal, parenteral (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea), rectal, intralinfática o tópica. La administración incluye la autoadministración y la administración por parte de otro. Una vía de administración adecuada permite que la composición o el agente realice su función deseada. Por ejemplo, si una vía adecuada es la intravenosa, la composición se administra introduciendo la composición o el agente en una vena del sujeto. La administración puede llevarse a cabo por cualquier vía adecuada.

35 "Anclaje" o "dominio de anclaje" o "dominio A" se usa para hacer referencia a la parte de un polipéptido antigénico exógeno, incluyendo un polipéptido antigénico exógeno quimérico o de fusión que está en contacto con la membrana celular de una CHD. El polipéptido antigénico exógeno puede interactuar con la capa de la membrana celular lipídica a través de una inserción de cola de fosfolípidos, unión covalente a un constituyente de la capa lipídica, un enlace iónico, enlace de hidrógeno o mediante un dominio polipeptídico transmembrana de paso único o múltiple que cruza una o más de las capas de la membrana celular lipídica.

40 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca una inmunoglobulina, ya sea natural o producida de forma parcial o totalmente sintética, y fragmentos de la misma. El término también abarca cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo a un dominio de unión a inmunoglobulina. Estas proteínas pueden proceder de fuentes naturales o producirse de forma parcial o totalmente sintética. "Anticuerpo" incluye además un polipéptido que comprende una región marco conservada de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une específicamente a y reconoce un antígeno. Se entiende que el uso del término anticuerpo incluye anticuerpos completos, anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes, fragmentos de los mismos, e incluye además anticuerpos monocatenarios, anticuerpos humanizados; anticuerpos murinos; anticuerpos quiméricos, de ratón-ser humano, de ratón-primate, de primate-ser humano monoclonales, anticuerpos antiidiotípicos, fragmentos de anticuerpos, tales como, p. ej., fragmentos scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' y F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb y Fd, diacuerpos y polipéptidos relacionados con anticuerpos. El anticuerpo incluye anticuerpos biespecíficos y anticuerpos multiespecíficos siempre que presenten la actividad o función biológica deseada.

50 La expresión "fragmento de unión a antígeno" usada en el presente documento se refiere a fragmentos de una inmunoglobulina intacta y cualquier parte de un polipéptido, incluyendo las regiones de unión a antígeno que tienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede ser un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fab, un fragmento Fv o un fragmento scFv, pero sin limitación. Un fragmento Fab tiene un sitio de unión a antígeno y contiene las regiones variables de una cadena ligera y una cadena pesada, la región constante de la cadena ligera y la primera región constante CH1 de la cadena pesada. Un fragmento Fab' se diferencia de un fragmento Fab en que el fragmento Fab' incluye adicionalmente la región bisagra de la cadena pesada, incluyendo al menos un resto de cisteína en el extremo C de la región CH1 de cadena pesada. El fragmento F(ab')₂ se produce de modo que los restos de cisteína del fragmento Fab' se unen mediante un enlace

disulfuro en la región bisagra. Un fragmento Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que tiene solo regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera, y se conoce bien en este campo una técnica recombinante para producir el fragmento Fv. Los fragmentos Fv de dos cadenas pueden tener una estructura en la que las regiones variables de cadena pesada están unidas a regiones variables de cadena ligera mediante un enlace no covalente. Los fragmentos Fv de una sola cadena (scFv) pueden tener en general una estructura dimérica como en los fragmentos Fv de dos cadenas en los que las regiones variables de cadena pesada se unen covalentemente a las regiones variables de cadena ligera mediante un conector peptídico o las regiones variables de cadena pesada y ligera están unidas directamente entre sí en el extremo C de las mismas. El fragmento de unión a antígeno se puede obtener usando una proteasa (por ejemplo, un anticuerpo completo se digiere con papaína para obtener fragmentos Fab y se digiere con pepsina para obtener fragmentos F(ab')₂) y se puede preparar mediante una técnica recombinante genética. Un fragmento dAb consiste en un dominio VH. Las moléculas de anticuerpos monocatenarios pueden comprender un polímero con varias moléculas individuales, por ejemplo, dímero, trímero u otros polímeros.

"Aplicador" se refiere a cualquier dispositivo usado para conectarse a un sujeto. Esto incluye, p. ej., agujas, cánulas, catéteres y tubos.

"Asociado con" cuando se usa para describir las relaciones entre múltiples compuestos o moléculas abarca tales como, p. ej., cualquier interacción entre un antígeno exógeno y una diana o entre un antígeno exógeno que expresa CHD y una diana. Esto incluye interacción enzimática, unión iónica, unión covalente, unión no covalente, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Londres, fuerzas de van der Waals, interacción hidrófoba, interacciones lipófilas, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas y similares.

"Asociado con" cuando se usa para describir las relaciones entre una diana, entidad, compuesto, agente o molécula y una enfermedad, trastorno, afección, síntoma o fenotipo es cualquier vínculo que pueda establecerse razonablemente entre ellos, incluyendo un vínculo causal o un vínculo estadístico significativo, un vínculo establecido empíricamente, un vínculo sugerido, sea o no causante de la enfermedad, trastorno, afección, síntoma o fenotipo.

Los "trastornos autoinmunitarios" son en general afecciones en las que el sistema inmunitario de un sujeto ataca las propias células del cuerpo, provocando destrucción de tejido. Los trastornos autoinmunitarios se pueden diagnosticar usando análisis de sangre, análisis de líquido cefalorraquídeo, electromiograma (mide la función muscular) y captura de imágenes por resonancia magnética del cerebro, pero la prueba de anticuerpos en la sangre, para autoanticuerpos (o anticuerpos propios) es particularmente útil. Habitualmente, los anticuerpos de clase IgG están asociados con enfermedades autoinmunitarias.

"Unión" describe una interacción entre compuestos o moléculas, p. ej., entre un antígeno exógeno y una diana o entre una CHD que expresa antígeno exógeno y una diana, que se produce por unión covalente o unión no covalente, incluyendo unión iónica, interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Londres, fuerzas de van der Waals, interacción hidrófoba, interacciones lipófilas y similares.

La "actividad biológica de un polipéptido" se refiere a cualquier actividad molecular o fenotipo (tal como, p. ej., unión, transducción de señales, catalítico, etc.) que es provocada por el polipéptido, tal como un polipéptido antigénico exógeno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier tipo de material de origen biológico aislado de un sujeto, incluyendo, por ejemplo, ADN, ARN, lípidos, hidratos de carbono y proteínas. La expresión "muestra biológica" incluye tejidos, células y líquidos biológicos aislados de un sujeto. Las muestras biológicas incluyen, p. ej., pero sin limitación, sangre completa, plasma, suero, semen, saliva, lágrimas, orina, materia fecal, sudor, yugal, piel, líquido cefalorraquídeo, médula ósea, bilis, pelo, biopsia muscular, tejido de órganos u otro material de origen biológico conocido por los expertos en la materia. Las muestras biológicas se pueden obtener de, p. ej., biopsias de órganos internos o de cánceres. Pueden obtenerse muestras biológicas de sujetos para diagnóstico o investigación o pueden obtenerse de sujetos sanos, como controles o para investigación básica.

La "tasa de aclaramiento" como se usa en el presente documento se calcula midiendo la cantidad o concentración de, p. ej., antígeno exógeno, antígeno diana exógeno o CHD que expresan antígenos exógenos que permanecen en el sistema circulatorio de un sujeto a lo largo del tiempo. Por ejemplo, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de la diana detectada en una primera muestra aún puede detectarse en una segunda muestra que se toma 1 hora, 5 horas, 10 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 2 años, 3 años, 4 años o 5 años después. La tasa de aclaramiento puede expresarse de forma alternativa como: número de entidades (p. ej., antígeno diana/exógeno) por unidad de tiempo (p. ej., por día). Un aumento de la tasa de aclaramiento es una tasa mayor que la presentada en un sujeto de control adecuado sano o sin tratar. Una disminución de la tasa de aclaramiento es una tasa menor que la mostrada en un sujeto de control adecuado sano o sin tratar. El aumento o la disminución puede ser del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 500 %, 1000 % o puede ser 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces.

"Escisión", como se usa en el presente documento, es un proceso que interrumpe una interacción de unión presente en una diana, tal como un polipéptido o ácido nucleico, p. ej., para producir dos o más entidades que, después de la escisión, pueden separarse entre sí. La separación puede implicar, p. ej., romper un enlace iónico, un enlace covalente, un enlace covalente polar, un enlace covalente no polar o un enlace metálico. Como la escisión se aplica a dianas polipeptídicas, la escisión puede implicar romper uno o más enlaces peptídicos. Como la escisión se aplica a dianas de moléculas pequeñas, la escisión puede implicar romper uno o más enlaces de carbono o sulfuro. Como la escisión se aplica a secuencias de nucleótidos, la escisión puede implicar romper uno o más enlaces fosfodiéster. Como la escisión se aplica a microbios tales como bacterias, hongos o virus, la escisión puede implicar la lisis de una membrana o estructura de la cápside. La escisión puede llevarse a cabo mediante una enzima, p. ej., un polipéptido antigénico exógeno catalíticamente activo. Los antígenos exógenos pueden comprender, p. ej., actividad exonucleasa, endonucleasa o proteasa.

El "sistema circulatorio de un sujeto", como se usa en el presente documento, abarca el espacio ocupado por la sangre completa y, opcionalmente, el sistema linfático en un ser humano, incluyendo el plasma y todas las células y moléculas circulantes, y distribuido por las arterias, venas, capilares y vasos linfáticos de todos los tejidos. La "concentración circulatoria" es la concentración de una diana, p. ej., una célula, polipéptido (tal como un anticuerpo, antígeno patógeno, etc.), agente terapéutico, molécula pequeña, metabolito u otra entidad, un antígeno exógeno o una CHD que expresa antígeno exógeno en el espacio definido como sistema circulatorio. En determinadas realizaciones, la concentración se puede definir como el número de entidades libres (sin unir) en un volumen dado. En otras realizaciones, la concentración se puede definir como el número total de entidades en un volumen dado.

La expresión "región determinante de complementariedad (CDR)" usada en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos que se encuentra en la región variable de una cadena pesada o una cadena ligera de una inmunoglobulina. Las CDR determinan la especificidad de un anticuerpo y pueden proporcionar un resto de contacto para unión a un epítipo específico de un antígeno. La cadena pesada y la cadena ligera pueden incluir, respectivamente, tres CDR (CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y CDRL1, CDRL2 y CDRL3). Cuatro regiones marco conservadas, que tienen secuencias de aminoácidos más conservadas que las CDR, separan las regiones CDR en la VH o VL.

Un "complejo", como se usa en el presente documento, comprende una asociación de dos o más entidades. Un complejo puede comprender uno o más polipéptidos, ácido nucleico, lípidos, hidratos de carbono, compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos y similares. Un complejo puede ser funcional (polipéptidos de múltiples unidades) o no funcional (p. ej., agregados o precipitados) y puede tener propiedades beneficiosas o perjudiciales (p. ej., inmunocomplejos). Los complejos pueden ser de origen natural o pueden ser sintéticos o artificiales. Los complejos sintéticos incluyen entidades de orden superior, p. ej., estructuras subcelulares y células si comprenden un compuesto o molécula sintético.

Con respecto a secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteren, añadan o supriman un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservativa" en la que la alteración da lugar a la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Como se usa en el presente documento, la expresión "sustitución conservadora de aminoácidos" se ilustra mediante una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparagina, y (6) lisina, arginina e histidina.

"Disminución", en el contexto de un síntoma de una enfermedad, trastorno o afección tratado, se refiere a una reducción en parámetros medibles o expresables asociados con la enfermedad o afección que se manifiesta como síntomas. Son ejemplos de parámetros medibles una reducción de la temperatura corporal del sujeto, una reducción de la concentración de dianas en una muestra tomada del sujeto, reducción de la intensidad de la inflamación o del tamaño de un área inflamada, reducción del número de células infiltrantes, reducción del número de episodios asociados con la enfermedad, trastorno o afección, aumento/disminución del tamaño de los órganos, aumento/pérdida de peso, etc. Son ejemplos de parámetros expresables, p. ej., la evaluación del propio sujeto del bienestar y la calidad de vida. Por ejemplo, para enfermedades mediadas por autoanticuerpos, la disminución puede cuantificarse como una, o una combinación de, los siguientes parámetros: reducción de la inflamación, reducción de los brotes, reducción de la fatiga, reducción de la coagulación sanguínea, reducción de la inflamación, aumento de la energía o aumento del crecimiento del cabello, etc. Los parámetros que pueden cuantificarse son los adecuados para evaluar la enfermedad, trastorno o afección específico que se trate. El retardo, en el contexto de los síntomas de una enfermedad, trastorno o afección tratado, se refiere a la extensión significativa de una afección tratable que de otro modo se agravaría, usando un tratamiento.

La "degradación" se define como el proceso en el que una diana, directa o indirectamente, se reduce, inactiva, descompone, desmonta, lisa, disuelve, rompe, reduce, daña, debilita, deteriora, disminuye o divide.

El "origen polipeptídico diferente" se refiere al organismo o especie del que se obtiene una secuencia genética que codifica el polipéptido, el polipéptido o parte del mismo. En determinadas realizaciones, una fusión que comprende polipéptidos de diferente origen polipeptídico puede incluir un polipéptido antigénico exógeno que está codificado por

la secuencia genética de la adenosina desaminasa humana y la secuencia genética de la fenilalanina hidroxilasa de *Chromobacterium violaceum*.

5 Un "dominio" es una parte de un polipéptido, tal como un polipéptido antigénico exógeno que tiene en general una estructura tridimensional y puede presentar una actividad, función, tal como, p. ej., una función catalítica, enzimática, estructural, o una función de unión definidas.

10 Por "población enriquecida de células" se entiende una población de células que está compuesta sustancialmente por una célula particular de interés. En una población enriquecida, el 50 % o más de las células de la población son las células de interés, p. ej., 50 %, 60 %, 70 %, habitualmente 80 %, 85 %, 90 %, más habitualmente 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, en ocasiones hasta el 100 % de las células de la población. La separación de células de interés de una mezcla compleja o cultivo heterogéneo de células puede realizarse mediante cualquier medio conveniente conocido en la técnica, por ejemplo, mediante técnicas de separación por afinidad tales como separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas con un reactivo de afinidad, cromatografía de afinidad o "cribado" con un reactivo de afinidad unido a una matriz sólida, p. ej., placa, u otra técnica conveniente. Otras técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen clasificadoras de células activadas por fluorescencia, que puede tener distintos grados de sofisticación, tales como canales de múltiples colores, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso, canales de impedancia, etc. Las células pueden seleccionarse frente a células muertas empleando colorantes asociados con células muertas. Puede emplearse cualquier técnica que no sea excesivamente perjudicial para la viabilidad de las células deseadas.

20 La "desnucleación" es la transformación de una célula en un estado no replicativo, ya sea mediante inactivación o eliminación del núcleo.

25 Un "epítipo" incluye cualquier segmento de un antígeno al que se una un anticuerpo u otro ligando o molécula de unión. Un epítipo puede consistir en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, habitualmente, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. En algunas realizaciones, los antígenos exógenos comprenden epítopos específicos. En algunas realizaciones, las dianas comprenden epítopos específicos.

30 Las "células eritroides", como se usa en el presente documento, incluyen glóbulos rojos nucleados, precursores de glóbulos rojos y glóbulos rojos desnucleados y los enumerados en la tabla A1. Por ejemplo, las células eritroides son una célula madre de la sangre del cordón umbilical, una célula CD34+, una célula madre hematopoyética (CMH), una célula formadora de colonias del bazo (UFC-B), una célula progenitora mielóide común (PMC), una célula formadora de colonias de blastocitos, una unidad formadora de brote eritroide (UFB-E), una célula progenitora eritroide-megacariocítica (PEM), una unidad formadora de colonias eritroides (UFC-E), un reticulocito, un eritrocito, una célula madre pluripotente inducida (iPSC), una célula madre mesenquimatosas (CMM), un normoblasto policromático, un normoblasto ortocromático o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las células eritroides son células inmortales o inmortalizadas. Por ejemplo, se pueden generar eritroblastos inmortalizados mediante transducción retroviral de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ para expresar Oct4, Sox2, Klf4, cMyc y suprimir TP53 (p. ej., como se describe en Huang y col., Mol Ther 2013, publicación electrónica antes de impresión el 3 de septiembre). Además, las células pueden estar destinadas a uso autólogo o proporcionar una fuente para transfusión alogénica. Las células eritroides pueden ponerse en contacto con un antígeno exógeno para generar una CHD que expresa antígeno exógeno. Las células eritroides que comprenden un antígeno exógeno son un ejemplo de una CHD que expresa antígeno exógeno. En algunas realizaciones, se cultivan células eritroides. En algunas realizaciones, las células progenitoras eritroides se ponen en contacto con un antígeno exógeno para generar una CHD que expresa antígeno exógeno.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula tromboide" se refiere a una célula del linaje de células madre-megacariocitos-plaquetas, incluyendo, por ejemplo, megacariocitos y plaquetas, o células en las que se induce diferenciación por trombopoyetina, o células que expresan marcadores de superficie asociados con este linaje, por ejemplo, CD41 (GP IIb/IIIa), CD42a (GPIX), CD42b (GPIb) y CD61 (avb3, receptor de vitronectina), PAC-1 (IIb/IIIa activado), CD62P (P-selectina), CD31 (PECAM) y CD63.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula hematopoyética desnucleada" (CHD) se refiere a una célula hematopoyética, humana o no humana, que está o se ha vuelto desnucleada como se define en el presente documento. Esta definición abarca tanto las "células eritroides" como las "células tromboides" como se definen en el presente documento.

55 Como se usa en el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero sin limitación, carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, anticoagulantes y polietilenglicoles.

El término "exógeno" como se usa en el presente documento significa un componente o función celular que es generado por un hidrato de carbono, polisacárido, lípido, oligonucleótido o polipéptido que no se encuentra naturalmente dentro de una célula o la mejora o manipulación de un componente o función celular que es endógeno

para una célula, incluyendo, p. ej., una proteína de fusión que comprende un antígeno polipeptídico exógeno y una proteína endógena o un fragmento funcional de la misma. El antígeno exógeno, incluyendo un polipéptido antigénico exógeno, es "exógeno" o "heterólogo", por lo que puede que no exista de forma natural, tal como una fusión o quimera que comprende dominios de diferente origen polipeptídico o de especie, puede que no se produzca de forma natural en una célula de origen natural, tal como un eritrocito o plaqueta sin modificar, puede que no actúe de la misma manera que un polipéptido natural o puede que no se produzca de forma natural en la cantidad en que se produce el polipéptido antigénico exógeno, p. ej., en realizaciones en las que el antígeno exógeno está sobreexpresado en comparación con la expresión de un polipéptido de origen natural en una célula sin modificar. En algunas realizaciones, el antígeno exógeno polipeptídico se expresa a partir de un ácido nucleico exógeno. En algunas realizaciones, el antígeno exógeno se aísla de una fuente y se carga en o se conjuga con una CHD que expresa antígeno exógeno. El término "exógeno" cuando se usa en el contexto de ácido nucleico incluye un transgén y ácidos nucleicos recombinantes.

Como se usa en el presente documento, el término "expresión" o "expresar" se refiere al proceso para producir un polipéptido, tal como un polipéptido antigénico exógeno, que incluye transcripción y traducción. La expresión puede aumentarse, p. ej., por varios enfoques, incluyendo: aumento del número de genes que codifican el polipéptido, aumento de la transcripción del gen (tal como colocando el gen bajo el control de un promotor constitutivo), aumento de la traducción del gen, desactivación de un gen competitivo o una combinación de estos y/u otros enfoques. El término "expresión" o "expresar" también incluye CHD que comprenden un polipéptido exógeno que en un momento fue expresado activamente por la CHD, pero la expresión activa (definida como transcripción y traducción) ha cesado desde entonces. Por ejemplo, el polipéptido antigénico exógeno fue expresado activamente (es decir, transcrito y traducido) por una CHD antes del acontecimiento de desnucleación y el polipéptido antigénico es retenido por la CHD después de la desnucleación pero ya no se expresa activamente, p. ej., por falta de ácido nucleico codificante. Por ejemplo, la CHD puede comprender un polipéptido antigénico exógeno codificado por un ácido nucleico exógeno. Durante la desnucleación, la CHD retiene el polipéptido antigénico exógeno, mientras que el ácido nucleico exógeno no se retiene, se dice que dicha CHD "expresa antígeno" o tiene "expresión de antígeno" incluso en el caso de que la expresión activa (transcripción y traducción) del polipéptido antigénico se interrumpa de hecho y/o la CHD no contenga una cantidad sustancial de un ácido nucleico replicante.

Un antígeno exógeno "funcional" o CHD que expresa antígeno exógeno presenta una actividad o característica deseada o especificada, incluyendo actividad enzimática, catalítica o metabólica, integridad estructural, complementariedad inmunogénica, unión a diana y localización correcta o es capaz de promover un efecto o fenotipo deseado o especificado.

La "fusión o quimera" es una secuencia polipeptídica, o la secuencia de nucleótidos codificante correspondiente, que procede de la combinación de dos o más secuencias que no se encuentran juntas en la naturaleza. Esta puede ser una combinación de secuencias separadas procedentes de genes separados dentro del mismo genoma o de genes heterólogos procedentes de genomas de especies claramente diferentes.

El "material genético" se refiere a moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias de nucleótidos de adenosina, timina, uracilo, citosina y guanina capaces de codificar un gen.

Se entiende que la expresión "cadena pesada" usada en el presente documento incluyen una cadena pesada de longitud completa que incluye una región variable (VH) que tiene secuencias de aminoácidos que determinan la especificidad por antígenos y una región constante que tiene tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3) y fragmentos de las mismas. Además, se entiende que la expresión "cadena ligera" usada en el presente documento incluyen una cadena ligera de longitud completa que incluye una región variable (VL) que tiene secuencias de aminoácidos que determinan la especificidad por antígenos y una región constante (CL) y fragmentos de las mismas.

El término "homólogo" indica polipéptidos, incluyendo polipéptido antigénico exógeno que tiene los mismos restos o restos conservados en una posición correspondiente en su estructura primaria, secundaria o terciaria. Los homólogos funcionales incluyen antígenos exógenos y otros polipéptidos que presentan una función y/o especificidad similares (p. ej., para una diana particular).

Un anticuerpo, o inmunoglobulina, intacto de origen natural incluye cuatro polipéptidos: dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa, en las que cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada tiene una región constante y una región variable. De manera similar, cada cadena ligera tiene una región constante y una región variable. Hay cinco clases de cadenas pesadas (isotipos): gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) o épsilon (ϵ) y, además, varias subclases gamma 1 (γ 1), gamma 2 (γ 2), gamma 3 (γ 3), gamma 4 (γ 4), alfa 1 (α 1) y alfa 2 (α 2). La región constante de cadena ligera puede ser de tipo kappa (κ) o lambda (λ). Las regiones variables difieren en su secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de un anticuerpo dado con su antígeno particular.

Como se usa en el presente documento, los términos "aumentar", "potenciar", "estimular", y/o "inducir" (y términos similares) se refieren en general al acto de mejorar o aumentar, ya sea directa o indirectamente, una concentración, nivel, función, actividad o comportamiento en relación con el natural, esperado o promedio, o en relación con una condición de control.

Como se usa en el presente documento, Los términos "inhibir", "suprimir", "disminuir", "interferir", y/o "reducir" (y términos similares) se refieren en general al acto de reducir, ya sea directa o indirectamente, una concentración, nivel, función, actividad o comportamiento en relación con el natural, esperado o promedio, o en relación con una condición de control.

- 5 Una "biblioteca", como se usa en el presente documento, incluye una colección de moléculas de ácido nucleico (p. ej., ADN, ARN) que tienen diversas secuencias de ácido nucleico, una colección genéticamente diversa de clones, una colección de diversos polipéptidos, una colección diversa de células, tales como CHD, etc.

10 Como se usa en el presente documento, "un sujeto mamífero" incluye todos los mamíferos, incluyendo, sin limitación, seres humanos, animales domésticos (p. ej., perros, gatos y similares), animales de granja (p. ej., vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (p. ej., mono, ratas, ratones, conejos, cobayas y similares). Los términos "individuo", "sujeto", "huésped", y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desee diagnóstico, tratamiento o terapia, en particular seres humanos. Los procedimientos descritos en el presente documento son aplicables tanto a la terapia humana como a aplicaciones veterinarias. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero y, en otras realizaciones, el sujeto es un ser humano.

- 15 Un "producto sanitario" se refiere a cualquier dispositivo, aparato o máquina usado para administrar una dosis de una CHD que expresa antígeno exógeno y/o un agente terapéutico. Esto incluye recipientes, frascos, frasquitos, jeringas, bolsas, cartuchos, casetes, cargadores, cilindros o botes.

20 "Botiquín médico" se refiere a una unidad envasada que incluye un producto sanitario o aplicador, una dosis adecuada de CHD que expresa antígeno exógeno, incluyendo opcionalmente un agente terapéutico y etiquetado e instrucciones relevantes.

25 Como se usa en el presente documento, el término "modular", "modulación", "modificar", y/o "modulador" se refiere en general a la capacidad de alterar, por aumento o disminución, p. ej., promover/estimular/regular positivamente o interferir con/inhibir/regular negativamente directa o indirectamente una concentración, nivel, expresión, función o comportamiento específico, tales como, p. ej., para actuar como antagonista o agonista. En algunos casos, un modulador puede aumentar y/o disminuir una concentración, nivel, actividad o función determinado en relación con un control, o en relación con el nivel promedio de actividad que se esperaría en general o en relación con un nivel de actividad de control.

30 La "membrana", como se usa en el presente documento, es una capa límite que separa un espacio interior de un espacio exterior que comprende uno o más compuestos biológicos, normalmente lípidos y opcionalmente polipéptidos. Las membranas pueden ser bicapas lipídicas. En determinadas realizaciones, las membranas comprenden una o más de fosfatidilcolina, esfingomiélinea, lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol o ácido fosfatídico. En algunas realizaciones, las membranas comprenden uno o más polipéptidos tales como anquirina y coenzima Q10. Se incluyen en la definición de membrana membranas celulares que comprenden, p. ej., una bicapa fosfolipídica y polipéptidos asociados a la membrana celular.

35 La expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a un polímero monocatenario o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas. Incluye ADN cromosómico y plásmidos autorreplicantes, vectores, ARNm, ARNt, ARNip, etc., que pueden ser recombinantes y a partir de los cuales se pueden expresar polipéptidos exógenos cuando se introduce el ácido nucleico en una célula.

40 Los ortólogos se definen como genes de diferentes especies que evolucionaron a partir de un gen ancestral común por especiación.

45 La expresión "farmacéuticamente aceptable" y variaciones gramaticales de la misma, se refiere a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos que se pueden administrar a o sobre un sujeto sin la producción de efectos fisiológicos indeseables en un grado que impediría la administración de la composición. Por ejemplo, el "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que es en general segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico en seres humanos. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite en agua o emulsiones de agua en aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. La expresión también abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de los Estados Unidos o enumerados en la farmacopea de los Estados Unidos para su uso en animales, incluyendo seres humanos, así como cualquier vehículo o diluyente que no cause una irritación significativa a un sujeto y no anule la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado.

55 Algunos agentes se pueden administrar como "sal farmacéuticamente aceptable", p. ej., preparada a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido acético,

ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Las sales también se pueden preparar a partir de bases orgánicas e inorgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas, incluyen, solo a modo de ejemplo, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias. Cualquier experto en la materia sabrá cómo seleccionar un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para implementar esta divulgación sin experimentación indebida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a uno o más de los compuestos descritos en el presente documento, tales como, p. ej., una CHD que expresa antígeno exógeno mezclado o entremezclado con, o suspendido en uno o más componentes químicos adicionales, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente aceptables. Un fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un sujeto.

Determinadas realizaciones proporcionan diversas moléculas polipeptídicas que tienen secuencias asociadas con una función o actividad deseada, tales como polipéptidos antigénicos exógenos. Un polipéptido es un término que se refiere a una cadena de restos de aminoácidos, independientemente de la modificación postraduccional (p. ej., fosforilación o glucosilación) y/o formación de complejos con polipéptidos adicionales, síntesis en complejos de múltiples subunidades, con ácidos nucleicos y/o hidratos de carbono, u otras moléculas. Por lo tanto, los proteoglicanos también se denominan en el presente documento polipéptidos. En determinadas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno comprende un antígeno exógeno polipeptídico. En determinadas realizaciones, la CHD que expresa antígenos exógenos comprende uno o más polipéptidos antigénicos no exógenos que están opcionalmente asociados a la membrana.

La expresión "agente farmacéuticamente activo" o "agente farmacéutico" se define como cualquier compuesto, p. ej., un fármaco de molécula pequeña, o un producto biológico (p. ej., un fármaco polipeptídico o un fármaco de ácido nucleico) que, cuando se administra a un sujeto tiene un efecto medible o expresable en el sujeto, p. ej., alivia o disminuye un síntoma de una enfermedad, trastorno o afección. En algunas realizaciones, el agente farmacéutico se puede administrar antes de, en combinación con o después de la administración de una CHD que expresa antígeno exógeno. En algunas realizaciones, el agente farmacéuticamente activo ejerce un efecto de tratamiento sinérgico con la CHD que expresa antígeno exógeno. En algunas realizaciones, el agente farmacéuticamente activo ejerce un efecto de tratamiento aditivo con la CHD que expresa antígeno exógeno.

Un "promotor" se define como una serie de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico unido operativamente. Los promotores incluyen secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales. Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está activo en regulación ambiental o del desarrollo. La expresión "unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor o una matriz de sitios de unión de factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en el que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Un "antígeno exógeno", como se usa en el presente documento, es una entidad capaz de interactuar con una diana, p. ej., para asociarse o unirse a una diana. Un antígeno exógeno puede comprender o puede consistir esencialmente en un polipéptido. En algunas realizaciones, el antígeno exógeno comprende un polipéptido, un hidrato de carbono, un ácido nucleico, un lípido, una molécula pequeña o una combinación de los mismos. En realizaciones en las que un antígeno exógeno es un compuesto o molécula de origen natural, el antígeno es "exógeno" en el sentido de que es un compuesto o molécula exógena o heterólogo con respecto a su presencia en la CHD. En otras realizaciones, el antígeno es "exógeno" en el sentido de que es un compuesto o molécula artificial, tal como una fusión o una quimera, un polipéptido de origen no natural, hidrato de carbono, ácido nucleico, lípido o una combinación de los mismos, o una molécula pequeña artificial u otro agente terapéutico. Por ejemplo, el antígeno exógeno puede comprender una fusión o quimera que comprende uno o más de un dominio S, un dominio A y un dominio U. El dominio S es un dominio de superficie expuesto al entorno alrededor de la CHD, tal como el sistema circulatorio de un sujeto. El dominio A es un dominio de anclaje que une el dominio S a la membrana celular de la CHD. El dominio U está frente al lado no expuesto o está ubicado dentro (es decir, en el espacio intracelular) de la CHD. Independientemente de cualquier dominio, un antígeno exógeno puede estar ubicado en la superficie de la CHD que expresa antígeno exógeno o puede estar ubicado dentro de la CHD. El antígeno exógeno puede estar asociado con la membrana de la CHD que expresa antígeno exógeno, p. ej., el antígeno exógeno está anclado en, conjugado con o unido de otro modo a la membrana. En algunas realizaciones, el antígeno exógeno puede estar conjugado con la membrana de la CHD que expresa antígeno exógeno mediante conjugación química o enzimática. En otras realizaciones, el antígeno exógeno no está conjugado con la membrana. En algunas realizaciones, el antígeno exógeno no está asociado con la membrana de la CHD que expresa antígeno exógeno y está ubicado dentro del espacio intracelular encapsulado en la membrana de la CHD. En algunas realizaciones, un antígeno exógeno ubicado dentro del espacio intracelular de la CHD no se difunde sustancialmente fuera de la CHD y/o puede que no atraviese la membrana. En otras realizaciones, el antígeno exógeno puede difundirse sustancialmente fuera de la CHD y/o puede atravesar la membrana. En algunas

- realizaciones, el antígeno exógeno se carga, p. ej., se introduce o se pone en la CHD. Un antígeno exógeno que se carga no es sintetizado biológicamente por la CHD que expresa antígeno exógeno. Un antígeno exógeno adecuado para la carga puede producirse, p. ej., en un sistema de expresión basado en células, aislarse de una muestra biológica, sintetizarse química o enzimáticamente y después cargarse en o sobre la CHD. En algunas realizaciones, el antígeno exógeno puede ser modificado adicionalmente por la CHD que expresa antígeno exógeno después de la carga. En otras realizaciones, el antígeno exógeno no se modifica después de la carga. En algunas realizaciones, el polipéptido antigénico exógeno no se carga sobre o en la CHD. En algunas realizaciones, se produce el antígeno exógeno, p. ej., es sintetizado biológicamente por la CHD que expresa antígeno exógeno. Normalmente, un polipéptido antigénico exógeno se expresa mediante la CHD que expresa antígeno exógeno a partir de una molécula de ácido nucleico exógeno (p. ej., un ADN o ARNm) que se introdujo en la CHD. El antígeno exógeno puede tener una función biológica que se conserva cuando el antígeno se expresa en la CHD. El antígeno exógeno puede unirse a y/o inmovilizar una diana. Como alternativa o además, el antígeno exógeno puede presentar una actividad catalítica hacia la diana, p. ej., el antígeno exógeno puede convertir o modificar la diana, o puede degradar la diana. A continuación, opcionalmente, se puede liberar un producto del antígeno exógeno.
- La "residencia" de una CHD que expresa antígeno exógeno se refiere al periodo de tiempo que pasa en una ubicación fisiológica. La ubicación específica de la CHD que expresa antígeno exógeno puede cambiar durante su vida y la "residencia" se aplica al periodo de tiempo que pasa en diversos entornos, incluyendo la circulación vascular, tejidos periféricos, capilares, aparato digestivo, aparato respiratorio, tejidos nasales, superficie epidérmica y tejido intersticial. En realizaciones específicas, la CHD que expresa antígeno exógeno reside en el sistema circulatorio de un sujeto.
- Un "ácido nucleico replicante" se refiere a ácido desoxirribonucleico (ADN) que puede ser copiado por enzimas dedicadas a aumentar el número de copias del ADN. Habitualmente, la replicación del ADN conduce a la producción de dos réplicas idénticas a partir de una molécula de ADN original. La replicación del ADN comprende la incorporación de nucleótidos en una hebra de ADN creciente mediante ADN polimerasa emparejados con la hebra molde de uno en uno mediante la creación de enlaces fosfodiéster.
- La "inmovilización" se define como enclaustramiento, oclusión, separación, segregación, ocultación, aislamiento o apartamiento de una diana y evitar que interactúe libremente con su entorno.
- "Unión específica" o "interacción específica", como se usa en el presente documento, describe cualquier interacción entre dos entidades (p. ej., una diana con un antígeno exógeno, tal como un anticuerpo con un antígeno, un receptor con un ligando, una enzima con un sustrato, biotina con avidina, etc.) que sea saturable, con frecuencia reversible y, por lo tanto, competitiva, como entienden estas expresiones los expertos en las materias de química y bioquímica. P. ej., se produce unión específica que implica moléculas biológicas tales como, p. ej., proteínas, péptidos y ácido nucleico cuando un miembro del par de unión tiene un sitio con una forma y distribución de restos con carga, polares o hidrófobos de modo que la interacción del ligando afín con ese sitio se caracteriza por una energía favorable (es decir, una energía de unión libre negativa). La especificidad de la interacción se puede medir o expresar como una constante de unión (Kd). La Kd puede variar desde un intervalo mM hasta un intervalo fM, incluyendo intervalos pM, intervalos μM e intervalos nM. Los valores habituales de Kd son inferiores a aproximadamente 10^{-6} M, inferiores a aproximadamente 10^{-7} M, inferiores a aproximadamente 10^{-8} M y, en algunas realizaciones, inferiores a aproximadamente 10^{-9} M.
- Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" o "sustancial" se refiere, p. ej., a la presencia, el nivel o la concentración de una entidad en un espacio particular, el efecto de una entidad sobre otra entidad o el efecto de un tratamiento. Por ejemplo, una actividad, nivel o concentración de una entidad aumenta sustancialmente si el aumento es de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces o 1000 veces en relación con un valor de referencia. Una actividad, nivel o concentración de una entidad también aumenta sustancialmente si el aumento es del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 % o 500 % en relación con un valor de referencia. Una entidad puede estar sustancialmente presente en un espacio particular si se puede detectar mediante procedimientos conocidos en la técnica. Una entidad puede no estar sustancialmente presente en un espacio particular si está presente a niveles inferiores al límite de detección para ensayos y procedimientos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, una entidad puede no estar sustancialmente presente en un espacio particular si apenas es detectable, pero solo en cantidades no funcionales o cantidades minúsculas que no provocan ni cambian un fenotipo. En otras realizaciones, una entidad puede no estar sustancialmente presente en una población particular si está presente y puede detectarse solo en una pequeña cantidad de componentes que componen la población, p. ej., inferior al 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o inferior al 1 %, 0,5 %, 0,1 % de los constituyentes de la población. Por ejemplo, un ácido nucleico exógeno puede no conservarse tras la desnucleación, la célula se vuelve no replicativa y la célula desnucleada no tiene capacidad de expresión continuada del polipéptido antigénico exógeno codificado por el ácido nucleico exógeno. La pérdida de la capacidad de la célula para continuar traduciendo de forma significativa el polipéptido exógeno "interrumpe de hecho" la expresión de la proteína. En determinadas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno sustancialmente no tiene capacidad de autorreplicación, p. ej., la replicación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la CHD que expresa antígeno exógeno no incorpora sustancialmente un nucleósido si se pone en contacto con un nucleósido marcado, tal como timidina, en un ensayo de incorporación. En algunas realizaciones, la CHD que expresa antígeno exógeno no contiene una cantidad sustancial de ácidos nucleicos autorreplicantes. La expresión "identidad sustancial" de secuencias polinucleotídicas o ácidos nucleicos significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos 25 % de identidad de secuencia. Como alternativa, el

porcentaje de identidad puede ser cualquier número entero del 25 % al 100 %. Las realizaciones más preferidas incluyen al menos: 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una secuencia de referencia usando los programas descritos en el presente documento; preferentemente BLAST con parámetros convencionales.

5 "Sintético" se refiere a un compuesto o molécula que es artificial y de origen no natural o, si es de origen natural, está situado en un contexto o ubicación en el que no existiría de forma natural o, si existe de forma natural en el contexto o la ubicación, está en un estado de pureza o está presente en una cantidad, concentración o número en el que no estaría presente de forma natural en el contexto o la ubicación. Las entidades sintéticas pueden ser compuestos aislados o purificados que opcionalmente se modifican química o enzimáticamente con respecto a su estado natural, 10 ácidos nucleicos exógenos, antígenos exógenos (heterólogos) exógenos y similares. La presencia de un compuesto o molécula sintético, como se definen en el presente documento, en cualquier entidad hace que la entidad completa sea "sintética". Por ejemplo, una célula que comprende un antígeno exógeno es una célula sintética.

Una "diana", como se usa en el presente documento, es una entidad capaz de interactuar con un antígeno exógeno, p. ej., para asociarse o unirse con un antígeno exógeno. Una "diana" incluye, pero sin limitación, un polipéptido (p. ej., un anticuerpo o polipéptido relacionado con un anticuerpo, un componente del complemento, una proteína amiloide, un patógeno, una toxina, un prion), una molécula (p. ej., un metabolito, un esteroide, una hormona, un hidrato de carbono; un oligosacárido; un producto químico; un polisacárido, un ADN; un ARN; un lípido, un aminoácido, un elemento, una toxina o patógeno), un complejo (p. ej., un inmunocomplejo) o una célula (p. ej., una célula cancerosa, un macrófago, una bacteria, un hongo, un virus o un parásito). Se pretende que una diana sea detectada, 15 diagnosticada, dañada, destruida o alterada (p. ej., funcionalmente complementada) por los procedimientos proporcionados en el presente documento. La diana específica puede aparecer libre o estar asociada con otras entidades en el sistema circulatorio de un sujeto.

Un "autoanticuerpo diana", como se usa en el presente documento, es un autoanticuerpo asociado con una enfermedad autoinmunitaria. Dichos autoanticuerpos pueden detectarse y analizarse usando pruebas de unión de 20 anticuerpos que implican poner en contacto los anticuerpos del sujeto con muestras del propio tejido del sujeto, habitualmente tejido de tiroides, estómago, hígado y riñón. Los anticuerpos que se unen al tejido "propio" (que comprende antígenos propios) indican un trastorno autoinmunitario.

"Transgén" o "ácido nucleico exógeno" se refiere a una secuencia de nucleótidos nativa o extraña que se introduce en una CHD. Los ácidos nucleicos transgénicos y exógenos se usan indistintamente en el presente documento y abarcan 25 ácidos nucleicos recombinantes.

Como se usan en el presente documento, "tratar", "tratando" y/o "tratamiento" son un enfoque para obtener resultados clínicos, efectos farmacológicos y/o fisiológicos beneficiosos o deseados, p. ej., alivio de los síntomas, prevención o eliminación de dichos síntomas y se refieren tanto al tratamiento terapéutico como al tratamiento profiláctico o preventivo de la enfermedad, trastorno o afección específico. Los resultados clínicos, efectos farmacológico y/o 30 fisiológicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, prevención de la aparición de la enfermedad, trastorno o afección en un sujeto que pueda estar predispuesto a padecer la enfermedad, trastorno o afección, pero aún no experimenta ni presenta síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), alivio de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección, disminución del grado de la enfermedad, trastorno o afección, estabilización (es decir, no empeoramiento) de la enfermedad, trastorno o afección, prevención de la propagación de la enfermedad, 35 trastorno o afección, retardo o ralentización de la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, mejora o alivio de la enfermedad, trastorno o afección, y combinaciones de los mismos, así como prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibiera tratamiento.

Un "agente terapéutico" o "molécula terapéutica" incluye un compuesto o molécula que, cuando está presente en una cantidad eficaz, produce un efecto terapéutico deseado, efecto farmacológico y/o fisiológico en un sujeto que lo 40 necesite.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" es una cantidad de un agente que se administra a un sujeto suficiente para producir resultados clínicos, efectos farmacológicos y/o fisiológicos beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Una cantidad eficaz es normalmente suficiente para paliar, aliviar, estabilizar, invertir, retardar o retrasar la progresión de la patología. Por 45 tanto, la cantidad eficaz se refiere a una cantidad de un agente o la frecuencia de administración de una cantidad específica de un agente suficiente para lograr razonablemente un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado. Por ejemplo, puede incluir una cantidad que da lugar a la prevención, el tratamiento o una disminución de los síntomas asociados con una enfermedad o afección que se trata, p. ej., la enfermedad o afecciones médicas asociadas con la respuesta autoinmunitaria, activación inmunitaria hiperactiva o generación de anticuerpos inhibidores para los que se desea inmunotolerancia, o las enfermedades o afecciones médicas asociadas con un polipéptido diana. La cantidad de una composición terapéutica administrada al sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como el estado de salud general, las afecciones patológicas, las dietas, la edad, el sexo, el peso corporal y la tolerancia a los fármacos. También dependerá del grado, la gravedad y el tipo de enfermedad. Además, la cantidad eficaz dependerá de los procedimientos de formulación y administración usados, p. 50 ej., el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de secreción y la sensibilidad de reacción. El

experto en la materia podrá determinar dosis adecuadas dependiendo de estos y otros factores. Las composiciones también se pueden administrar en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. Una dosis deseable de la composición farmacéutica puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg para un adulto. En un ejemplo, se inicia una administración intravenosa a una dosis que es mínimamente eficaz y la dosis se incrementa durante un periodo de tiempo preseleccionado hasta que se observa un efecto positivo. Posteriormente, se realizan incrementos progresivos de la dosis limitándose a los niveles que producen un aumento correspondiente del efecto, teniendo en cuenta al mismo tiempo cualquier efecto adverso que pueda aparecer. Los ejemplos no limitados de dosis adecuadas pueden variar, por ejemplo, desde 1×10^{10} hasta 1×10^{14} , desde 1×10^{11} hasta 1×10^{13} o desde 5×10^{11} hasta 5×10^{12} CHD que expresan antígenos exógenos de la presente divulgación. Los ejemplos específicos incluyen aproximadamente 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} o más CHD que expresan antígenos exógenos de la presente divulgación. Cada dosis de CHD que expresan antígenos exógenos se puede administrar a intervalos tales como una vez al día, una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez al mes o dos veces al mes.

"Sin unir" se refiere al estado de una diana con la que el antígeno exógeno es capaz de interactuar. Una diana sin unir no está asociada con otra entidad o un antígeno exógeno. Un antígeno exógeno sin unir no está asociado con otra entidad o una diana. Una diana se considera "unida" una vez que está asociada con el antígeno exógeno u otra entidad. Las dianas sin unir incluyen formas solubles de la diana en circulación. Las dianas unidas incluyen dianas que están incluidas, asociadas con, ligadas a o que interactúan de otro modo con entidades en circulación o tejido periférico. Las entidades con las que una diana puede interactuar incluyen células circulantes, tejido endotelial periférico, inmunocomplejos, glucolípidos, microbios, inmunoglobulinas, seroalbúmina, factores de coagulación, lipoproteínas y electrolitos.

Una "variante" es un polipéptido que se diferencia de la proteína original por una o más sustituciones, supresiones, inserciones de aminoácidos u otras modificaciones. Estas modificaciones no cambian significativamente la actividad biológica de la proteína original. En muchos casos, una variante conserva al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de la actividad biológica de la proteína original. La actividad biológica de una variante también puede ser mayor que la de la proteína original. Una variante puede ser de origen natural, tal como por variación alélica o polimorfismo, o puede obtenerse por ingeniería genética deliberadamente.

La secuencia de aminoácidos de una variante es sustancialmente idéntica a la de la proteína original. En muchas realizaciones, una variante comparte al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más identidad de secuencia global o similitud con la proteína original. La identidad o similitud de secuencia se puede determinar usando diversos procedimientos conocidos en la técnica, tal como la herramienta básica de alineación local (BLAST), análisis de matriz de puntos o el procedimiento de programación dinámica. En un ejemplo, la identidad o similitud de secuencia se determina usando los programas GAP (algoritmo de Needleman-Wunsch) del Genetics Computer Group (GCG). Las secuencias de aminoácidos de una variante y la proteína original pueden ser sustancialmente idénticas en una o más regiones, pero divergentes en otras regiones.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" es una molécula de ácido nucleico, preferentemente autorreplicante, que transfiere y/o replica una molécula de ácido nucleico insertada, tal como un transgén o ácido nucleico exógeno en y/o entre células huésped. Incluye un plásmido o cromosoma vírico en cuyo genoma se inserta un fragmento de ADN recombinante y se usa para introducir ADN recombinante o un transgén, en una CHD.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan como ilustración y no como limitación.

Ejemplo 1: Cultivo de células eritroides con expresión génica heteróloga

Se aíslan células CD34 de sangre periférica mediante selección por microperlas supermagnéticas mediante el uso de columnas Mini-MACS (Miltenyi Biotec; 94 % +/- 3 % de pureza). Las células se cultivan en medio de diferenciación eritroide (MDE) en función de IMDM complementado con glutamina estabilizada, transferrina holohumana 330 ug/ml, insulina humana recombinante 10 ug/ml, heparina 2 UI/ml y plasma inactivado por virus con disolvente/detergente al 5 %. El procedimiento de expansión comprende 3 etapas. En la primera etapa (del día 0 al día 7), se cultivan 10^4 /ml de células CD34 en MDE en presencia de hidrocortisona 1 uM, SCF 100 ng/ml, IL-3 5 ng/ml y Epo 3 UI/ml. El día 4, se diluye 1 volumen de cultivo celular en 4 volúmenes de medio nuevo que contiene SCF, IL-3, Epo e hidrocortisona. En la segunda etapa (del día 7 al día 11), las células se resuspenden a 10^5 /ml en MDE complementado con SCF y Epo. En la tercera etapa (del día 11 al día 18), las células se cultivan en MDE complementado solo con Epo. Los recuentos de células se ajustan a $7,5 \times 10^5$ a 1×10^6 y $5-10 \times 10^6$ células/ml los días 11 y 15, respectivamente. Más allá del día 18, el medio de cultivo que contiene Epo se renueva dos veces por semana. Los cultivos se mantienen a 37 °C en CO₂ al 5 % en aire.

La secuencia codificante del antígeno de interés se coloca bajo el control de un promotor específico eritroide, p. ej., GATA-1, y se termina con una cola de poli-A, véase, p. ej., Repik y col., Clin Exp Immunol 2005, 140: 230. Esta secuencia está codificada en un vector lentivírico (p. ej., EF1, System Biosciences, Inc.). El vector se produce mediante procedimientos convencionales a partir de células 293T. El vector lentivírico se transduce en células progenitoras

hematopoyéticas humanas, p. ej., células CD34+ o eritroblasto inmortalizado o célula iPS, por ejemplo, como se describe en Chang y col., Nat Biotechnol 2006, 24: 1017, durante los días 1-4 de cultivo. Las etapas posteriores de expansión y diferenciación se realizan como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 2: Carga de proteína en la célula eritroide mediante ciclos hipotónicos/hipertónicos

5 Se añade antígeno, en este caso OVA, a una suspensión de eritrocitos a una concentración final de 0,5 o 5 mg/ml con un hematocrito (Hct) del 70 %. Después de un procedimiento de diálisis hipotónica (50 mOsmol/kg), Los eritrocitos se vuelven a sellar añadiendo una solución hipertónica (1900 mOsmol/kg) a 37 °C durante 30 min. Los eritrocitos cargados con OVA se lavan cuatro veces con una solución de NaCl al 0,9 % + glucosa al 0,2 %, se centrifugan a 1000 x g durante 10 min a 4 °C y se ajustan a un Hct del 50 % con plasma o tampón.

10 **Ejemplo 3: Marcaje de la superficie celular con reticulante heterobifuncional**

Se prepara antígeno con grupo tiol expuesto, reducido (antígeno-SH) mediante incubación con TCEP 5 mM. El agente reductor se elimina mediante cromatografía de exclusión por tamaño antes de la conjugación. Las células se incuban con reticulante de maleimida-PEG-NHS, p. ej., SM(PEG)_x (Thermo Scientific) durante 30 minutos. El grupo de NHS reacciona con grupos amina libres en antígenos de la superficie celular. Las células que han reaccionado se lavan en 15 PBS para eliminar el exceso de reticulante. La solución de antígeno-SH se introduce en la solución de células más reticulante y se permite que la reacción de maleimida-SH se desarrolle durante 30 minutos. Las células se sedimentan y se lavan para eliminar el antígeno sin unir.

Ejemplo 4: Marcaje de la superficie celular con sortasa

20 Se incuban células que expresan proteínas de superficie que contienen la secuencia aceptora de Sortasa A, LPXTG, con sortasa A 100 uM en un tampón de reacción que consiste en Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, durante 4 h a 37 °C. Se introduce exceso molar 10x de nucleófilo, GGG-antígeno, y se permite que la reacción se desarrolle a temperatura ambiente durante una noche. Después de la reacción, el exceso de sortasa y el nucleófilo sin reaccionar se eliminan por sedimentación y lavando las células.

Ejemplo 5: Marcaje de la superficie celular con química de clic

25 Las células se hacen reaccionar con alquino-NHS éster para conjugar el grupo alquino a aminas primarias expuestas en la superficie celular, según las instrucciones del fabricante (p. ej., Glen Research). El exceso de éster de alquino-NHS se elimina sedimentando y lavando las células. El antígeno se hace reaccionar con éster de azida-NHS para conjugar el grupo azida con aminas primarias expuestas en el antígeno, según las instrucciones del fabricante (p. ej., Thermo Scientific). El exceso de éster de azida-NHS se elimina mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Las 30 células-alquino y el antígeno de azida se hacen reaccionar mediante cicloadición catalizada por cobre a temperatura ambiente.

Ejemplo 6: Medición de la proliferación de linfocitos T en un ratón

35 Se aíslan linfocitos T CD8⁺ de bazo de ratón OTI (CD45.2⁺) usando un equipo de selección negativa de perlas magnéticas CD8 (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. Se resuspenden células OTI CD8⁺ recién aisladas en PBS y se marcan con CFSE 1 μM (Invitrogen) durante 6 min a temperatura ambiente, y la reacción se interrumpe durante 1 min con un volumen igual de medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) con FBS 10 % (vol/vol) (Gibco). Las células se lavan, se cuentan y se resuspenden en IMDM puro antes de la inyección. Se inyectan un total de 3 × 10⁶ células OTI CD8⁺ marcadas con CFSE i.v. en la vena de la cola de ratones receptores CD45.1⁺. 40 Para estudios de proliferación a corto plazo, se inyectan células eritroides que comprenden OVA 24 h después de la transferencia adoptiva. Los esplenocitos se recogen 5 días después de la administración del antígeno y se tiñen para su análisis mediante citometría de flujo.

Ejemplo 7: Modelo de exposición al antígeno OVA en un ratón

45 Se inyectan un total de 3 × 10⁵ linfocitos T CD8⁺ OTI marcados con CFSE en ratones receptores CD45.1⁺ como se ha descrito anteriormente. A los 1 y 6 d posteriores a la transferencia adoptiva, se administran a los ratones i.v. 100 μl de células eritroides que comprenden OVA en la vena de la cola. A los 15 d después de la transferencia adoptiva, los ratones se exponen a 5 μg de OVA y 25 ng de LPS de *E. coli* ultrapuro (InvivoGen) en 25 μl de solución salina inyectada por vía intradérmica en cada almohadilla de las patas traseras (procedimiento Hock: dosis total de 10 μg de OVA y 50 ng de LPS). La cuantificación de linfocitos B y T específicos de antígeno y el título de anticuerpos en suero se describen a continuación.

50 **Ejemplo 8: Cuantificación de linfocitos B y T específicos de antígeno en un ratón**

Los ratones se sacrifican 4 d después de la exposición a OVA, descrita anteriormente, y el bazo y las células de los ganglios linfáticos de drenaje se aíslan para la reestimulación. Para el análisis de citometría de flujo de citocinas intracelulares, las células se vuelven a estimular en presencia de OVA 1 mg/ml o péptido SIINFEKL 1 μg/ml (Genscript) durante 3 h. Se añade Brefeldina-A (5 μg/ml; Sigma) y se reanuda la reestimulación durante 3 h más antes de la tinción

y el análisis de citometría de flujo. Para las mediciones de ELISA de factores secretados, las células se vuelven a estimular en presencia de OVA 100 µg/ml o péptido SIINFEKL 1 µg/ml durante 4 d. Las células se centrifugan y los medios se recogen para el análisis de ELISA usando equipos de IFN-γ e IL-10 Ready-Set-Go (eBioscience) según las instrucciones del fabricante.

5 Ejemplo 9: Cuantificación del título de anticuerpos circulantes

La IgG sérica específica de OVA se detecta incubando suero de ratón en diversas diluciones en placas recubiertas con OVA, seguido de una incubación final con IgG-HRP de cabra anti-ratón (Southern Biotech).

Ejemplo 10: Inducción de tolerancia extracelular SpyTag-SpyCatcher

10 Un casete de expresión que contiene la secuencia codificante de Kell y SpyTag se sintetiza y se inserta en el vector lentivírico EF1. Una población de células CD34+ se transforma con el vector. La expresión de la proteína de fusión Kell-SpyTag se cuantifica mediante FACS. Las células que expresan Kell-SpyTag de forma extracelular se colocan después en una solución de péptidos Ara h(1-6) fusionados con la secuencia de SpyCatcher y un marcador cMyc. Después de la incubación, las células se clasifican usando FACS para cuantificar la conjugación covalente de isopéptidos de Kell-SpyTag con SpyCatcher-ArahX-cMyc. Las células también se lisan de forma hipotónica y la presencia de Kell-SpyTag-SpyCatcher-ArahX-cMyc se cuantifica mediante transferencia de Western.

Ejemplo 11: Ensamblaje de genes

Se obtuvo ADN que codifica los siguientes genes, glucoforina A (Uniprot ID P02724), Kell (Uniprot ID P23276), anticuerpo scFv contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (Bose y col., 2003 Mol Immunol 40 (9): 617, GenBank ID AJ549501.1), adenosina desaminasa (Uniprot ID P00813), fenilalanina hidroxilasa de *Chromobacterium violaceum* (GenBank ID AF146711.1), receptor del complemento 1 (Uniprot ID P17927), CD46 (GenBank: BAA12224.1), CD55 (Uniprot ID P08174), CD59 (Uniprot ID P13987), proteína verde fluorescente (Uniprot ID P42212), timidina fosforilasa (Uniprot ID P19971), glucocerebrosidasa (Uniprot ID P04062), glucoproteína 1 beta2 (Uniprot ID P02749), receptor de fosfolipasa a2 (Uniprot ID Q13018), colágeno alfa-3(IV) (Uniprot ID Q01955), amiloide P sérico (Uniprot ID P02743), lipoproteína lipasa (Uniprot ID P06858), asparaginasa (Uniprot ID P00805), factor IX (Uniprot ID F2RM35), ADAMTS13 (Uniprot ID Q76LX8), como ADNc de Dharmacon (GE Life Sciences) o fueron sintetizados *de novo* por DNA2.0 y Genscript.

1. Clonación de un solo gen (CR1)

Los genes se ensamblaron en vectores de expresión mediante procedimientos convencionales de biología molecular conocidos en la técnica. El gen del receptor del complemento 1 (CR1) fue sintetizado por un proveedor comercial (DNA2.0) y se suministró en un vector de clonación convencional (serie pJ). El gen se amplificó a partir del vector pJ mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando oligos con secuencias terminales no homólogas para prepararlo para su inserción en el vector de expresión de mamíferos (System Biosciences, serie pM): el oligo corriente arriba consistía en 25 nt homólogos del sitio de inserción pM corriente arriba y 25 nt homólogos del inicio de CR1; el oligo corriente abajo consistía en 25 nt homólogos del sitio de inserción pM corriente abajo y 25 nt homólogos del final de CR1. El producto amplificado se purificó mediante electroforesis en gel (Qiagen). El vector pM se linealizó mediante PCR con oligos de cola a cola homólogos de los sitios de inserción corriente arriba y corriente abajo y se purificó mediante purificación por PCR (Qiagen). El amplicón CR1 se ligó en el vector pM linealizado mediante ensamblaje de Gibson, descrito en detalle en Gibson 2011, Methods Enzymology Vol 498, pág. 394. Las secuencias se confirmaron mediante secuenciación de Sanger.

40 2. Fusión de dos genes (membrana Kell-scFv)

El gen de Kell se adquirió como ADNc y se suministró en un vector de clonación convencional (serie pJ). El gen de un anticuerpo scFv específico del antígeno de superficie de la hepatitis B (scFv, descrito en Bose 2003, Molecular Immunology 40: 617) fue sintetizado por un proveedor comercial (DNA2.0) y suministrado en un vector de clonación convencional (serie pJ). Los genes se amplificaron a partir de los vectores pJ mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando oligos con secuencias terminales no homólogas para prepararlos para su inserción en el vector de expresión de mamíferos (System Biosciences, serie pM). Kell se amplificó con un oligo corriente arriba que consistía en 25 nt homólogos del sitio de inserción pM corriente arriba y 25 nt homólogos del extremo 5' de Kell y un oligo corriente abajo que consistía en 25 nt homólogos del extremo 5' de scFv y 25 nt homólogos del extremo 3' de Kell. scFv se amplificó con un oligo corriente arriba que consistía en 25 nt homólogos del extremo 3' del sitio de inserción de Kell y 25 nt homólogos del extremo 5' de scFv y un oligo corriente abajo que consistía en 25 nt homólogos del sitio de inserción pM corriente abajo y 25 nt homólogos del extremo 3' de scFv. Los productos amplificados se purificaron mediante electroforesis en gel (Qiagen). El vector pM se linealizó mediante PCR con oligos de cola a cola homólogos de los sitios de inserción corriente arriba y corriente abajo y se purificó mediante purificación por PCR (Qiagen). Los amplicones de Kell y scFv se ligaron en el vector pM linealizado mediante ensamblaje de Gibson en un solo recipiente, descrito en detalle en Gibson 2011, Methods Enzymology Vol 498, pág. 394. Las secuencias se confirmaron mediante secuenciación de Sanger.

3. Ensamblaje de conectores entre genes (Kell-scFv)

El gen de Kell se adquirió como ADNc y se suministró en un vector de clonación convencional (serie pJ). El gen de un anticuerpo scFv específico del antígeno de superficie de la hepatitis B (scFv, descrito en Bose 2003, Molecular Immunology 40: 617) fue sintetizado por un proveedor comercial (DNA2.0) y suministrado en un vector de clonación convencional (serie pJ). Los genes se amplificaron a partir de los vectores pJ mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando oligos con secuencias terminales no homólogas para prepararlos para su inserción en el vector de expresión de mamíferos (System Biosciences, serie pM). Kell se amplificó con un oligo corriente arriba que consistía en 25 nt homólogos del sitio de inserción pM corriente arriba y 25 nt homólogos del extremo 5' de Kell; y un oligo corriente abajo que consistía en 25 nt homólogos del extremo 5' de scFv, 24 nt que codificaban un espaciador (GlyGlyGlySer)_{x2} y 25 nt homólogos del extremo 3' de Kell. scFv se amplificó con un oligo corriente arriba que consistía en 25 nt homólogos del extremo 3' del sitio de inserción de Kell, 24 nt que codificaban un espaciador (GlyGlyGlySer)_{x2} y 25 nt homólogos del extremo 5' de scFv; y un oligo corriente abajo que consistía en 25 nt homólogos del sitio de inserción pM corriente abajo y 25 nt homólogos del extremo 3' de scFv. Los productos amplificados se purificaron mediante electroforesis en gel (Qiagen). El vector pM se linealizó mediante PCR con oligos de cola a cola homólogos de los sitios de inserción corriente arriba y corriente abajo y se purificó mediante purificación por PCR (Qiagen). Los amplicones de Kell y scFv se ligaron en el vector pM linealizado mediante ensamblaje de Gibson en un solo recipiente, descrito en detalle en Gibson 2011, Methods Enzymology Vol 498, pág. 394. Las secuencias se confirmaron mediante secuenciación de Sanger.

4. Unión de marcador epitópico (Kell-scFv)

El gen de Kell se adquirió como ADNc y se suministró en un vector de clonación convencional (serie pJ). El gen de un anticuerpo scFv específico del antígeno de superficie de la hepatitis B (scFv, descrito en Bose 2003, Molecular Immunology 40: 617) fue sintetizado por un proveedor comercial (DNA2.0) y suministrado en un vector de clonación convencional (serie pJ). Los genes se amplificaron a partir de los vectores pJ mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando oligos con secuencias terminales no homólogas para prepararlos para su inserción en el vector de expresión de mamíferos (System Biosciences, serie pM). Kell se amplificó con un oligo corriente arriba que consistía en 25 nt homólogos del sitio de inserción pM corriente arriba y 25 nt homólogos del extremo 5' de Kell; y un oligo corriente abajo que consistía en 25 nt homólogos del extremo 5' de scFv, 24 nt que codificaban un espaciador (GlyGlyGlySer)_{x2} y 25 nt homólogos del extremo 3' de Kell. scFv se amplificó con un oligo corriente arriba que consistía en 25 nt homólogos del extremo 3' del sitio de inserción de Kell, 24 nt que codificaban un espaciador (GlyGlyGlySer)_{x2} y 25 nt homólogos del extremo 5' de scFv; y un oligo corriente abajo que consistía en 25 nt homólogos del sitio de inserción pM corriente abajo, la secuencia de 27 nt taccctatgacgtgcccgactatgcc (SEQ ID NO: 8) que codifica un marcador epitópico HA y 25 nt homólogos del extremo 3' de scFv. Los productos amplificados se purificaron mediante electroforesis en gel (Qiagen). El vector pM se linealizó mediante PCR con oligos de cola a cola homólogos de los sitios de inserción corriente arriba y corriente abajo. El cebador corriente abajo contenía adicionalmente la secuencia de 27 nt taccctatgacgtgcccgactatgcc (SEQ ID NO: 8) que codifica un marcador epitópico HA. El vector linealizado se purificó mediante purificación por PCR (Qiagen). Los amplicones de Kell y scFv se ligaron en el vector pM linealizado mediante ensamblaje de Gibson en un solo recipiente, descrito en detalle en Gibson 2011, Methods Enzymology Vol 498, pág. 394. Las secuencias se confirmaron mediante secuenciación de Sanger.

5. Fusión de dos genes (ensamblaje indicador) (GPA-HA)

Los genes del receptor del complemento 1 (CR1) y la proteína verde fluorescente (GFP) fueron sintetizados por un proveedor comercial (DNA2.0) y se suministraron en vectores de clonación convencionales (serie pJ). El gen de CR1 se amplificó a partir del vector pJ mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando oligos con secuencias terminales no homólogas para prepararlo para su inserción en el vector de expresión de mamíferos (System Biosciences, serie pM): el oligo corriente arriba consistía en 25 nt homólogos del sitio de inserción pM corriente arriba y 25 nt homólogos del inicio de CR1; el oligo corriente abajo consistía en 54 nt homólogos de la secuencia de T2A de origen vírico gagggcagaggaagtcttctaactgcggtgacgtggagsgsstcccggcct (SEQ ID NO: 7). El gen de GFP se amplificó a partir del vector pJ mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando oligos con secuencias terminales no homólogas para prepararlo para su inserción en el vector de expresión de mamíferos (System Biosciences, serie pM): el oligo corriente arriba consistía en 54 nt homólogos de la secuencia de T2A de origen vírico gagggcagaggaagtcttctaactgcggtgacgtggagsgsstcccggcct (SEQ ID NO: 7) y 25 nt homólogos del inicio de GFP; el oligo corriente abajo consistía en 25 nt homólogos del sitio de inserción pM corriente abajo y 25 nt homólogos del final de GFP. Los productos amplificados se purificaron mediante electroforesis en gel (Qiagen). El vector pM se linealizó mediante PCR con oligos de cola a cola homólogos de los sitios de inserción corriente arriba y corriente abajo y se purificó mediante purificación por PCR (Qiagen). Los amplicones de CR1 y GFP se ligaron juntos y en el vector pM linealizado mediante ensamblaje de Gibson, descrito en detalle en Gibson 2011, Methods Enzymology Vol 498, pág. 394. Las secuencias se confirmaron mediante secuenciación de Sanger.

Ejemplo 12: Ensamblaje de ARNm

Se clona un gen de interés en el sitio de clonación múltiple del vector pSP64 (Promega) usando procedimientos convencionales de biología molecular. El vector se digiere con EcoRI (NEB) para generar un vector ADNbc linealizado que contiene el promotor SP6, gen de interés y cola de poli-A de 30 nucleótidos de longitud. El ARNm se sintetiza mediante reacción con la ARN polimerasa SP6 (Promega) según las instrucciones del fabricante, incluyendo las concentraciones recomendadas de análogo de caperuza 5' (ARCA) para sintetizar transcrito de ARNm con caperuza.

A continuación, la mezcla de reacción se trata con DNasa para digerir el vector molde (Riboprobe de Promega) y el ARNm se purifica usando el equipo de limpieza de ARN EZNA MicroElute (Omega).

Ejemplo 13: Cultivo celular

1. Glóbulos rojos humanos (eritrocitos)

- 5 Se aíslan células CD34 de sangre periférica mediante selección por microperlas supermagnéticas mediante el uso de columnas Mini-MACS (Miltenyi Biotec; 94 % +/- 3 % de pureza). Las células se cultivan en medio de diferenciación eritroide (MDE) en función de IMDM complementado con glutamina estabilizada, transferrina holohumana 330 µg/ml, insulina humana recombinante 10 µg/ml, heparina 2 UI/ml y plasma inactivado por virus con disolvente/detergente al 5 %. El procedimiento de expansión comprende 3 etapas. En la primera etapa (del día 0 al día 7), se cultivan 10^4 /ml de células CD34+ en MDE en presencia de hidrocortisona 1 µM, SCF 100 ng/ml, IL-3 5 ng/ml y EPO 3 UI/ml. El día 4, se diluye 1 volumen de cultivo celular en 4 volúmenes de medio nuevo que contiene SCF, IL-3, EPO e hidrocortisona. En la segunda etapa (del día 7 al día 11), las células se resuspenden a 10^5 /ml en MDE complementado con SCF y EPO. En la tercera etapa (del día 11 al día 18), las células se cultivan en MDE complementado solo con EPO. Los recuentos de células se ajustan a $7,5 \times 10^5$ a 1×10^6 y $5-10 \times 10^6$ células/ml los días 11 y 15, respectivamente. Más allá del día 18, el medio de cultivo que contiene EPO se renueva dos veces por semana. Los cultivos se mantienen a 37 °C en CO₂ al 5 % en aire.

2. Glóbulos rojos de ratón

Se conocen en la técnica procedimientos de cultivo de células eritroides de ratón a partir de progenitores eritroides de hígado fetal de ratón, véase, p. ej., Shi y col., 2014, PNAS 2014 111 (28): 10131.

- 20 Los progenitores eritroides de ratón se aíslan de hígados fetales. Los hígados fetales se adquieren de Charles River Labs. Los hígados se ponen en hielo en 1 ml de PBS. Se pipetea hacia arriba y hacia abajo para obtener una solución de suspensión unicelular y se pasa por un filtro de 70 µm (BD Falcon 35-2235). Se aclara la malla con 1 ml de PBS. Se combina el flujo continuo (1 ml por embrión). Se sedimentan las células a 1500 RPM durante 5 min, se resuspende con tampón de lisis de glóbulos rojos (solución de cloruro de amonio de Stemcell) y se incuba en hielo durante 10 minutos. Se sedimentan las células a 1500 RPM durante 5 min, eliminar el tampón de lisis y resuspender con 10 ml de PBS-FBS al 2 %. Se añade IgG de rata chromPure (Jackson ImmunoResearch, n.º 012-000-003) a 50 µl/ratón y se incuba a 4 °C durante 5 min. Se añade TER119 anti-ratón biotinilado (BD Pharmingen, n.º 553672) a (a $1 \text{ ul}/1 \times 10^6$ células) y se incuba a 4 °C durante 15 min. Se añade panel de linajes Ms (Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific) n.º BDB559971) a las células a ($2 \text{ ul}/1 \times 10^6$ células) y se incuba a 4 °C durante 15 min. Se lava una vez con un volumen 10x de PBS/ y se centrifugan las células con 1500 RPM durante 5 min a 4 grados. Se añaden partículas de estreptavidina Plus - DM (perlas magnéticas) (BD Pharmigen, n.º 557812) ($5 \text{ ul}/1 \times 10^6$ células) y se incuban a 4 °C durante 30 min. Se preparan 2-4 tubos de FACS en un soporte magnético. Se separan alícuotas de 2 ml de células en cada tubo (4 ml en total) y se sacan con cuidado las células del tubo y se ponen en el otro tubo del otro lado para evitar la rotura de las perlas por barras magnéticas. Se repite el mismo procedimiento y se llevan las células negativas para Ter119 y negativas para enlace a un tubo nuevo. Se concentran las células y se resuspenden las células con 50-100 µl de PBS (FBS al 2 %).

- Los progenitores eritroides purificados se cultivan en un medio de diferenciación que comprende (para 40 ml): IMDM: 29 ml, FBS (célula madre): 6 ml (15 % final), BSA al 10 % en IMDM (célula madre): 4 ml (1 % final), holo-transferrina 10 mg/ml: 2000 µl (final: 500 µg/ml), $100 \times$ L-glutamina: 400 µl, $100 \times$ penicilina estreptomocina: 400 µl, Epo 10 U/ul: 2 µl (final: 0,5 U/ml), insulina 10 mg/ml: 40 µl (final: 10 µg/ml). Se cultivan 2×10^5 células/ml en el medio de diferenciación en una placa de 24 pocillos a 37 °C. Después de un cultivo total de 44-48 horas, se realizan análisis, por ejemplo, mediante citometría de flujo como se realiza en el presente documento. Los glóbulos rojos desnucleados se descartan usando (tinción de Hoechst) para el análisis del perfil de diferenciación. Un cultivo exitoso producirá un aumento de 16 veces.

45 3. Plaquetas

- Se adquieren células CD34+ donadas del Centro de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson. Las células enriquecidas en CD34+ se siembran en placas en un medio sin suero a $2-4 \times 10^4$ células/ml y se realiza renovación del medio el día 4 añadiendo un volumen igual de medio. El día 6, las células se cuentan y se analizan: se lavan $1,5 \times 10^5$ células y se colocan en 1 ml del mismo medio complementado con un cóctel de citocinas que consiste en TPO 30 ng/ml, SCF 1 ng/ml, interleucina (IL)-6 7,5 ng/ml e IL-9 13,5 ng/ml] para inducir la diferenciación de megacariocitos. El día 10, se reemplaza 1/2-1/4 del cultivo en suspensión con medio nuevo. Todas las citocinas se adquieren de Peprotech. Los cultivos se incuban en una atmósfera humidificada (CO₂ al 10 %) a 39 °C durante los primeros 6 días de cultivo y a 37 °C durante los últimos 8 días. Las células nucleadas viables se cuentan con un hemocitómetro (azul tripano al 0,4 %; Invitrogen, Burlington, ON, Canadá).

- 55 Las células progenitoras clonogénicas (CPC) se analizan usando MethoCult H4436 para CPC mieloide y MegaCult-C para megacariocitos de unidades formadoras de colonias (CFU-Mk), según las instrucciones del fabricante (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). Para evaluar la diferenciación, las células se tiñen con anticuerpos contra CD61m CD42b, CD41, CD61 y CD49b por citometría de flujo usando un FACS-Calibur (Becton Dickinson). Para el

análisis del ciclo celular, las células se aclaran con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijan con formaldehído al 2 % (Sigma, San Luis, MO, Estados Unidos) durante 5 min y se permeabilizan con Triton X-100 al 0,1 % (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). A continuación, las células se marcan con mAb-Ki-67-FITC (BD Bioscience, San José, CA, Estados Unidos), se lavan y se resuspenden en 0,5 ml de PBS-suero bovino fetal al 1 % (FBS)-azida 7-aminoactinomicina D (7-AAD) al 0,01 % siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Biosciences).

Ejemplo 14: Aislamiento celular

1. Eritrocitos primarios

La sangre total se recoge usando técnicas asépticas en tubos que contienen heparina de bajo peso molecular, dalteparina sódica (9 unidades/ml de sangre). La sangre se centrifuga a 5000 x g durante 5 minutos y, después de eliminar el plasma y la capa leucocitaria (ambos pueden conservarse para su uso posterior), los eritrocitos se lavan dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría (4 °C) con centrifugación. La población de glóbulos rojos resultante se almacena a 4 °C en anticoagulante CPDA-1 o una solución de glicerol para su conservación a largo plazo.

2. Plaquetas primarias

Se recoge sangre completa (40 ml) en citrato de sodio al 3,8 % (1:9 de citrato con respecto a sangre volumen/volumen) de individuos sanos en un protocolo de IRB adecuado. La sangre se centrifuga a 200 g durante 15 minutos para aislar plasma rico en plaquetas (PRP). A continuación, las plaquetas se lavan en tampón de Tyrode modificado (que contiene NaCl 138 mM, dextrosa 5,5 mM, NaHCO₃ 12 mM, CaCl₂ 0,8 mM, MgCl₂ 0,4 mM, KCl 2,9 mM, Na₂HPO₄ 0,36 mM y Hepes 20 mM, pH 7,4) en presencia de prostaglandina 12 1 μM y se resuspendió en el mismo tampón.

Ejemplo 15: Irradiación de células primarias o cultivadas

Se puede realizar la irradiación de una población de CHD que expresan antígenos exógenos para garantizar que sean incapaces de replicarse. Dichos protocolos son similares a los conocidos en la técnica para irradiar células, p. ej., glóbulos rojos primarios. En resumen, se toma una unidad (350 ml) de sangre total y se divide en dos alícuotas de 175 ml cada una, por tanto, 10 de dichas unidades se dividen en 20 alícuotas. Una alícuota (175 ml) de cada unidad de sangre se somete a irradiación gamma de 25 Gy y, sin superar los 50 Gy, mediante un irradiador autónomo de células gamma (GammaCell 1000, Theratronics). A continuación, la sangre se almacena a 4 °C en condiciones de banco de sangre convencionales. Se realiza muestreo a partir de estas 10 bolsas de sangre irradiadas y 10 no irradiadas los días 0, 7, 14 y 21 con la ayuda del acoplador del sitio de muestreo (Fenwal, Estados Unidos). Se realizan pruebas de proliferación celular, incluyendo un ensayo de incorporación de timidina para cuantificar cualquier potencial mitótico. El sobrenadante se analiza para determinar la hemoglobina libre mediante espectroscopia de absorbancia y la lactato deshidrogenasa libre mediante un ensayo colorimétrico (Pierce) para evaluar los niveles de lisis celular.

Ejemplo 16: Desnucleación de células eritroides

Se cultivan células eritroides hasta semiconfluencia (de 1 a 4 x 10⁴ células por cm²) en cubreobjetos de 12 mm de diámetro recubiertos con colágeno en medio IMDM complementado con 100 unidades/ml de penicilina y 100 unidades/ml de estreptomina. El colágeno es necesario para evitar que todas las células se desprendan del cubreobjetos durante la centrifugación. Las células se cultivan en monocapas (5 x 10⁴ células por cm²) en cubreobjetos en el mismo medio o en medio de Eagle modificado por Dulbecco con suero de ternera al 10 %. No es necesario recubrir los cubreobjetos de las células con colágeno. Para desnuclear las células, los cubreobjetos se invierten (con las células hacia abajo) y se colocan en el fondo de tubos de centrifuga Corex de 15 ml que contienen 2-5 ml de medio con 10 g de citocalasina B por ml. Los tubos de centrifuga con los cubreobjetos se colocan inmediatamente en una centrifuga Sorvall RC-2 que se ha calentado a 37 °C girando el rotor (SS 34) con el cabezal en su lugar durante aproximadamente 1 h a 10 000 rpm (con el regulador de temperatura ajustado a 37-39 °C). El tiempo y la velocidad de centrifugación son factores cruciales para una desnucleación exitosa. Las células se centrifugan a 9000 rpm durante 1 h a 37 ± 20 y las células se centrifugan a 6500 rpm durante 50 minutos a 37 ± 20. Después de la centrifugación, los cubreobjetos se retiran de la centrifuga y se colocan con el lado de las células hacia arriba en placas de cultivo tisular de 35 mm (Falcon) (Biolquest) que contienen 3 ml de medio sin citocalasina B. En 30-60 min a 370, las células son morfológicamente normales y el 90-99 % carecen de núcleos. Las células desnucleadas se retiran de los cubreobjetos mediante tratamiento con tripsina-EDTA (Grand Island Biological Co.) y las células se suspenden en medio normal. Las células desnucleadas se vuelven a sembrar después en gotas pequeñas en cubreobjetos de 22 mm² que se mantienen en placas de cultivo tisular de 35 mm y se colocan en una incubadora. A intervalos de tiempo después de la nueva siembra, los cubreobjetos se montan en portaobjetos (12) y se realizan observaciones de los desnucleados con contraste de fases Zeiss, luz polarizada y óptica Nomarski.

Ejemplo 17: Contacto de células

1. Ácido nucleico - transfección

Se aumenta la escala del ácido nucleico de interés para proporcionar aproximadamente 5 ug de ácido nucleico por cada 10⁵ CHD que se van a cargar, p. ej., una célula, tal como una célula eritroide, una plaqueta o una célula

precursora hematopoyética. El ácido nucleico se diluye en medio Opti-MEM (Life Technologies) en una relación de 1 ug por cada 50 ul de medio. El ácido nucleico diluido se combina después con un reactivo de transfección (Trans-IT para ADN, Trans-IT mRNA para ARNm, Trans-IT siRNA para ARNip, Mirus Bio) en una relación en volumen de 1:1 y se permite que forme complejos durante 5 minutos a temperatura ambiente. El complejo de ácido nucleico se añade a las células durante 12-24 horas. Opcionalmente, después de este periodo de tiempo, los medios se pueden intercambiar con medios nuevos de modo que los reactivos de transfección ya no estén presentes.

2. Ácido nucleico - transducción vírica

El gen de interés se clona en el sitio de clonación múltiple del vector de lentivirus pCDH con la secuencia promotora de MSCV de System Biosciences.

El lentivirus se produce en células 293T mediante la transfección de las células con lipofectamine. Se siembran 5×10^6 células 293T (línea celular Lenti-X 293T, Clontech n.º de catálogo 632180) en una placa de Petri P10 el día antes de la transfección. La confluencia celular debería ser de aproximadamente 70 %. Se transfecta una placa por construcción. Se combinan 20 μ l (10 μ g) de mezcla de plásmidos pPACKH1 (System Biosciences) + 2 μ g de construcción de lenti + 20 μ l de reactivo Plus (LifeTechnologies, n.º de catálogo 11514-015) en 400 μ l de Optimem y se incuban 15 min a TA. Se diluyen 30 μ l de LF2000 (LifeTechnologies, n.º de catálogo 11668-019) en 400 μ l de Optimem, se añaden gota a gota a la mezcla de ADN y se incuban durante 15 min a TA. Se añade una mezcla de ADN a las células (las células están en 9 ml de Optimem). Las células se incuban durante 6 horas y después se cambia el medio a DMEM/FBS al 10 %. El sobrenadante del virus se recoge 48 horas después de la transfección mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se recoge y se congela en alícuotas de 1 ml a -80 °C.

Las células diana se transducen el día 3-7 del procedimiento de cultivo descrito en el presente documento. Se siembran 5×10^5 células cultivadas en 500 μ l de medio que contiene polibreno 20 μ g/ml en una placa de 24 pocillos. Para cada virus, las células se transducen en pocillos por triplicado. Se añade el sobrenadante del virus en otros 500 μ l de medio y la muestra se mezcla pipeteando. La infección se realiza mediante inoculación centrífuga, rotando la placa a 2000 rpm durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de la inoculación centrífuga, las células se incuban a 37 °C durante una noche y al día siguiente se añade 1 ml de medio IMDM nuevo con las citocinas adecuadas.

3. Ácido nucleico - polímero catiónico

Un ARNm que codifica el transgén de interés, y que incluye una secuencia promotora corriente arriba y una cola de poli A corriente abajo, se puede adquirir de múltiples proveedores comerciales (p. ej., IDT-DNA, Coralville IA). Se llevan a cabo transfecciones de ARN usando vehículos de suministro de lípidos catiónicos RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) o TRANSIT-mRNA (Mims Bio, Madison, Wis.). El ARN y el reactivo se diluyen en primer lugar en medio basal Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, Calif.). Se diluyen 5x 100 ng/ μ l de ARN y se diluyen 10x 5 μ l de RNAiMax por μ g de ARN. Los componentes diluidos se agrupan y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de distribuirlos en los medios de cultivo. Para transfecciones con TRANSIT-mRNA, se diluyen 10x 100 ng/ μ l de ARN en Opti-MEM y se añade el reactivo BOOST (a una concentración de 2 μ l por μ g de ARN), se añade TRANSIT-mRNA (a una concentración de 2 μ l por μ g de RNA) y a continuación se suministran los complejos de ARN-lípido al medio de cultivo después de una incubación de 2 minutos a temperatura ambiente. Se realizan transfecciones de ARN en medio hES sin componentes xenogénicos Nutristem (STEMGENT®, Cambridge, Mass.) u Opti-MEM más FBS al 2 %. La introducción exitosa del transcrito de ARNm en células huéspedes se puede supervisar usando diversos procedimientos conocidos, tales como un marcador fluorescente o una proteína indicadora, tal como la proteína verde fluorescente (GFP). La transfección exitosa de un ARNm modificado también se puede determinar midiendo el nivel de expresión de la proteína del polipéptido diana mediante, p. ej., transferencia de Western o inmunocitoquímica. Se pueden seguir procedimientos similares para aumento de escala de gran volumen a un formato de cultivo de múltiples litros (5-10 000 l) siguiendo relaciones similares de complejo de ARN-lípido.

4. Ácido nucleico - electroporación

Se puede adquirir ARNm que codifica el transgén de interés y que incluye una secuencia promotora corriente arriba y una cola de poli A corriente abajo, de múltiples proveedores comerciales (p. ej., IDT-DNA, Coralville I A). Los parámetros de electroporación se optimizan transfectando células de linaje eritroide con transcritos de ARNm y midiendo la eficacia de transfección mediante RT-PCR cuantitativa con cebadores diseñados para detectar específicamente los transcritos exógenos. Para determinadas preparaciones de células, la descarga de un condensador de 150 μ F en $2,5 \times 10^6$ células suspendidas en 50 μ l de Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) en una cubeta de electroporación convencional con un hueco de 2 mm es suficiente para el suministro repetido de más de 10 000 copias de transcritos de ARNm modificados por célula, según se determina usando el procedimiento de curva patrón, manteniendo al mismo tiempo una viabilidad alta (>70 %). La densidad celular puede variar de 1×10^6 células/50 μ l a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células/500 μ l y necesita de 110 V a 145 V para transfectar células con eficacias similares medidas en copias de transcrito por célula. Se puede realizar electroporación grande de múltiples litros (5-10 000 l) de manera similar a las estrategias de electroporación de flujo de gran volumen similares a los procedimientos descritos con las restricciones descritas anteriormente (Li y col., 2002; Geng y col., 2010).

5. Polipéptido - liposoma

Se pueden cargar células incluyendo células primarias con diferenciaciones terminales, p. ej., eritrocitos, con proteína exógena en su superficie y en su citoplasma. La carga de proteínas se puede realizar usando liposomas.

5 Los lípidos (reactivo Pro-Ject, Pierce) en disolvente orgánico se secaron en nitrógeno en una película fina en un frasquito de centelleo de vidrio. Se usaron aproximadamente 2 ul de lípidos por cada 10^5 células. Se marcó IgG policlonal de ratón (Abcam) con Dylight-650 (Pierce) según las instrucciones del fabricante. Se añadió una solución de proteína a 0,1 mg/ml en PBS a la mezcla de lípidos seca. La solución se pipeteó varias veces, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, después se agitó vorticialmente de forma vigorosa para generar liposomas encapsulantes. Se añadió medio sin suero para llevar el volumen total a 500 ul por cada 10^5 células. A continuación, la mezcla liposómica se incubó con las células durante 3-4 horas a 37 °C.

10 La figura 1 muestra la carga de una proteína exógena, en este caso, IgG marcada con fluorescencia, en eritrocitos primarios con liposomas. La carga se mide mediante citometría de flujo. La carga depende de la dosis, ya que el 0,06 % de las células son fluorescentes sin liposomas, ~60 % de las células son fluorescentes con una dosis baja de liposomas y ~85 % de las células son fluorescentes con una dosis alta de liposomas. Los datos de la figura 1 son una prueba contundente de que se pueden cargar proteínas exógenas en células eritroides con liposomas.

15 6. Polipéptido - rotura mecánica

Las células pueden cargarse usando un dispositivo de microfluidos que contenga canales de 1 μ m, 2 μ m, 3 μ m, 4 μ m, 5 μ m, 10 μ m de anchura que generan poros de forma transitoria en las células, permitiendo que entre una carga útil cuando las células se presionan a través del sistema.

20 Los dispositivos a base de silicio se fabrican en las instalaciones de microfabricación del Instituto de Tecnología de Massachusetts usando fotolitografía y técnicas de grabado iónico reactivo profundo. En este procedimiento, se tratan obleas de silicio de 15,24 cm con un grosor de 450 μ m con hexametildisilazano, se recubren por centrifugación con fotorresistente (OCG934; FujiFilm) durante 60 s a 3000 rpm, se exponen a luz ultravioleta (EV1; EVG) a través de una máscara cromada con diseño de canal de constricción y se revelan en solución AZ405 (AZ Electronic Materials) durante 100 s. Después de 20 min de horneado a 90 °C, la oblea se graba mediante grabado iónico reactivo profundo (SPTS Technologies) a la profundidad deseada (normalmente 15 μ m). El procedimiento se repite en el lado opuesto de la oblea (es decir, el que no contiene los canales grabados) usando una máscara diferente, que contiene los patrones de los orificios de acceso, y usando un fotorresistente AZ9260 (AZ Electronic Materials) más grueso. A continuación, se usa oxidación húmeda para hacer crecer 100-200 nm de óxido de silicio antes de que la oblea se una de forma anódica a una oblea Pyrex y se trocee en dispositivos individuales. Antes de cada experimento, los dispositivos se inspeccionan visualmente y se montan en un soporte con depósitos de entrada y salida (todos diseñados de forma interna y producidos por Firstcut). Estos depósitos están en contacto con el dispositivo mediante juntas tóricas de Buna-N (McMaster-Carr) para proporcionar un sellado adecuado. El depósito de entrada está conectado a un sistema regulador de presión de fabricación casera que usa tubos de teflón para proporcionar la fuerza impulsora necesaria para empujar el material a través del dispositivo. En primer lugar, se suspende una población de células eritroides en el tampón de suministro deseado [medio de cultivo, PBS o PBS complementado con FBS al 3 % y F-68 al 1 % Pluronic (Sigma)], se mezcla con el material de suministro deseado y se coloca en el depósito de entrada del dispositivo. Este depósito está conectado a una línea de aire comprimido controlada por un regulador y la presión seleccionada (0-482,63 kPa) se usa para impulsar el fluido a través del dispositivo. A continuación, se recogen las células tratadas del depósito de salida. Las células se incuban a temperatura ambiente en la solución de suministro durante 5-20 min después del tratamiento para garantizar el cierre del orificio antes de someterlas a ningún tratamiento adicional. Para suministrar fenilalanina amonio hidroxilasa (PAH) marcada con fluorescencia, los experimentos se realizan como se ha descrito anteriormente, de modo que el tampón de suministro contenga 0,1-0,3 mg/ml de PAH. La atenuación de GFP se mide como el porcentaje de reducción de la intensidad de fluorescencia promedio de una población celular en relación con los controles sin tratar.

45 7. Polipéptido - conjugación de superficie

La superficie celular se trata con reactivo de Traut (2-iminotiolano HCl, Pierce) para tiliar aminas primarias. El reactivo de Traut se disuelve en tampón Tris pH 8 con EDTA para evitar la oxidación de sulfhidrilos. Se usa aproximadamente 1 pmol de reactivo de Traut se usa para tratar 10^6 células. Se incubó el reactivo de Traut con células durante 1 hora a temperatura ambiente. Se elimina el exceso de reactivo o el reactivo que no ha reaccionado mediante centrifugación y lavado de las células. La cantidad de grupos sulfhidrilo disponibles se puede medir usando el reactivo de Ellman. Mientras tanto, se trata un polipéptido antigénico exógeno adecuado con un reticulante de amina a sulfhidrilo, tal como SMCC (Pierce) según las instrucciones del fabricante. El exceso de reactivo reticulante se elimina mediante desalación. A continuación, la proteína funcionalizada con maleimida se incubó con las células tiliadas durante varias horas. La proteína que no ha reaccionado se separa de las células conjugadas mediante centrifugación y lavado.

55 8. Polipéptido - unión a superficie no covalente

El gen de un anticuerpo scFv contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (scFv, descrito en Bose 2003, Molecular Immunology 40: 617) se fusiona con un marcador de afinidad de 6-histidina y con el gen que codifica la secuencia polipeptídica que se une a la glucoforina A de ratón, HWMVLPWLPGLDGGSGCRG, en un vector de expresión de

mamífero (Genlantis). La proteína de fusión completa se produce mediante transfección transitoria de células HEK-293T utilizando procedimientos convencionales y se purifica en una resina de afinidad Ni-NTA (Pierce) según las instrucciones del fabricante. La proteína de fusión purificada se incuba con eritrocitos de ratón a una concentración >100 nM para permitir un rápido equilibrio y unión del péptido a la glucoforina A.

5 9. Polipéptido - inserción de lípidos en la membrana

El reactivo de Traut (Thermo Fisher) se usa para generar grupos sulfhidrilo en una molécula de polipéptido antigénico exógeno adecuado que contiene amina siguiendo el protocolo del fabricante. La mezcla de reacción se incuba durante 1 h a temperatura ambiente (TA) en un agitador y se lava a través de una columna de desalación por centrifugación (Zeba, PCPM 7K, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar el reactivo de Traut sin reaccionar. La generación de grupos sulfhidrilo en el polipéptido modificado se cuantifica usando el reactivo de Ellman (Pierce) según el protocolo del fabricante.

10 Se añade DSPE-PEG₃₄₀₀-mal (1×10^{-3} M en PBS, 4 μ l, relación molar lípido:polipéptido = 1:1) (todos los lípidos adquiridos de Avanti Polar Lipids y almacenados como solución de cloroformo en argón a -20 °C) a la solución de polipéptido desalado y se incuba a TA en un agitador. Después de 1 h, la solución de muestra se filtra usando un dispositivo de filtro centrífugo (Microcon, Millipore Co.) a 14 000 g durante 15 min a 4 °C para eliminar las moléculas pequeñas y se suspende en 600 μ l de PBS (1 mg/ml de polipéptido).

15 Se suspenden 200 μ l de sangre completa en 1000 μ l de PBS y se centrifugan a 1500 g durante 30 s, repetido cuatro veces. Por último, los glóbulos rojos se suspenden en 800 μ l de PBS. La conjugación de eritrocitos/DSPE-PEG-polipéptido se prepara mezclando las suspensiones de eritrocitos anteriores y diversas cantidades de solución de DSPE-PEG-polipéptido (1 mg por ml) seguido de incubación durante 15-30 min a 37 °C. La mezcla se mantiene durante 5 min a temperatura ambiente, después se lava tres veces en PBS y se resuspende hasta una concentración final de eritrocitos de 5×10^8 por ml. Se usa un contador celular automático (Countess, Invitrogen) para medir la concentración celular.

20 10. Polipéptido - carga hipotónica

25 Un polipéptido de antígeno exógeno adecuado, en este caso IgG de ratón, se adquirió de Abcam y se añadió a 0,25 mg/ml a una suspensión de eritrocitos en solución isotónica con un hematocrito (Hct) del 70 %. La suspensión se dializó en 250 ml de una solución hipotónica que contenía fosfato de sodio 10 mM pH 7,4, bicarbonato de sodio 10 mM y glucosa 20 mM, y se agitó a 15 rpm durante 1 hora a 4 °C. A continuación, las células se volvieron a sellar isotónicamente mediante la adición de 1/10 de volumen de solución de sellado que comprendía adenina 5 mM, inosina 100 mM, piruvato de sodio 100 mM, fosfato de sodio 100 mM, glucosa 100 mM, NaCl al 12 % (p/v) a pH 7,4. A continuación, las células se incubaron a 37 °C durante 30 minutos.

30 11. Polipéptido - péptido que penetra en las células

35 La fabricación de polipéptido conjugado con protamina se conoce en la técnica, véase, p. ej., Kwon y col., 2009 J Contr Rel 139 (3): 182. Se mezclan 5 mg/ml de protamina de bajo peso molecular (PBPM) en tampón HEPES 50 mM (pH 8) con el reticulante heterobifuncional ácido 3-(2-piridilditio)propiónico N-hidroxisuccinimida (SPDP, Sigma-Aldrich) a una relación molar 1:10 en DMSO y se agitan durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se trata con ditiotreitól 50 mM (DTT, Sigma-Aldrich) y la PBPM tiolada se purifica mediante HPLC en una columna de afinidad de heparina. El producto se recoge mediante ultrafiltración, se liofiliza y se almacena a -20 °C hasta su uso posterior.

40 Para conjugación, se mezclan 5 mg/ml de polipéptido de antígeno exógeno adecuado con SPDP (40 μ l de SPDP 0,1 M en etanol a 1 ml de solución de proteína) en tampón de fosfato y se agita a temperatura ambiente durante 1 h. El SPDP que no ha reaccionado se elimina mediante desalación rápida e intercambio de tampón mediante FPLC con tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). A continuación, el polipéptido activado se conjuga con un exceso molar de 10 veces de la PBPM-SH preparada anteriormente durante 24 h a 4 °C. Los conjugados de PBPM-polipéptido se aíslan mediante cromatografía de intercambio iónico usando una columna de afinidad de heparina seguida de cinco ciclos de filtración centrífuga (punto de corte de peso molecular: 5000 Da). Se concentran conjugados agrupados de PBPM-polipéptido y se determina el grado de conjugación mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF.

45 Para experimentos de captación, se suspenden eritrocitos nuevos de oveja (MP Biomedicals, Solon, OH) en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) a una densidad de 5×10^8 células/ml y después se incuban con una solución de 0,5 mg/ml de los conjugados de PBPM-polipéptido durante 30 min a temperatura ambiente. con agitación suave. A continuación, los eritrocitos se lavan con HBSS y se almacenan a 2-8 °C.

50 12. Polipéptido - permeabilidad química

55 Se preincubaron 3×10^8 eritrocitos durante 30 min con clorpromazina (Sigma Aldrich) a 200 μ M en solución de Ringer. A continuación, se añadió el polipéptido antigénico exógeno adecuado en solución de Ringer (de 1 a 4 μ M) hasta un volumen final de 400 μ l y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en Ringer y se recogieron para su análisis.

13. Polipéptido - conjugación enzimática

Se conocen en la técnica conjugaciones enzimáticas de la superficie celular con sortasa, véase, p. ej., Shi y col., PNAS 2014 111 (28): 10131. Para marcar el extremo N de GPA con polipéptido, se preincuban 30 μ l de sortasa de *S. aureus* 500 μ M y polipéptido 1 mM con LPETGG en el extremo C en Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, en hielo durante 15 minutos y se añaden a 5×10^7 eritrocitos en DMEM. La sortasa y la mezcla de células se incuban en hielo durante 30 min con un mezclado suave ocasional, después se centrifugan a 500 x g durante 2 min a 4 °C para eliminar el tampón/DMEM, y después se lavan tres veces con 1 ml de PBS helado.

Ejemplo 18: Evaluación de la presencia de polipéptidos

1. Transgén fluorescente

Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Se construyó un transgén que codifica glucoforina A con un marcador HA en el extremo C fusionado con GFP con un péptido T2A vírico intermedio mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Dos días después de la transducción, las células se recogieron, se lavaron en tampón de PBS y se analizaron en un citómetro de flujo (Attune, Life Technologies). La eficacia de transducción se evaluó como el porcentaje de células positivas para GFP en la población.

2. Proteínas de superficie celular

Para las proteínas de superficie celular, se puede detectar el nivel de expresión de la proteína tan pronto como 2 días después de la transfección mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos para la proteína o para un marcador epitópico coexpresado. Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Se construyó un transgén que codifica glucoforina A con un marcador HA en el extremo N mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Dos días después de la transducción, se recogieron las células, se lavaron en tampón de PBS y se tiñeron con una dilución 1:50 de anticuerpo de ratón anti-HA (Abcam) durante 1 h. Las células se lavaron y después se tiñeron con una dilución 1:100 de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón marcado con alexa 488 (Life Technologies) durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron y se analizaron en un citómetro de flujo (Attune, Life Technologies). La eficacia de transducción se evaluó como el porcentaje de células positivas para alexa 488 en la población.

3. Proteínas intracelulares

Para proteínas intracelulares, el nivel de expresión de proteínas puede detectarse tan pronto como 8-12 horas después de la transfección por transferencia de Western. Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Se construyó un transgén que codifica adenosina desaminasa con un marcador HA en el extremo C mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Dos días después de la transducción, las células se recogieron, se lavaron en tampón de PBS y se lisaron en tampón de lisis celular RIPA (Pierce). El lisado celular se desnaturalizó hirviéndolo en DTT 100 mM, después se cargó en un gel prefabricado NuPage SDS-PAGE. Después de la electroforesis y la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, se revelaron las bandas de proteínas mediante tinción con una dilución 1:5000 de anticuerpo de ratón anti-HA (Abcam) seguido de una dilución 1:5000 de HRP de cabra anti-ratón (Pierce) y tratamiento posterior con sustrato de HRP (SuperSignal, Pierce). Se capturaron imágenes usando un aparato de captura de imágenes Amersham (GE healthcare).

40 **Ejemplo 19: Contacto de las células con un agente modificador químico**

Para aumentar la fagocitosis de las células presentadoras de antígenos y promover el direccionamiento al hígado, las composiciones de células descritas en el presente documento se tratan durante 30 min con 0,15 μ M de ionóforo de calcio A23187 (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Francia) a 37 °C o con 5 mM de BS3 (Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, Francia) a temperatura ambiente (TA). Después del procesamiento, los productos finales se almacenan a 2-8 °C en un tampón adecuado.

Ejemplo 20: Evaluación de la expresión y la actividad

La expresión de proteínas exógenas en y sobre células cultivadas se puede evaluar cuantitativamente mediante citometría de flujo (si la proteína se expresa en la superficie) o mediante transferencia de Western (para proteínas expresadas en el citoplasma).

50 1. Citometría de flujo cuantitativa

Se adquirieron perlas de citometría de flujo cuantitativa de unión a Fc anti-ratón (Simply Cellular Calibration) de Bangs Labs. Se adquirieron de BioLegend anticuerpos de ratón marcados con fluorescencia contra receptores relevantes de la superficie celular: glucoforina A, Ckit y receptor de transferrina. Se adquirió anticuerpo de ratón marcado con fluorescencia contra el marcador epitópico HA de Life Technologies. Se cultivaron células eritroides como se describe

en el presente documento. Se construyó un transgén que codifica glucoforina A con un marcador HA en el extremo N mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Al menos dos días después de la transducción, se recogieron 2×10^5 células, se lavaron en tampón de PBS y se tiñeron con una dilución 1:100 de uno de los anticuerpos enumerados anteriormente durante 1 h. Las células se lavaron y se analizaron en un citómetro de flujo (Attune, Life Technologies). El protocolo se repitió para cada uno de los cuatro anticuerpos enumerados anteriormente. La cuantificación se realizó según las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubó una gota de cada una de las cinco muestras de perlas con una dilución 1:100 de un anticuerpo enumerado anteriormente. Las perlas se incubaron durante 1 h, se lavaron en PBS y se analizaron en un citómetro de flujo (Attune, Life Technologies). El protocolo se repitió para cada uno de los cuatro anticuerpos enumerados anteriormente. Las curvas de calibración se ajustaron usando las hojas de cálculo de Excel proporcionadas por el fabricante, de las que se obtuvo la cuantificación de la intensidad de fluorescencia para las señales basadas en células.

2. Transferencia de Western cuantitativa

Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Se construyó un transgén que codifica adenosina desaminasa con un marcador HA en el extremo C mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Dos días después de la transducción, las células se recogieron, se lavaron en tampón de PBS y se lisaron en tampón de lisis celular RIPA (Pierce).

El transgén se introdujo en células HEK293T mediante transfección transitoria usando lipofectamine 2000 (Life technologies). Las células se cultivaron durante una semana y se recogió el sobrenadante. La proteína recombinante se purificó en una columna de afinidad de HA (Pierce) según las instrucciones del fabricante. La concentración de proteína se evaluó mediante absorbancia a 280 nm.

Se realizó transferencia de Western como se describe en el presente documento. Además de las muestras de lisado celular, se procesaron cantidades conocidas de la adenosina desaminasa recombinante en el mismo gel. Después de la captura de imágenes, se usó la intensidad de las bandas recombinantes para generar una curva patrón para cuantificar la cantidad de proteína presente en las muestras de células.

La expresión robusta de transgenes a altos niveles tiene implicaciones importantes para la capacidad terapéutica de la población celular final. La figura 2 cuantifica la expresión de tres proteínas de superficie indicativas de diferenciación y un transgén exógeno por citometría de flujo cuantitativa y demuestra que el transgén se expresa de forma robusta a un nivel alto.

Las células eritroides en cultivo se recogieron en siete puntos temporales durante un procedimiento de diferenciación *in vitro* de cuatro etapas. En el primer punto temporal ("Expansión D6"), las células son precursores hematopoyéticos nucleados. En el punto temporal final ("Dif 3 D8"), las células son predominantemente células eritroides desnucleadas. GPA (triángulos rellenos), un marcador canónico de células eritroides, comienza bajo en las células precursoras y alcanza rápidamente $>1 \times 10^6$ copias por célula. CKIT (cuadrados discontinuos), un receptor para el factor de células madre, comienza alto y después disminuye a $<1 \times 10^4$ copias por célula a medida que se produce la diferenciación. TR (rombos punteados), necesario para el transporte de hierro a las células eritroides, aumenta inicialmente y después disminuye gradualmente a $<1 \times 10^5$ copias por célula. El transgén (círculos vacíos) se introduce al final de la segunda etapa de diferenciación ("Dif 1") y se expresa de manera constante a aproximadamente 1×10^5 copias por célula durante la diferenciación. Los datos anteriores demuestran que los transgenes se expresan de forma robusta en células cultivadas.

La expresión de proteínas exógenas en y sobre células cultivadas se puede evaluar mediante citometría de flujo (si la proteína se expresa en la superficie) como se describe en el presente documento o mediante transferencia de Western (para proteínas expresadas en el citoplasma) como se describe en el presente documento. En los casos en los que un gen exógeno está en una construcción de un solo transcrito que contiene una proteína indicadora fluorescente corriente abajo, la fluorescencia de la proteína indicadora puede usarse como un indicador de la expresión del gen corriente arriba y evaluarse mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento.

La figura 3 A-S muestra la expresión exógena de proteínas de superficie y citoplasmáticas en células eritroides cultivadas desnucleadas. Los datos anteriores demuestran de manera concluyente que se pueden expresar múltiples clases de proteínas, incluyendo citoplasmáticas, de superficie, intactas, fusiones con proteínas de membrana de tipo I, fusiones con proteínas de membrana de tipo II, fusiones con proteínas de membrana ligadas a GPI, fusiones intracelulares, sobreexpresadas y expresadas *de novo*, se pueden expresar en múltiples tipos celulares, incluyendo células eritroides desnucleadas cultivadas, células precursoras eritroides nucleadas cultivadas y células de eritroleucemia K562.

Las figuras 3B y 3F demuestran la expresión simultánea de dos proteínas exógenas en una célula cultivada desnucleada.

En la figura 3B, se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Una construcción transgénica que codifica la secuencia señal de la glucoforina A, un marcador epitópico HA, secuencia codificante de

glucoforina A, secuencia escindible de T2A vírica y GFP se ensamblaron mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Las células se cultivaron hasta la diferenciación terminal como se describe en el presente documento. Las células se analizaron mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento, usando un anticuerpo anti-HA fluorescente y fluorescencia de GFP para detectar la expresión de ambos transgenes.

En la figura 3F, se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Una construcción transgénica que codifica la secuencia señal de la glucoforina A, anticuerpo scFv específico del antígeno de superficie de la hepatitis B, marcador epitópico HA, secuencia codificante de glucoforina A, secuencia escindible de T2A vírica y GFP se ensamblaron mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Las células se cultivaron hasta la diferenciación terminal como se describe en el presente documento. Las células se analizaron mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento, usando un anticuerpo anti-HA fluorescente y fluorescencia de GFP para detectar la expresión de ambos transgenes.

15 **Ejemplo 21: Expresión de proteína a partir de ARNm en plaquetas**

La expresión en plaquetas de proteínas exógenas traducidas a partir de ARNm transfectado exógeno se midió mediante citometría de flujo. En resumen, el suero enriquecido en plaquetas se centrifugó a 190 g durante 15 minutos para eliminar eritrocitos y leucocitos. A continuación, se centrifugó el sobrenadante durante 5 minutos más a 2500 g para sedimentar las plaquetas. Las plaquetas se resuspendieron en 5 ml de tampón de Tyrode con prostaglandina 1 μ M, se lavaron y se resuspendieron en 750 μ l de tampón de Tyrode con prostaglandina 1 μ M. Se mezcló ARNm que codifica el gen de interés, en este ejemplo GFP, con lipofectamine en una relación de 1:1 mg/ml. La mezcla se incubó durante 5 minutos, y después se añadió a la población de plaquetas lavadas. La combinación se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente con oscilación lenta. La expresión plaquetaria del transgén se ensayó mediante citometría de flujo midiendo la fluorescencia de GFP. Las proteínas de superficie también se pueden analizar mediante citometría de flujo. Las proteínas citoplasmáticas u otras expresadas intracelularmente también se pueden analizar mediante transferencia de Western.

Existe relevancia terapéutica para la introducción de proteínas exógenas en y sobre las plaquetas. Ya que las plaquetas no poseen un núcleo o maquinaria de transcripción de ARN, la transfección de ADN no es un medio viable para inducir la expresión de proteínas exógenas en plaquetas. Sin embargo, la transfección y traducción de ARNm es una forma de introducir proteínas exógenas en las células. Se cree que las plaquetas contienen maquinaria de traducción de ARNm, pero hasta ahora no se sabía si son capaces de aceptar y traducir ARNm exógeno en proteína.

La figura 4 es una colección de gráficos de citometría de flujo que demuestran la traducción de ARNm exógeno que codifica un transgén, en este caso GFP, por plaquetas. La GFP se detecta mediante fluorescencia en el canal FL1 después de la excitación con un láser de 488 nm. (4A) Plaquetas sin transfectar (1,7 % de GFP+). (4B) Plaquetas transfectadas con 3 μ g de ARNm de GFP (8,6 % de GFP+). (4C) Plaquetas transfectadas con 6,8 μ g de ARNm de GFP (3,3 % de GFP+).

Los datos demuestran de manera concluyente, por primera vez, la traducción de ARNm exógeno en proteína exógena por las plaquetas.

40 **Ejemplo 22: Actividad de las enzimas**

La figura 5 demuestra la actividad de las enzimas contenidas en células eritroides. La actividad bioquímica de las enzimas citoplasmáticas se evaluó mediante transferencia de Western para determinar la retención de una proteína durante el transcurso de la diferenciación. La actividad biológica de las enzimas citoplasmáticas se evaluó mediante ensayo de actividad enzimática *in vitro*.

La figura 5 muestra la actividad de dos enzimas intracelulares diferentes expresadas en células eritroides cultivadas.

45 **1. Adenosina desaminasa.**

Se construyó un transgén que codifica adenosina desaminasa con un marcador HA en el extremo C mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en células HEK-293T mediante transfección con lipofectamine (Life Technologies) como se describe en el presente documento. La actividad enzimática se analiza usando un protocolo procedente de Helenius 2012, Biochim Biophys Acta 1823 (10): 1967, en el que una mezcla específica de enzimas convierte las purinas en ácido úrico y H₂O₂ seguido de la detección fluorimétrica del H₂O₂ generado. En resumen, dos días después de la transfección, se recogieron células, se aspiró el medio y se añadió glucosa fosfato de Krebs Ringer (KRP; que comprende: NaCl 145 mM, fosfato de sodio 5,7 mM, KCl 4,86 mM, CaCl₂ 0,54 mM, MgSO₄ 1,22 mM y glucosa 5,5 mM; pH 7,35) a las células a 2×10^5 células/ml. Se añadió adenosina a 50 μ M. Después de la reacción durante 6 horas, se recogió el sobrenadante y se inactivó por calor durante 5 minutos a 60 °C. Se transfirieron alícuotas de sobrenadante a pocillos en una microplaca blanca de 96 pocillos que contenía 0,25 U/ml de purina nucleósido fosforilasa bacteriana (PNP) y 0,15 U/ml de xantina oxidasa (XO) microbiana, ambas de Sigma. Después de 20 min de incubación a TA, se añadieron 30 μ l de mezcla de detección de

H₂O₂ que contenía HRP (concentración final 1 U/ml, Sigma) y reactivo Amplex Red (60 µM, Invitrogen, Molecular Probes) a los micropocillos, seguido de la medición de la intensidad de fluorescencia a las longitudes de onda de emisión y excitación de 545 y 590 nm, respectivamente (Tecan Infinite M200).

2. Fenilalanina hidroxilasa

5 Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Se construyó un transgén que codifica fenilalanina hidroxilasa con un marcador HA en el extremo C mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Dos días después de la transducción, las células se recogieron, se lavaron en tampón de PBS y se lisaron en tampón de lisis celular RIPA (Pierce). Se añadieron lisados celulares (64 µg de proteína total) a 1 ml de tampón de reacción que contenía Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, DTT 4 mM, fenilalanina 4 mM, 33 µg de catalasa y DMPH4 0,4 mM (todos de Sigma). Las reacciones se realizaron durante una noche a 37 °C. Después de la incubación, las muestras se desproteinizaron mediante filtración centrífuga en un filtro centrífugo Amicon Ultra-4 de 10 KD (Millipore UFC801024) rotando a 3700 rpm durante 10 min. Las muestras se recogieron y analizaron para determinar la concentración de tirosina mediante absorbancia a 540 nm.

15 Ambas de estas proteínas exógenas se retuvieron hasta el final de la diferenciación terminal, un logro significativo ya que es bien sabido en el campo que las células eritroides experimentan un riguroso programa de eliminación de proteínas innecesarias para la función básica (Liu J y col., (2010) Blood 115 (10): 2021-2027, Lodish HF y col., (1975) Developmental Biology 47 (1): 59). En la figura 5A, la proteína adenosina desaminasa sobreexpresada de forma exógena se detecta mediante transferencia de Western anti-HA en diversos puntos temporales durante el transcurso de la diferenciación, desde células precursoras nucleadas ("Dif I D5") hasta células eritroides desnucleadas ("Dif III D8"). En la figura 5C, la proteína microbiana fenilalanina hidroxilasa sobreexpresada de forma exógena se detecta mediante transferencia de Western anti-HA en diversos puntos temporales durante el transcurso de la diferenciación, desde células precursoras nucleadas ("Dif I D5") hasta células eritroides desnucleadas ("Dif III D8").

25 Adicionalmente, ambas enzimas mantuvieron su capacidad de convertir enzimáticamente el sustrato en producto. La figura 5B muestra la conversión enzimática de adenosina en inosina por células 293T que expresan adenosina desaminasa intactas. La figura 5D muestra la conversión enzimática de fenilalanina en tirosina mediante lisados de células eritroides desnucleadas que expresan fenilalanina hidroxilasa cultivadas.

Estos datos demuestran de manera concluyente que se retienen enzimas exógenas en las células eritroides durante todo el procedimiento de cultivo y que son enzimáticamente activas en células eritroides, lo que tiene importantes consecuencias terapéuticas.

Ejemplo 23: Actividad de CR1

La figura 6 muestra la actividad tanto bioquímica como biológica del receptor del complemento 1 (CR1) sobreexpresado en la superficie de células eritroides cultivadas. La actividad bioquímica de CR1 se evaluó mediante citometría de flujo para determinar la unión a un inmunocomplejo. La actividad biológica de CR1 se evaluó mediante la transferencia de inmunocomplejos a macrófagos en un ensayo de cocultivo.

1. Unión de inmunocomplejos de células que expresan CR1.

Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Se construyó una construcción transgénica que codifica el receptor 1 del complemento (CR1) mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Se evaluaron los niveles de expresión transgénica mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento usando un anticuerpo anti-CR1 (Abcam). Las células se cultivaron hasta la diferenciación terminal como se describe en el presente documento.

Se incubó albúmina de suero bovino (BSA-650) marcada con Dylight 650 con anti-BSA policlona de conejo (Abcam) en un exceso de anticuerpo durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los complejos se mezclaron con suero humano en una relación de volumen de 1:1 durante 30 minutos a 37 °C. Los complejos de control no se mezclaron con suero humano o se mezclaron con suero humano inactivado por calor.

Los complejos se incubaron con las células que expresan CR1 durante 30 minutos a 37 °C. Las células se lavaron y analizaron mediante citometría de flujo para determinar la captura de inmunocomplejos detectando la fluorescencia de Dylight 650.

2. Transferencia de inmunocomplejos a los macrófagos

Se activaron monocitos U937 cultivados mediante incubación con acetato de miristato de forbol (PMA) 100 nM durante 24 horas a 37 °C. Se incubaron células recubiertas con inmunocomplejos (véase anteriormente) con macrófagos U937 activados durante 30 minutos a 37 °C. El cocultivo se analizó mediante citometría de flujo. Los macrófagos se identificaron mediante selección de FSC/SSC. La presencia de inmunocomplejos en los macrófagos se analizó mediante la detección de fluorescencia de Dylight 650 en la población de macrófagos.

La figura 6 muestra la actividad bioquímica y biológica del receptor del complemento 1 (CR1) sobreexpresado de forma exógena en células eritroides cultivadas.

La figura 6A muestra la actividad bioquímica de CR1, definida como la captura de inmunocomplejos *in vitro*. El histograma negro muestra la captura de inmunocomplejos basados en BSA por CR1 sobreexpresado en células eritroides cultivadas. El histograma sombreado muestra la unión mínima de fondo a los complejos de BSA e IgG que carecen de complemento humano, lo que demuestra que el acontecimiento de unión está mediado por CR1.

La figura 6B muestra la actividad biológica de CR1, definida como la transferencia de inmunocomplejos capturados de células eritroides cultivadas a macrófagos. Este es un ensayo convencional en el campo, véase: Repik y col., 2005 Clin Exp Immunol. 140: 230; Li y col., 2010 Infection Immunity 78 (7): 3129. La transferencia se evalúa mediante citometría de flujo y se mide como la intensidad de la fluorescencia procedente de inmunocomplejos marcados en los macrófagos. En este ensayo, los macrófagos que se incuban sin inmunocomplejos (barras negras) no se vuelven fluorescentes. Los macrófagos que se incuban con complejos de BSA e IgG que carecen de complemento (y por lo tanto no se unen a CR1) absorben solo una pequeña cantidad de inmunocomplejo (barras grises rellenas), independiente de la presencia de células eritroides cultivadas que sobreexpresan CR1. Es probable que esta captación se deba a que los receptores Fc-gamma en las células U937 que interactúan con las regiones Fc de las moléculas de IgG. Los macrófagos que se incuban con inmunocomplejos (BSA + IgG + complemento) en ausencia de células que sobreexpresan CR1 (barra rayada, izquierda) captan la misma cantidad de inmunocomplejo que en ausencia de complemento, probablemente por el mismo procedimiento mediado por Fc-gamma. Sin embargo, los macrófagos que se incuban con inmunocomplejos en presencia de células que sobreexpresan CR1 (barra rayada, derecha) absorben casi el doble del número de inmunocomplejos medidos por fluorescencia.

Estos datos demuestran de manera concluyente que la sobreexpresión de CR1 en células eritroides cultivadas permite la captura de inmunocomplejos en dichas células eritroides, facilita la transferencia de inmunocomplejos de las células eritroides a los macrófagos y aumenta significativamente la velocidad y el número de inmunocomplejos captados por los macrófagos.

Ejemplo 24: Actividad de scFv

La figura 7 muestra la actividad bioquímica y biológica del anticuerpo scFv expresado de forma exógena en la superficie de células eritroides cultivadas como una fusión con la proteína transmembrana GPA.

Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Una construcción transgénica que codifica la secuencia líder de glucoforina A, anticuerpo scFv específico del antígeno de superficie de la hepatitis B (scFv, descrito en Bose 2003, Molecular Immunology 40: 617), un marcador epitópico HA, un conector flexible [Gly-3-Ser]2 y el cuerpo de glucoforina A se ensambló mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Se evaluó la expresión transgénica mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento usando un anticuerpo anti-HA (Abcam). Las células se cultivaron hasta la diferenciación terminal como se describe en el presente documento. La actividad bioquímica del anticuerpo scFv se evaluó mediante citometría de flujo para determinar la unión a la proteína diana, en este caso, el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). La proteína HBsAg recombinante (Abcam) se marcó con fluoróforo Dylight-650 (Pierce). Las células que expresan scFv se incubaron con proteína marcada 100 nM, se lavaron en PBS y se analizaron para determinar la fluorescencia de Dylight 650 mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento.

La actividad biológica del anticuerpo scFv se evaluó mediante captura *in vivo* de HBsAg detectada por citometría de flujo. La proteína HBsAg recombinante (Abcam) se marcó con fluoróforo Dylight-650 (Pierce). Las células que expresaban scFv se marcaron de forma fluorescente con CFSE (Sigma). Se inyectaron a ratones NSG inmunodeprimidos (Jackson labs) -400 pmol del HBsAg marcado en la vena de la cola. Unos minutos más tarde, se inyectaron a los mismos ratones 2×10^7 células que expresan scFv. La sangre se recogió mediante punción submandibular a intervalos regulares en un tubo que contenía EDTA. Las células sanguíneas recogidas se lavaron y analizaron mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento. Las células humanas se identificaron como las que eran positivas para CFSE. La captura de HBsAg se detectó como fluorescencia de Dylight 650 en las células humanas.

La figura 7A-7B muestra la actividad bioquímica del anticuerpo scFv, definido como la unión de su antígeno afín, el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). En la figura 7A, las células que expresan (negro) o no expresan (sombreado en gris) el anticuerpo scFv se incuban con HBsAg 450 nM y se tiñen con anticuerpo anti-HBsAg biotinilado y estreptavidina fluorescente. Las células que expresan el anticuerpo scFv (~45 % de las células en este cultivo) se unen al antígeno. En la figura 7B, se incuban células que expresan el anticuerpo scFv con diversas concentraciones de HBsAg y se tiñen como se ha indicado anteriormente, lo que muestra que el acontecimiento de unión depende de la dosis con una afinidad de aproximadamente 10 nM.

La figura 7C-7D muestra la actividad biológica del anticuerpo scFv, definida como la captura de antígeno afín HBsAg mientras está en circulación en un ratón. En este experimento, se inyectaron a ratones NSG inmunodeprimidos - 400 pmol de HBsAg marcado con fluorescencia a través de la vena de la cola. Cinco minutos después, se inyectaron

células eritroides desnucleadas cultivadas (7C) o células eritroides desnucleadas cultivadas que expresaban el anticuerpo exógeno scFv (7D) a través de la vena de la cola. Antes de la inyección, todas las células cultivadas se marcaron con colorante fluorescente CFSE. Se recogió sangre 6 horas después, se analizó en un citómetro de flujo y se seleccionó en células humanas CFSE+. Las células cultivadas desnudas no se unieron a HBsAg (7C), mientras que las células que expresan scFv de anticuerpo se unen a HBsAg (7D). De forma coherente con el experimento de actividad bioquímica, aproximadamente el 45 % de las células en este cultivo expresan anticuerpo-scFv.

Estos datos demuestran que el anticuerpo scFv es bioquímicamente activo cuando se expresa en la superficie de células eritroides cultivadas y que el anticuerpo scFv en la célula eritroide es capaz de unirse a su diana *in vivo* cuando está en circulación. Esto tiene importantes consecuencias para los enfoques terapéuticos en los que se desea la captura, la inmovilización y el aclaramiento de una sustancia en circulación.

Ejemplo 25: Actividad - aclaramiento de la circulación

La figura 8 muestra la actividad tanto bioquímica como biológica de agentes de captura de moléculas de superficie usados para el aclaramiento de la circulación de una diana.

La actividad bioquímica de los agentes de captura, en este caso polipéptido HA y biotina, se evaluó mediante citometría de flujo para determinar la unión a la proteína diana, en este caso anticuerpo anti-HA y anticuerpo antibiotina. La actividad biológica de los agentes de captura se evaluó mediante captura *in vivo* y aclaramiento de la proteína diana detectada por citometría de flujo y cuantificación de proteínas plasmáticas.

1. Captura de anticuerpo antibiotina por células modificadas químicamente

Se adquirieron eritrocitos de un donante humano normal (Research Blood Components). Las células se marcaron con CFSE (Sigma) según las instrucciones del fabricante durante 20 minutos a 37 °C. A continuación, las células se biotinilaron con NHS-biotina (Sigma) según las instrucciones del fabricante usando 0,02 volúmenes de reactivo de biotina de reserva 2 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo antibiotina (Abcam) se marcó de forma fluorescente con Dylight 650 (Pierce). La eficacia de marcado de las células se evaluó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo antibiotina marcado y la fluorescencia de CFSE como marcadores de detección. Se inyectaron 250 ug de anticuerpo marcado en un ratón NSG (Jackson Labs) por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Cuatro horas después, se inyectaron por vía intravenosa 1×10^8 células biotiniladas a través de la vena de la cola. La sangre se recogió mediante punción submandibular a intervalos regulares en un tubo que contenía EDTA. Las células sanguíneas recogidas se lavaron y analizaron mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento. Las células humanas se identificaron como las que eran positivas para CFSE. La captura de anticuerpo antibiotina se detectó como fluorescencia de Dylight 650 en las células humanas. El plasma de la extracción de sangre se analizó mediante ELISA usando una microplaca recubierta con biotina (Pierce) según las instrucciones del fabricante para detectar el nivel de anticuerpo en circulación.

2. Captura de anticuerpos anti-HA por células cultivadas transgénicas

Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Una construcción transgénica que codifica la secuencia señal de la glucoforina A, un marcador epitópico HA, secuencia codificante de glucoforina A, secuencia escindible de T2A vírica y GFP se ensamblaron mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Las células se cultivaron hasta la diferenciación terminal como se describe en el presente documento. Las células se analizaron mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento, usando un anticuerpo anti-HA (Life Technologies) marcado con fluorescencia con Dylight 650 (Pierce) y fluorescencia de GFP para detectar la expresión de ambos transgenes. Se inyectaron 250 ug de anticuerpo anti-HA marcado en un ratón NSG (Jackson Labs) por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Cuatro horas después, se inyectaron por vía intravenosa 1×10^8 células cultivadas a través de la vena de la cola. La sangre se recogió mediante punción submandibular a intervalos regulares en un tubo que contenía EDTA. Las células sanguíneas recogidas se lavaron y analizaron mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento. Las células humanas se identificaron como las que eran positivas para CFSE. La captura de anticuerpo anti-HA se detectó como fluorescencia de Dylight 650 en las células humanas. El plasma de la extracción de sangre se analizó mediante ELISA usando una microplaca recubierta con péptido HA (Pierce) según las instrucciones del fabricante para detectar el nivel de anticuerpo en circulación.

La figura 8 muestra la actividad bioquímica y biológica de (8A-8B) el polipéptido HA expresado en la superficie de células eritroides cultivadas como una fusión con GPA y de (8C-8D) biotina conjugada químicamente con la superficie de eritrocitos primarios. La actividad bioquímica se define como la captura de una proteína diana *in vitro*. La actividad biológica se define como el aclaramiento mejorado de una proteína diana *in vitro*.

En la figura 8A, el polipéptido HA, expresado como una fusión con el extremo N de GPA, captura un anticuerpo anti-HA de ratón *in vivo*. Se inyectó en ratones NSG anticuerpo anti-HA de ratón marcado con fluorescencia, seguido de la inyección de células eritroides humanas cultivadas que no expresan (arriba) o expresan (abajo) el marcador epitópico HA en su superficie como una fusión con GPA. Se extrajo sangre y se analizaron las células en el citómetro de flujo. El eje de abscisas mide la fluorescencia de CFSE. El eje de ordenadas mide la fluorescencia del anticuerpo

anti-HA Dylight 650. Se observan eritrocitos humanos cultivados positivos para CFSE en ambas muestras, pero solo las células que expresan el marcador epitópico HA son capaces de capturar el anticuerpo anti-HA circulante.

5 En la figura 8B, se inyectó a los ratones anticuerpo anti-HA y después, opcionalmente, células eritroides humanas cultivadas que no expresan o expresan el péptido HA en su superficie como una fusión con GPA. Se recogió plasma en múltiples puntos temporales y se evaluó el nivel de anticuerpo anti-HA en plasma mediante ELISA usando una placa recubierta con péptido HA como sustrato. Los ratones a los que se ha inyectado anticuerpo anti-HA solo (círculos vacíos, línea continua: este ratón murió después de 120 minutos por causas no relacionadas con el tratamiento) o con anticuerpo anti-HA seguido de células que no expresan péptido HA en su superficie (línea discontinua) tienen una cantidad significativa de anticuerpo en circulación hasta 24 horas después de la inyección de las células. Por el
10 contrario, los ratones a los que se ha inyectado anticuerpo anti-HA seguido de células que expresan el péptido HA en su superficie tienen agotamiento del anticuerpo diana en unos minutos. Estos datos demuestran de manera concluyente que el anticuerpo diana se elimina rápida y específicamente de la circulación mediante células eritroides cultivadas que expresan polipéptido antigénico exógeno en su superficie.

15 En la figura 8C, la molécula de biotina, conjugada con la superficie de las células eritroides mediante química de funcionalización de amina, captura un anticuerpo de ratón antibiotina. En ambos casos, la captura se evaluó mediante citometría de flujo. Las células que están marcadas con CFSE y biotiniladas se muestran como positivas dobles cuando se tiñen con un anticuerpo antibiotina fluorescente (gráfico de puntos inferior), mientras que las células marcadas con CFSE que no están biotiniladas solo se muestran como positivas individuales (gráfico de puntos superior).

20 En la figura 8D, se inyectó a los ratones anticuerpo antibiotina y después, opcionalmente, células eritroides humanas cultivadas que no están conjugadas o están conjugadas con biotina en su superficie. Se recogió plasma en múltiples puntos temporales y se evaluó el nivel de anticuerpo antibiotina en plasma mediante ELISA usando una placa recubierta con biotina como sustrato. Los ratones a los que se ha inyectado anticuerpo antibiotina solo (círculos vacíos, línea continua) o anticuerpo antibiotina seguido de células que no están conjugadas con biotina en su superficie (línea discontinua) tienen una cantidad significativa de anticuerpo en circulación hasta 24 horas después de la inyección de
25 células. Por el contrario, los ratones a los que se ha inyectado anticuerpo antibiotina seguido de células que se conjugan con biotina en su superficie tienen agotamiento del anticuerpo diana en unos minutos. Estos datos demuestran de manera concluyente que los anticuerpos diana se eliminan rápida y específicamente de la circulación mediante células eritroides cultivadas que contiene polipéptido antigénico exógeno en su superficie.

30 Juntos, los datos demuestran de manera concluyente que los antígenos exógenos adecuados en las CHD que expresan antígenos exógenos son capaces de unirse a sus moléculas diana *in vivo* y mediar en el aclaramiento rápido de la circulación de las moléculas diana cuando están en circulación, lo que tiene importantes consecuencias terapéuticas.

Ejemplo 26: Actividad de los reguladores del complemento

35 La actividad reguladora del complemento de las CHD que expresan antígenos exógenos se evalúa mediante ensayos convencionales de CH50 y AH50 conocidos en la técnica (véase, p. ej., Kabat y col., 1961 Exp Immunochem págs. 133-239 y Platts-Mills y col., 1974 J Immunol 113: 348).

40 En resumen, el ensayo de CH50 utiliza eritrocitos de oveja (SRBC) como células diana. En resumen, se prepara una suspensión que contiene 1×10^9 SRBC/ml en el tampón GVB(2+) (gelatina/solución salina tamponada con Veronal con Ca^{2+} y Mg^{2+}), a pH 7,35. La hemolisina (antisuero de conejo anti-oveja) se valora para determinar la dilución óptima para sensibilizar SRBC. Se mezcla hemolisina diluida (1:800) con un volumen igual de SRBC (1×10^9 SRBC/ml) y el conjunto se incuba a 37 °C durante 15 minutos. Esto da lugar a 5×10^8 /ml de eritrocitos recubiertos con anticuerpo (EA). Se incuban EA (100 μl) con 100 μl de cinco diluciones dobles en serie (1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320) del suero humano normal (NHS) o una dilución similar de la mezcla de NHS y CHD que expresa antígeno exógeno a 37 °C durante 1 hora. Como control se usa NHS incubado con tampón GVB2+. El control de fondo se
45 obtiene incubando EA con tampón solo (no se añade suero) y la lisis total (hemólisis al 100 %) se determina añadiendo agua destilada a EA. La reacción se detiene usando 1,2 ml de NaCl 0,15 M helado, la mezcla se centrifuga para sedimentar las células no lisadas y la densidad óptica del sobrenadante se determina espectrofotométricamente (412 nm). El porcentaje de hemólisis se determina en relación con el control de lisis al 100 %. La actividad del complemento se cuantifica determinando la dilución de suero necesaria para lisar el 50 % de las células en la mezcla de ensayo. Los resultados se expresan como el recíproco de esta dilución en unidades de CH50/ml de suero.

55 En resumen, el ensayo AH50 depende de la lisis de eritrocitos de conejo sin sensibilizar (Erab) por suero humano mediante la activación de la ruta alternativa. La activación de la ruta clásica dependiente del calcio se previene mediante la adición del quelante de calcio, ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), al tampón de ensayo, y se añade magnesio, necesario para ambas rutas, al tampón. En resumen, se prepara una suspensión celular de eritrocitos de conejo (2×10^8 células/ml) en el tampón GVB-Mg2+-EGTA. Se prepara una dilución en serie de 1,5 veces (1:4, 1:6, 1:9, 1:13,5 y 1:20,25) de suero humano normal (NHS) o una dilución similar de la mezcla de NHS y la CHD que expresa antígeno exógeno en tampón GVB-Mg2+-EGTA y se añaden 100 μl de cada dilución de suero a 50 μl de Erab normalizado. Como control se usa NHS incubado con tampón GVB-Mg2+-EGTA. A continuación, la mezcla se incuba a 60 minutos a 37 °C en un baño de agua con agitación para mantener las células en suspensión y se usan 1,2 ml de

NaCl (0,15 M) helado para detener la reacción. Los tubos se centrifugan a 1250 g, a 4 °C, durante 10 minutos para sedimentar las células, y la densidad óptica del sobrenadante se determina espectrofotométricamente (412 nm). El control de fondo tiene 100 µl de tampón GVB-Mg²⁺-EGTA y 50 µl de Erab y no supera el 10 % de la lisis total. En el tubo de control de lisis total se añaden 100 µl de agua destilada a 50 µl de suspensión de Erab y se determina el porcentaje de hemólisis con respecto al control de 100 % de lisis. Se calculan los resultados del ensayo y se cuantifica la actividad del complemento determinando la dilución en suero necesaria para lisar el 50 % de las células en la mezcla de ensayo. Los resultados se expresan como el recíproco de esta dilución en unidades de AH50/ml de suero.

Ejemplo 27: Actividad de la timidina fosforilasa cargada en plaquetas

Se construyó un transgén que codifica timidina fosforilasa con un marcador HA en el extremo C mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. Las plaquetas se cultivan a partir de células precursoras como se describe en el presente documento. El transgén se introduce en las células precursoras de plaquetas cultivadas mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. La expresión de timidina fosforilasa dentro de las plaquetas cultivadas se evalúa mediante transferencia de Western usando un anticuerpo de detección anti-HA, como se describe en el presente documento.

La actividad de la timidina fosforilasa se determina en muestras de plaquetas cuantificando la tasa de conversión de timidina en timina. Se realizan experimentos preliminares para determinar la cinética de formación de metabolitos lineal con respecto al tiempo y la dilución de la enzima; se muestra que el procedimiento es lineal durante un máximo de 16 min, sobre un intervalo de timina fosforilasa de 4,0-719 nmol/min/ml (correspondiente a un intervalo de dilución de la muestra de 10-9088). Se preparan lisados de plaquetas cultivadas de muestras previas al diálisis y muestras de plaquetas de control diluyendo las muestras descongeladas 1:710 con Tris-HCl 125 mM, a pH 7,4. A continuación, se añaden veinticinco ul del lisado de plaquetas a 100 ul de tampón de fosfato de sodio (100 mM, pH 6,5) y 25 ul de patrón de timidina (10 mM), se mezclan y se incuban a 37 °C durante 10 min. La reacción se termina con 25 ul de TCA al 40 %. Se preparan blancos de ensayo añadiendo TCA a la mezcla de incubación de tampón de fosfato de sodio/timidina antes de añadir el lisado de plaquetas. Las muestras se centrifugan a 13 400 x g durante 2 min y el sobrenadante se lava dos veces con éter dietílico saturado de agua durante 2 min en un agitador para extraer el TCA. Para evitar que el éter interfiera con la separación por HPLC, se realiza eliminación eficaz exponiendo la matriz al aire durante 5 min para permitir la evaporación del éter. Se inyecta un volumen de muestra de 10 ul en la HPLC.

Se realiza la separación cromatográfica del sustrato y el producto usando cromatografía de fase inversa con elución isocrática usando un sistema Waters Alliance HPLC 2795. Se usa una columna C18 prerrellena (Spherisorb ODS de 125 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µm, Waters) como etapa estacionaria. Los analitos se eluyen usando una fase móvil de acetato de amonio (40 mM) con el agente de emparejamiento de iones hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (5 mM) ajustado a pH 2,70 con HCl, suministrado a un caudal de 1,0 ml/min, con un tiempo de ejecución de 8 min. La detección UV es a 254 nm y 0,1 unidades de absorbancia a escala completa. Los metabolitos se identifican comparando espectros con patrones puros.

Ejemplo 28: Actividad del antígeno de Goodpasture presentado en plaquetas

Se construye un transgén que codifica el antígeno del dominio NC1 de colágeno alfa-3(IV) (COL4A3) fusionado con el extremo N de CD42b (GP1B, genbank AAH27955.1) con un marcador HA intermedio mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. Las plaquetas se cultivan a partir de células precursoras como se describe en el presente documento. El transgén se introduce en las células precursoras de plaquetas cultivadas mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. La expresión del antígeno exógeno en las plaquetas cultivadas se evalúa mediante citometría de flujo usando un anticuerpo de detección anti-HA como se describe en el presente documento.

Se extrae suero de un paciente que padece el síndrome de Goodpasture y se analiza el suero para detectar anticuerpos anti-COL4A3 mediante ELISA comercial (equipo de ELISA MyBioSource COL4A3). La capacidad de unión de las plaquetas que expresan antígenos se evalúa mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento, usando este suero anti-COL4A3 como anticuerpo de detección primario y anti-IgG humana fluorescente como anticuerpo de detección secundario.

El aclaramiento facilitado por plaquetas de un antígeno circulante *in vivo* se modela en un ratón usando las plaquetas que expresan antígenos. Se inyectan a ratones NSG 100 ul de anticuerpo de ratón anti-COL4A3 humano (Creative BioMart) marcado con fluorescencia con colorante Dylight 650. Las plaquetas cultivadas marcadas con CFSE (10⁸ por ratón) que expresan el antígeno exógeno se inyectan después a través de la vena de la cola. Se extrae sangre de una ubicación submandibular a los 10 min, 30 min, 2 h, 12 h y 24 h. La sangre se centrifuga para recoger la fracción rica en plaquetas, que después se tiñe y analiza mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento. La captura de anticuerpos por las plaquetas se determina mediante el seguimiento de la población doble positiva para CFSE-Dylight 650.

Ejemplo 29: Actividad *in vivo* (ratón)

Se cultivan células eritroides de ratón como se describe en el presente documento. Se transducen células precursoras eritroides con un transgén de polipéptido antigénico exógeno adecuado, p. ej., que codifica el receptor 1 del

complemento (CR1) usando un lentivirus como se describe en el presente documento. Las células se cultivan hasta la diferenciación terminal como se describe en el presente documento. La presencia de la proteína exógena en las células se evalúa mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento. Las células se marcan con un colorante fluorescente, p. ej., CFSE (Sigma Aldrich) según las instrucciones del fabricante para ayudar en su detección. Las células se inyectan en un modelo de ratón de lupus NZBWF1/J u otro modelo adecuado de enfermedad o actividad correspondiente al polipéptido antigénico exógeno adecuado, aproximadamente 1×10^8 células inyectadas a través de la vena de la cola. La sangre se recoge en múltiples puntos temporales mediante punción submandibular. Los niveles de inmunocomplejos en el plasma se detectan mediante el ensayo de células Raji, véase, p. ej., Theofilopoulos y col., 1976, J Clin Invest 57 (1): 169. La farmacocinética de las células cultivadas se evalúa mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento, rastreando el porcentaje de células fluorescentes por CFSE en la muestra de sangre extraída. La salud general del ratón se evalúa mediante necropsia macroscópica, incluyendo histología del tejido renal para rastrear la reducción de la deposición de inmunocomplejos y el daño mediado por la inflamación.

Ejemplo 30: Cribado rápido

Las líneas celulares, p. ej., 293T y K562, tienen ciclos de cultivo y expresión más cortos (-1 día) en comparación con las células eritroides cultivadas (días - semanas). Estas líneas celulares pueden usarse para progresar rápidamente a través de una genoteca que codifica polipéptidos antigénicos exógenos adecuados para identificar el polipéptido antigénico exógeno con la mayor expresión o actividad.

Se construye una biblioteca de transgenes de polipéptidos antigénicos exógenos adecuados, p. ej., variantes de longitud completa y más cortas del receptor del complemento 1 (CR1), mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. La biblioteca de transgenes se transfecta en células HEK293T de forma paralela en una placa de microtitulación usando lipofectamine como se describe en el presente documento y se transduce en células K562 usando lentivirus como se describe en el presente documento. La expresión de los antígenos exógenos se evalúa mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento después de 24-48 horas. La actividad de cada uno de los antígenos exógenos en la biblioteca se evalúa mediante la captura del inmunocomplejo fluorescente detectado con citometría de flujo como se describe en el presente documento y mediante la transferencia de inmunocomplejos fluorescentes a monocitos cultivados detectados con citometría de flujo como se describe en el presente documento. Los antígenos exógenos de la biblioteca que son más funcionales, p. ej., se expresan más, capturan la mayoría de los inmunocomplejos o transfieren mejor los inmunocomplejos a los monocitos, se transducen después individualmente en cultivos de células eritroides paralelos como se describe en el presente documento usando lentivirus como se describe en el presente documento. La expresión de cada antígeno exógeno en células eritroides cultivadas se evalúa mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento. La actividad de cada antígeno exógeno en células eritroides cultivadas se evalúa mediante captura de inmunocomplejos fluorescentes detectada con citometría de flujo como se describe en el presente documento y mediante la transferencia de inmunocomplejos fluorescentes a monocitos cultivados detectada con citometría de flujo como se describe en el presente documento.

Ejemplo 31: Evaluación de la tasa de aclaramiento de eritrocitos *in vivo*

Se evaluó la tasa de aclaramiento de células eritroides *in vivo* en un modelo de ratón inmunodeprimido. Los ratones NSG se trataron el día -1 con 100 μ l de solución de liposoma de clodronato (Clodrosomes.com) para agotar selectivamente los macrófagos. Las células se marcaron con el marcador fluorescente CFSE y se inyectaron aproximadamente 1×10^8 células en cada ratón a través de la vena de la cola. A intervalos regulares se extrajo sangre mediante punción submandibular y se recogieron células sanguíneas. Las células se tiñeron conjuntamente con anticuerpos anti-GPA humanos y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células eritroides humanas se distinguieron de las células eritroides de ratón por la señal de CFSE y por la señal de GPA humana.

Para aplicaciones terapéuticas, es importante que las células eritroides cultivadas y las células eritroides cultivadas que contienen proteína exógena, ya sea intracelularmente o en la superficie, circulen normalmente *in vivo*. Esto se muestra en la figura 9 usando un modelo de ratón inmunodeprimido convencional. En la figura 9A, la sangre recogida de un ratón inyectado se analiza en el citómetro de flujo. Las células eritroides humanas cultivadas se identifican en el cuadrante superior derecho del gráfico, doble positivas para CFSE y GPA humana. En la figura 9B, se inyectaron a los ratones glóbulos rojos humanos (círculos rellenos), células eritroides desnucleadas cultivadas (rombos discontinuos), células eritroides desnucleadas cultivadas que expresan una proteína exógena intracelular (cuadrados punteados) y células eritroides desnucleadas cultivadas que expresan una proteína exógena de superficie (triángulos vacíos). La tasa de aclaramiento de las células humanas se mide como el porcentaje de células CFSE+ que quedan a lo largo del tiempo, calculado con respecto al punto temporal inicial (20 minutos después de la inyección). No hay una diferencia significativa en la tasa de aclaramiento entre las cuatro muestras.

Estos datos demuestran claramente que las células eritroides desnucleadas cultivadas tienen una circulación sustancialmente similar a la de los glóbulos rojos humanos normales. Asimismo, las proteínas exógenas expresadas en el espacio intracelular o en la superficie de las células no afectan sustancialmente el comportamiento circulatorio de estas células. Este es un resultado importante para la traducción terapéutica de la tecnología.

Ejemplo 32: Evaluación de acontecimientos circulatorios adversos

La incidencia de acontecimientos adversos provocados por cultivos de células eritroides en circulación se evaluó mediante la detección de productos de degradación del fibrinógeno en sangre e histología en animales a los que se han inyectado células eritroides cultivadas.

- 5 Detección de productos de degradación del fibrinógeno. Se inyectaron a los ratones células eritroides cultivadas como se describe en el presente documento. Se recogió sangre de ratones mediante punción submandibular en un tubo que contenía EDTA. Las células se separaron por centrifugación y se recogió el plasma. Los niveles de productos de degradación del fibrinógeno, fibrinopéptido A y fibrinopéptido B, se midieron en plasma de ratón mediante ELISA (MyBiosource) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 10 Histología. Se recogieron muestras tisulares de los mismos ratones después de la necropsia. Se recortaron los tejidos, se incluyeron en parafina y se seleccionaron. Las secciones tisulares se tiñeron mediante tinción de HyE y tinción tricrómica. Se tomaron imágenes microscópicas con un aumento de 10x y 20x.

15 Para aplicaciones terapéuticas, es importante que las células eritroides cultivadas y las células eritroides cultivadas que contienen proteínas exógenas (ya sea intracelularmente o en la superficie) no induzcan acontecimientos adversos, tales como la activación de la cascada de coagulación y la formación de trombos tisulares.

20 Las figuras 10A y 10B muestran los niveles de fibrinopéptido A y B en plasma de ratón para ratones inyectados con (1) glóbulos rojos humanos, (2) células eritroides desnucleadas cultivadas, (3) células eritroides desnucleadas cultivadas que expresan una proteína exógena intracelular, (4) células eritroides desnucleadas cultivadas que expresan una proteína exógena de superficie y (5) proteína recombinante sola. Los niveles de fibrinopéptido A y B, un marcador de degradación del fibrinógeno y activación de la cascada de coagulación, son sustancialmente similares para todas las muestras.

25 Las figuras 10C y 10D muestran secciones de bazo teñidas histológicamente para un ratón al que se han inyectado células eritroides desnucleadas cultivadas (10C) y proteína recombinante (10D). No hay una diferencia sustancial entre el tejido y no se observó daño tisular identificable en el bazo, hígado, pulmón, cerebro, corazón y riñón entre cualquiera de las muestras.

Estos datos demuestran de manera concluyente que las células eritroides cultivadas, con o sin proteína exógena, no inducen ningún acontecimiento adverso mientras estén en circulación en ratones.

Ejemplo 33: Evaluación de la retención de proteínas exógenas en circulación

30 La retención de proteínas exógenas en y sobre células eritroides desnucleadas cultivadas se evaluó mediante citometría de flujo y transferencia de Western.

1. Retención de proteína exógena evaluada por citometría de flujo

35 Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Una construcción transgénica que codifica la secuencia señal de la glucoforina A, anticuerpo scFv específico del antígeno de superficie de la hepatitis B, El marcador epitópico HA y la secuencia codificante de glucoforina A se ensamblaron mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Las células se cultivaron hasta la diferenciación terminal como se describe en el presente documento. Las células se marcaron con fluorescencia con CFSE y se inyectaron en un ratón NSG inmunodeprimido (Jackson Labs) a través de la vena de la cola (1×10^8 células por ratón). A intervalos regulares, se extrajo sangre mediante punción submandibular. Las células recogidas se tiñeron con un anticuerpo anti-HA fluorescente (Abcam) y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células humanas se identificaron como células CFSE+ y la retención de proteínas exógenas se evaluó mediante la fracción de células CFSE+ que también se tiñeron positivamente para el marcador epitópico.

2. Retención de proteína exógena evaluada mediante transferencia de Western

45 Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Se ensambló una construcción transgénica que codificaba adenosina desaminasa y un marcador epitópico HA mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Las células se cultivaron hasta la diferenciación terminal como se describe en el presente documento. Las células se marcaron con fluorescencia con CFSE y se inyectaron en un ratón NSG inmunodeprimido (Jackson Labs) a través de la vena de la cola (1×10^8 células por ratón). A intervalos regulares, se extrajo sangre mediante punción submandibular. Las células recogidas se lavaron, lisaron y analizaron mediante transferencia de Western como se describe en el presente documento con un anticuerpo de detección contra el marcador epitópico HA.

50 Para aplicaciones terapéuticas, es importante que las células eritroides cultivadas que contienen proteínas exógenas retengan, ya sea intracelularmente o en la superficie, estos transgenes cuando están en circulación. Este logro es

significativo ya que existe una hipótesis generalizada en el campo de que las células eritroides se someten a un programa riguroso de maduración y eliminación de proteínas innecesarias para la función básica cuando están en circulación a medida que maduran (Liu J y col., (2010) Blood 115 (10): 2021-2027, Lodish HF y col., (1975) Developmental Biology 47 (1): 59).

5 La figura 11 muestra que se conservaron en circulación proteínas exógenas expresadas en y sobre células eritroides desnucleadas cultivadas. En la figura 11A, se inyectaron a los ratones células eritroides desnucleadas cultivadas que expresaban el anticuerpo scFv en su superficie. El porcentaje de células positivas para anticuerpo scFv comenzó y permaneció estable en aproximadamente el 50 % durante el transcurso del estudio de circulación de varios días. En la figura 11B, se inyectaron a los ratones células eritroides desnucleadas cultivadas que expresaban una enzima citoplasmática con un marcador HA o con enzima recombinante con un marcador HA. Cuando se analiza mediante transferencia de Western, resulta evidente que la enzima se retuvo dentro de la célula cultivada durante el transcurso del experimento. La disminución de la intensidad de la banda se puede atribuir al aclaramiento de las células durante el experimento, no a la eliminación de enzimas exógenas de dichas células.

15 Los datos demuestran claramente que se retienen proteínas exógenas expresadas en y sobre células eritroides desnucleadas en cultivo en y sobre las células en circulación, lo que tiene implicaciones enormes y sin precedentes para la relevancia terapéutica.

Ejemplo 34: Evaluación de la extensión de la semivida *in vivo*

20 Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. Se ensambló una construcción transgénica que codificaba adenosina desaminasa y un marcador epitópico HA mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en las células eritroides mediante transducción lentivírica como se describe en el presente documento. Las células se cultivaron hasta la diferenciación terminal como se describe en el presente documento. Las células se marcaron con fluorescencia con CFSE y se inyectaron en un ratón NSG inmunodeprimido (Jackson Labs) a través de la vena de la cola (1×10^8 células por ratón). A intervalos regulares, se extrajo sangre mediante punción submandibular. Las células recogidas se lavaron, lisaron y analizaron mediante transferencia de Western como se describe en el presente documento con un anticuerpo de detección contra el marcador epitópico HA.

25 Se construyó un transgén que codifica adenosina desaminasa con un marcador HA en el extremo C mediante ensamblaje de Gibson como se describe en el presente documento. El transgén se introdujo en células HEK-293T mediante transfección con lipofectamine (Life Technologies) como se describe en el presente documento. La proteína se purificó del sobrenadante de cultivo celular después de 7 días usando una resina de afinidad de HA (Pierce) según las instrucciones del fabricante. La concentración de proteína se evaluó mediante absorbancia de luz a 280 nm. Se inyectó proteína (40 ug) en un ratón NSG inmunodeprimido (Jackson Labs) a través de la vena de la cola. A intervalos regulares, se extrajo sangre mediante punción submandibular. El plasma se analizó mediante transferencia de Western como se describe en el presente documento con un anticuerpo de detección contra el marcador epitópico HA.

30 En la figura 11B, se inyectaron a los ratones células eritroides desnucleadas cultivadas que expresaban una enzima citoplasmática con un marcador HA o con enzima recombinante con un marcador HA. Cuando se analiza mediante transferencia de Western, resulta evidente que la semivida en circulación de la enzima se prolonga significativamente cuando se expresa dentro de una célula circulante en comparación con cuando se inyecta en forma soluble.

Ejemplo 35: Evaluación de la tasa de aclaramiento *in vivo* - plaquetas

35 Se cultiva una población de plaquetas que expresan timidina fosforilasa exógena usando el procedimiento detallado en el presente documento y se marca con CFSE y se inyecta en un ratón NSG a través de la vena de la cola. Una población de plaquetas nativas de origen humano se marca de manera similar con CFSE y se inyecta en otro ratón. Se toman muestras de ambos ratones a los 10 min, 1 h, 4 h, 8 h, 24 h y 48 h y se usa citometría de flujo para cuantificar los niveles en circulación de plaquetas. Se compara la semivida de las plaquetas naturales frente a las cultivadas.

Ejemplo 36: Evaluación de acontecimientos circulatorios adversos - plaquetas

40 Para aplicaciones terapéuticas, es importante que las plaquetas cultivadas y las plaquetas cultivadas que contienen proteínas exógenas (ya sea intracelularmente o en la superficie) no induzcan acontecimientos adversos, tales como la activación de la cascada de coagulación y la formación de trombos tisulares. Tras la inyección de plaquetas cultivadas en un ratón NSG a través de la vena de la cola, los productos de degradación del fibrinógeno, el fibrinopéptido A y el fibrinopéptido B, se detectan en plasma de ratón mediante ELISA siguiendo el protocolo del fabricante (MyBiosource). Se recogen muestras tisulares de ratones NSG después de la necropsia. Se recortan los tejidos, se incluyen en parafina y se seleccionan. Las secciones tisulares se tiñen mediante tinción de HyE y tinción tricrómica. Se toman imágenes microscópicas con un aumento de 10x y 20x y un patólogo capacitado las evalúa para detectar cualquier elemento patógeno.

Ejemplo 37: Evaluación de la retención de proteínas exógenas en circulación - plaquetas

La retención de proteínas exógenas en y sobre plaquetas cultivadas se evalúa mediante citometría de flujo y transferencia de Western.

5 Se inyectan plaquetas marcadas con CFSE que contienen proteína exógena intracelular en un ratón a través de la vena de la cola. A intervalos regulares, se extrae sangre mediante punción submandibular. La sangre se centrifuga para aislar el plasma rico en plaquetas, que después se lisa y analiza mediante transferencia de Western con tinción para un marcador epitópico presente en la proteína exógena.

Ejemplo 38: Adquisición de células donantes para producción

10 Después de obtener el consentimiento informado, donantes sanos de células madre CD34+ reciben rhG-CSF (Granocyte o Neupogen), 10 ug/kg/día s.c., durante 5 días para la movilización de células madre de sangre periférica y después se someten a aféresis durante 2 días consecutivos para recoger CMH CD34+ movilizadas. Se aíslan células mononucleares (CMN) de sangre periférica movilizada mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll y se dividen en dos partes. Una parte se usa para purificar células CD34+ mediante el uso de perlas magnéticas recubiertas con anti-CD34 (Miltenyi Biotec, Inc., Alemania), en relación con el protocolo de Miltenyi. Se controla la pureza de las fracciones CD34+. Las CMH enriquecidas con CD34+ se usan después inmediatamente en el procedimiento de cultivo de dos etapas o se congelan hasta su uso en el procedimiento de cultivo de una etapa.

15 El medio completo (MC) usado es RPMI 1640 (Eurobio, Francia), complementado con L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina 100 UI/ml (Gibco, Grand Island, NY, Estados Unidos) y FBS inactivado por calor al 10 % (Gibco). Se usa IMDM (Gibco), complementado con FBS inactivado por calor al 10 %, para la expansión. El factor de células madre humanas recombinantes (rhSCF), trombopoyetina (TPO), ligando de tirosina cinasa 3 del hígado fetal (Flt-3L), GM-CSF y TNF-alfa se adquieren de R&D Systems (Mineápolis, MN, Estados Unidos).

Ejemplo 39: Ampliación para producción

25 Se aumenta el volumen de las células eritroides de manera progresiva, manteniendo las células a una densidad de entre 1×10^5 y 2×10^6 células/ml en cultivo estático. La etapa de expansión se siembra a 10^5 /ml e incluye 3-7 transferencias de volumen progresivas; 100 ml, 500 ml, 1 l, 10 l, 50 l, 100 l, 100 l. Durante el transcurso de la producción, el medio celular incluye una combinación de IMDM, FBS, BSA, holotransferrina, insulina, glutamina, dexametasona, beta estradiol, IL-3, SCF y eritropoyetina. Cuando las células alcanzan un volumen adecuado para sembrar en el biorreactor de producción, se transfieren al biorreactor de producción para su ampliación y diferenciación final.

Ejemplo 40: Cultivo de células en un biorreactor (Wave)

30 El sistema de biorreactor WAVE 2/10 se configura según el manual del operario. En resumen, el Cellbag se ensambla en la unidad de balanceo, que se coloca en el módulo de perfusión. Después de inflar la bolsa con aire, el peso se ajusta a cero. Posteriormente, la bolsa se llena con la cantidad adecuada de medio de cultivo y se incuba durante al menos dos horas, permitiendo que el medio alcance los 37 °C. Los medios y las células se transfieren a la bolsa a través de un matraz de transferencia, un frasco de vidrio DURAN de diseño específico con dos orificios. En la parte superior del matraz, se conecta un filtro al orificio. En el otro orificio, por el fondo del matraz, se ensambla un tubo. El tubo del matraz de transferencia se acopla a la conexión de alimentación en la Cellbag. El matraz de transferencia se mantiene en una campana LAF, para disminuir el riesgo de contaminación.

35 Antes de iniciar la perfusión, los tubos y recipientes para recogida y alimentación se conectan a la Cellbag. El tubo se prepara de la siguiente manera; se equipa un tubo de silicona Saniflex ASTP-ELP de 50 o 70 cm de longitud (Gore/Saniflex AB), con un diámetro interno y externo de 3,2 y 6,4 mm respectivamente, con conexiones de cierre Luer macho en ambos extremos. El tubo de silicona se conecta a un extremo de un tubo C-Flex, a través de un cierre Luer hembra. En el otro extremo del tubo C-Flex se ensambla un cierre Luer macho y a continuación se esterilizan los tubos en autoclave. Los cierres Luer se mantienen en su sitio con bridas en todos los tubos. Antes de la perfusión, la parte de silicona se conecta a la Cellbag y la parte C-Flex a un recipiente de 5 l (Hyclone Labtainer) tanto para la alimentación como para la recogida. Todas las conexiones se realizan en una cabina de flujo de aire laminar.

40 El control de factores ambientales y metabólicos puede alterar la expresión o actividad de factores de transcripción y proteínas reguladoras génicas de células eritroides en cultivo, véase, p. ej., Csaszar y col., 2009 Biotechnol Bioeng 103 (2): 402; Csaszar y col., 2012 Cell Stem Cell 10 (2): 218. Para proporcionar control sobre las entradas y salidas en el reactor, se crea un sistema de suministro de microvolúmenes, un componente clave del cual es un capilar de sílice fusionada de 60-80 cm de longitud (n.º TSP100375, Polymicro Technologies) con un diámetro interno de 100 um. En el extremo de entrada, el capilar se alimenta con una jeringa desechable con punta Luer-Lok (n.º 309585 BD) conectada a través de un luer PEEK a un adaptador MicroTight (n.º P-662, Upchurch Scientific). La jeringa desechable se carga en una bomba de jeringa doble modelo 33 (n.º 553333, Harvard Apparatus), conservada en una nevera a 4 °C. En el extremo de salida, el capilar entra en el biorreactor: una bolsa de cultivo celular FEP de dos orificios (n.º 2PF-0002, VueLife) colocada en un agitador orbital en una incubadora de cultivo celular a 37 °C con CO₂ al 5 %. El capilar se alimenta a través de una membrana de caucho autosellante (n.º B-IIS, InterLink) con una aguja, en el punto medio del biorreactor. El conector opuesto en el biorreactor se reemplaza con una membrana de caucho autosellante adicional. Las jeringas desechables y los capilares de suministro se bloquean durante una noche antes de su uso con

una solución de PBS con suero bovino fetal al 10 % para evitar la adhesión de proteínas a las paredes de la jeringa y los capilares.

5 Se usa LabVIEW 7.1 de National Instruments para crear un programa para controlar las inyecciones de la bomba de jeringa. La estrategia de dosificación básica del programa es una inyección inicial a la concentración L1 seguida de un tiempo de espera t1 e inyecciones posteriores, cada uno a la concentración L2 y seguido del tiempo de espera t2, repetido n veces. El usuario introduce el caudal, la concentración de reserva, el volumen de cultivo inicial, la concentración deseada después de las inyecciones, el tiempo entre inyecciones y el número total de inyecciones.

Ejemplo 41: Evaluación de la inmunogenicidad e inducción de tolerancia

1. Inducción de tolerancia en ratones

10 En ratones, se puede inducir tolerancia mediante 3 inyecciones intravenosas secuenciales con una composición celular de la divulgación que comprende una proteína antigénica, en este ejemplo, ovoalbúmina (OVA). Se inyecta en ratones sin exposición previa los días -7, -3 y -1 OVA libre u OVA expresada dentro de la composición celular de la divulgación (OVA celular). A continuación, los ratones se inmunizan frente a OVA mediante dos inyecciones del antígeno mezclado con adyuvante de poli I:C (Invivogen, San Diego, CA) para inducir una fuerte respuesta inmunitaria.

15 2. Evaluación del título de anticuerpos

Los niveles de IgG en suero de ratón se evalúan mediante ELISA convencional. En resumen, se obtiene suero en diversos puntos temporales de muestras de sangre de ratones a los que se ha inyectado una composición celular de la divulgación que comprende una proteína antigénica, p. ej., ovoalbúmina (OVA), y de ratones a los que se ha inyectado OVA libre o recombinante. Se usa un ensayo ELISA convencional, con OVA como antígeno (1 µg/ml en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,7) adsorbido en placas de ensayo. Las muestras de suero se diluyen en serie en el intervalo de 1:50-1:200 para suero de pretratamiento o sin tratamiento, y 1:400-1:500 000 para suero de postratamiento y se analizan por duplicado. La unión de anticuerpos anti-OVA en suero a la OVA recombinante adsorbida se detecta de forma colorimétrica con una inmunoglobulina secundaria antirratón conjugada con peroxidasa de rábano picante, seguido de tratamiento con un sustrato cromogénico.

25 3. Análisis de las respuestas de linfocitos T

Se induce tolerancia a la proteína antigénica OVA como se describe en el presente documento. Los ratones se sacrifican 7 días después de la segunda administración de la inyección de fase de inmunización de OVA y se recogen sus bazo. Se obtienen suspensiones de células del bazo filtrando los órganos a través de un filtro de células de 70 micrómetros y después de la lisis de eritrocitos con una solución de cloruro de amonio al 0,8 % (Stem-Cell Technologies, Grenoble, Francia). Todas las muestras se incuban con anticuerpo anti-receptor de Fc (anti-CD 16/32 purificado, Ozyme, San Diego, CA) para prevenir la unión inespecífica antes de las incubaciones con anticuerpos para análisis. Los siguientes anticuerpos monoclonales (Ab) se usan para la tinción de las células del bazo: PC5-anti-CD62L (MEL14) y PC7-anti-CD8, adquiridos de Biolegend. Se adquieren tetrámeros de péptido OVA-MHC (tetrámeros de PE-Kb-SIINFEKL) de Beckmann Coulter. Los linfocitos T específicos de OVA se identifican mediante citometría de flujo como células que son doblemente positivas mediante tinción con tetrámeros de péptido OVA-MCH y anti-CD8. De esta población celular, se determina el porcentaje de linfocitos T CD8 específicos de OVA que se activan mediante la fracción de células que son positivas al teñir el anticuerpo anti-CD62L.

4. Ensayo de lisis de linfocitos T *in vivo*

40 Se pulsan células del bazo sin exposición previa a 10 microgramos/ml de péptido STTNFEKL (Genscript, Piscataway, NJ) a 37 °C durante 1 hora y después se marcan con CFSE 0,4 microM (CFSE bajo). Una población de control de esplenocitos sin tratar se marca con CFSE 4 microM (CFSE alto). Las células CFSE bajo y CFSE alto se combinan en una relación de 1:1 y se inyectan células 1E7 por ratón por vía i.v. a ratones en los que se ha inducido tolerancia previamente al antígeno OVA como se describe en el presente documento o a ratones que se han inmunizado con antígeno OVA como se describe en el presente documento. Dieciséis horas después, se preparan suspensiones unicelulares de bazo como se describe en el presente documento y se analizan usando citometría de flujo para determinar la relación de células CFSE bajo/CFSE alto.

Ejemplo 42: Evaluar la expansión y diferenciación de células eritroides cultivadas

50 Es importante evaluar la expansión, diferenciación y desnucleación *in vitro* de células diferenciadas para garantizar que la introducción de un transgén no afecte de forma negativa a la calidad de las células en cultivo. La expansión se evalúa mediante recuento celular. La diferenciación se evalúa mediante citometría de flujo, transferencia de Western y RT-PCR. La desnucleación se evalúa mediante citometría de flujo.

55 Evaluación de la tasa de expansión mediante recuento celular. Se cultivan células eritroides como se describe en el presente documento. En diversos puntos temporales, las células se recogen, se lavan con PBS y se cuentan usando un instrumento Contador de Células Automático Countess (Life Technologies). La tasa de expansión de las células está determinada por el crecimiento del número de células a lo largo del tiempo.

- 5 Evaluación de la diferenciación por citometría de flujo. Se cultivan células eritroides como se describe en el presente documento. En diversos puntos temporales, las células se recogen, se lavan con PBS y se tiñen con diluciones 1:100 de anticuerpos fluorescentes contra los marcadores de superficie celular GPA (CD235a), CKIT (CD117) y TR (CD71), adquiridos de Life Technologies. Las células marcadas se analizaron mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento.
- 10 Evaluación de la diferenciación por transferencia de Western. Se cultivan células eritroides como se describe en el presente documento. En diversos puntos temporales, las células se recogen, se lavan con PBS, se lisan con tampón RIPA y se analizan mediante transferencia de Western como se describe en el presente documento usando anticuerpos para los marcadores de diferenciación GATA1, GATA2, banda 3, CD44 y actina (Abcam).
- 15 Evaluación de la desnucleación por citometría de flujo. Se cultivan células eritroides como se describe en el presente documento. En diversos puntos temporales, las células se recogen, se lavan con PBS y se tiñen con un anticuerpo fluorescente contra glucoforina A (Life Technologies) y la tinción de ácido nucleico DRAQ5 (Pierce) en las diluciones recomendadas por el fabricante, y se analizan en un citómetro de flujo Attune como se describe en el presente documento.
- 20 Evaluación de la desnucleación por microscopia (Bencidina-Giemsa). Se cultivaron células eritroides como se describe en el presente documento. En diversos puntos temporales, las células se recogieron, se lavaron con PBS y se centrifugaron sobre portaobjetos usando un Cytospin (Thermo Scientific). Las células se fijaron después del cytopspin con metanol a -20 °C durante 2 min a temperatura ambiente, se aclararon con agua y se secaron al aire. Se disolvió una pastilla de bencidina (Sigma n.º D5905) con 10 ml de PBS, al que se añadieron 10 µl de H₂O₂. La solución se filtró con un filtro de jeringa de 0,22 µm. La mancha celular en el portaobjetos se cubrió con 300-500 µl de solución de bencidina, se incubó a temperatura ambiente durante 1 h, y después se lavó con agua. La tinción de Giemsa se diluyó (Sigma n.º GS500) 1:20 con agua. La mancha celular en el portaobjetos se cubrió con 300-500 µl de solución de Giemsa, se incubó a temperatura ambiente durante 40 minutos, se lavó con agua y se secó al aire. A continuación, se montaron y sellaron los portaobjetos antes de capturar imágenes en un microscopio.
- 25 La figura 12A muestra la tasa de expansión de células eritroides en cultivo durante una ventana de expansión y diferenciación de siete días para células que contienen transgenes (línea discontinua y línea punteada) y células que no contienen un transgén (línea continua). Cabe destacar que la tasa de expansión de células cultivadas que contienen un transgén es indistinguible de la de las células que no contienen un transgén.
- 30 La figura 12B es una colección de gráficos de citometría de flujo para células teñidas con anticuerpos contra los marcadores de diferenciación de la superficie celular GPA y CKIT. En esta etapa particular de diferenciación, el cultivo está perdiendo su expresión de CKIT y aumentando su expresión de GPA a medida que las células se acercan a la maduración terminal. Cabe destacar que las células cultivadas que contienen un transgén son indistinguibles de aquellas que no contienen un transgén por esta métrica de diferenciación.
- 35 La figura 12C es una colección de gráficos de citometría de flujo para células teñidas con un anticuerpo contra el marcador de superficie GPA y una tinción de ADN fluorescente. Son evidentes tres poblaciones de células: (1) células que tienen GPA alto y ADN bajo, que comprenden células eritroides desnucleadas; (2) células que tienen GPA alto y ADN alto, que comprenden células eritroides que aún contienen material genético; y (3) células que tienen GPA bajo y ADN alto, que comprenden pirocitos o los núcleos eyectados encapsulados en la membrana de células desnucleadas. Cabe destacar que las células cultivadas que contienen un transgén son indistinguibles de aquellas que no contienen un transgén por esta métrica de desnucleación.
- 40 La introducción de un transgén en el cultivo celular no afecta notablemente a la tasa de expansión, la diferenciación o la tasa de desnucleación de las células en cultivo.

Ejemplo 43: Evaluación del contenido de hemoglobina

1. Hemoglobina total

- 45 El contenido de hemoglobina en eritrocitos se determinó mediante el reactivo de Drabkin (Sigma-Aldrich, producto D5941) según las instrucciones del fabricante. En resumen, las células sanguíneas se combinaron con el reactivo en un tampón acuoso, se mezclaron exhaustivamente y se midió la absorbancia de la luz a una longitud de onda de 540 nm usando un espectrofotómetro convencional. Se usó una curva patrón de hemoglobina soluble para cuantificar el contenido de hemoglobina en las células.

2. Tipificación de hemoglobina por RT-PCR

- 55 Las células se lisaron y se recogió el ARN total. Se llevó a cabo transcripción inversa con el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript para RT-PCR (Life Technologies) según el protocolo del fabricante. En resumen, se incubó el ARN total (5 µg) con 150 ng de cebador hexamérico aleatorio y 10 nmol de mezcla de dNTP en 10 µl de H₂O durante cinco minutos a 65 °C y después 1 minuto en hielo. La mezcla maestra de reacción se preparó con 2 µl de tampón RT 10x, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de DTT 0,1 M y 1 µl de RNaseOUT. La mezcla de reacción se añadió a la mezcla de ARN/cebador, se mezcló brevemente y después se colocó a temperatura ambiente durante 2 min. Se

añadió 1 ul (50 unidades) de SuperScript II RT a cada tubo, se mezcló y se incubó a 25 °C durante 10 min. La reacción se incubó a 42 °C durante 50 min, se inactivó por calor a 70 °C durante 15 min, después se almacenó en hielo. Se añadió 1 ul de RNasa H y se incubó a 37 °C durante 20 min. Este producto de reacción, el ADNc de 1ª hebra, se almacenó después a -20 °C hasta que fue necesario para la reacción de RT-PCR.

- 5 Se adquirieron cebadores para amplificar los diferentes genes de hemoglobina y genes de control de IDT-DNA. Los cebadores fueron los siguientes: hHBB_F - tcctgaggagaagtctgccgt (SEQ ID NO: 9); hHBB_R - ggagtggacagatccccaag (SEQ ID NO: 10); hHBA_F1-tctcctgccgacaagaccaa (SEQ ID NO: 11); hHBA_R1 - gcagtggttagctgaagttg (SEQ ID NO: 12); hHBA_F2 - caactcaagctaagccactgc (SEQ ID NO: 13); hHBA_R2 - cggtgctcacagaagccag (SEQ ID NO: 14); hHBD_F - gactgctgtcaatgccctgt (SEQ ID NO: 15); hHBD_R-aaaggcacctagcaccttctt (SEQ ID NO: 16); hHBG2_F - cactggagctacagacaagaaggtg (SEQ ID NO: 17); hHBG2_R - tctcccacatagaagataccagg (SEQ ID NO: 18); hHBE_F- aagagcctcaggatccagcac (SEQ ID NO: 19); hHBE_R - tcagcagtgatggatggacac (SEQ ID NO: 20); h18S-RNA-F - cgcagctaggaataatggaatagg (SEQ ID NO: 21); h18S-RNA-R-catggcctcagttccgaaa (SEQ ID NO: 22).

- 15 Se preparó una mezcla de reacción de RT PCR con 25 ul de mezcla SYBR Green (2x) (Applied Biosystems), 0,5 ul de ADNc de 1ª cadena, 2 ul de mezcla de pares de cebadores directo/inverso (cada cebador a 5 pmol/ul), en un volumen total de 50 ul de H₂O. Las reacciones se ejecutaron en un instrumento ABI Prism SDS 7000 (applied biosystems) usando el siguiente ciclo de amplificación: 50 °C 2 min, 1 ciclo; 95 °C 10 min, 1 ciclo; 95 °C 15 s -> 60 °C 30 s -> 72 °C 30 s, 40 ciclos; 72 °C 10 min, 1 ciclo. Se realizó análisis de la curva de disociación y los resultados de RT-PCR con el instrumento SDS 7000.

Ejemplo 44: Evaluación de la diferenciación de plaquetas cultivadas - FACS

- 20 El estado de diferenciación de las plaquetas en cultivo se puede evaluar mediante citometría de flujo. Los megacariocitos (MC) representan una morfología celular definida que precede a la diferenciación plaquetaria terminal. Para determinar el grado de maduración hacia MC, se lavan 1×10^6 células cultivadas (células LAMA-84 y CD34+) y después se marcan con (a) anti-CD41-FITC (GpIIb/IIIa; BD Bioscience, San José, CA, Estados Unidos) o anti CD71-FITC o (b) anti-CD33-FITC, anti-CD41-PE, anti-CD45-PerCp y CD34-APC (Beckman Coulter, Fullerton, CA, Estados Unidos) y se analizó el porcentaje de células CD41 generadas.

- 25 Para determinar la cantidad de ploidía, las células LAMA-84 diferenciadas se fijan durante una noche en etanol al 75 % a 4 °C y se marcan con yoduro de propidio (PI, 50/μg/ml) y se analizan usando FACScalibur (Becton Dickinson), mientras que las células CD34+ diferenciadas del día 14 se analizan de forma cuantitativa en un microscopio después de la tinción de May-Grunwald/Giemsa cuantificando el número de núcleos por célula y la morfología específica de MC con esta tinción. Solo se analizan las células con morfología de MC. La presencia de células multinucleadas en la preparación de cytospin es indicativa de la presencia de MC poliploides. Se evalúa la presencia de MC maduros multinucleados mediante morfología en células CD34+ diferenciadas.

Ejemplo 45: Evaluación de la diferenciación de plaquetas cultivadas - qPCR

- 35 El estado de diferenciación de las plaquetas en cultivo se puede evaluar mediante PCR cuantitativa. El ARN plaquetario se extrae para caracterizar adicionalmente las células cultivadas. Se extrae ARN total con el reactivo TRIzol (Invitrogen). La pureza de cada preparación de plaquetas se evalúa mediante análisis de PCR de marcadores de plaquetas (GPIIIa) y leucocitos (CD45). La integridad del ARN plaquetario se evalúa usando Bioanalyzer 2100 (Agilent) antes de realizar análisis adicionales.

- 40 Se recoge el ARN total del lisado celular y se genera una biblioteca de ADNc usando un equipo de síntesis comercial (Clontech). Los ADNc marcados se cuantifican con el equipo de ADNbc Quant-iT PicoGreen (Invitrogen) y se diluyen a 3 pM para cargarlos en un solo carril y secuenciarlos en un analizador genómico Illumina 1G (Solexa).

- 45 Las secuencias sin procesar se filtran mediante criterios de control de calidad en serie. En primer lugar, se verifica la presencia de al menos 6 nt del adaptador 3' Solexa. Se descartan las lecturas de secuencias que no cumplieron este criterio, mientras que las demás se recortan para eliminar la secuencia adaptadora alojada en el extremo 3'. Los marcadores restantes se filtran adicionalmente con respecto a su longitud (>10 nt), número de copias (>4 lecturas) y legibilidad (<9 nucleótidos no identificados, anotados como N). Las lecturas que cumplen con todos esos criterios se definen posteriormente como lecturas utilizables.

- 50 Todas las lecturas utilizables se alinean con pre-microARN extraídos de la base de datos miRBase. Los marcadores de secuencias que coinciden perfectamente con más de un precursor se distribuyen por igual entre ellos. Para dar cuenta de la escisión imperfecta por Drosha y Dicer, cualquier marcador de secuencia que coincida perfectamente con el pre-microARN en la región de microARN madura, que permita un desplazamiento de hasta 4 nt en comparación con la posición de microARN maduro de referencia, se considera microARN maduro. El nivel de expresión de microARN se define como el número de lecturas que mapean cada microARN maduro normalizado con respecto al número total de lecturas utilizables, considerando que el número total de ARN pequeños es invariable. La abundancia relativa de cada microARN se define como el número de lecturas que mapean cada microARN en comparación con el número total de lecturas que mapean microARN maduros.

Ejemplo 46: Purificación por centrifugación

Las fracciones de células cultivadas se pueden purificar y separar de los núcleos y los tipos celulares contaminantes de densidad alternativa mediante centrifugación. Las células se centrifugan a 200 g durante 15 minutos para aislar una fracción rica en eritrocitos y reticulocitos. El sobrenadante se retira mediante pipeta y después se lava la fracción celular deseable en tampón de Tyrode modificado (que contiene NaCl 138 mM, dextrosa 5,5 mM, NaHCO₃ 12 mM, CaCl₂ 0,8 mM, MgCl₂ 0,4 mM, KCl 2,9 mM, Na₂HPO₄ 0,36 mM y Hepes 20 mM, pH 7,4) en presencia de prostaglandina 12 1 µM y se resuspende en el mismo tampón.

Ejemplo 47: Purificación por desnucleación química

La desnucleación de células cultivadas puede estimularse mediante aditivos químicos al cultivo, lo que puede ayudar a aumentar la fracción desnucleada de células antes de la purificación. Se cultivan células eritroides como se describe en el presente documento. 48 horas antes de la recogida, las células se incuban con Me₂SO 210 mM. A continuación, las células se recogen mediante centrifugación a 350 X g durante 5 min a temperatura ambiente, se resuspenden a un nivel de 3 × 10⁵ células por ml en medio nuevo que contiene Me₂SO 210 mM y citocalasina B 5 µg/ml (u otra molécula de manipulación del núcleo o actina, es decir, p38 MAPK, psoralenos) y se incuban a 37 °C. La proporción de células sin núcleos se evalúa mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento, usando DRAQ5 como tinción de ácido nucleico y anticuerpos contra glucoforina A como marcador de diferenciación de la superficie de eritroides.

Ejemplo 48: Purificación por acustoforesis

Pueden usarse varios sistemas de separación mecánica para obtener una población celular uniforme. La acustoforesis de flujo libre representa un procedimiento de separación mecánica (Petersson 2007, American Chemical Society). Mientras está suspendido en solución salina (0,9 mg/ml) con aditivos nutritivos, incluyendo CsCl (0,22 g/ml), se añade a la solución salina. Una suspensión de muestra que contiene células eritroides cultivadas se procesa usando un chip de acustoforesis (Cell-Care) con dos salidas activas (caudal 0,10 ml/min por salida).

Se usan bombas de jeringa (WPI SP260P, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL) para controlar los caudales en el chip. Todas las salidas están conectadas individualmente a jeringas de vidrio de alta precisión (1005 TLL y 1010 TLL, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Suiza) a través de los inyectores usando tubos de teflón, lo que permite el control independiente de los caudales de salida. La entrada de líquido limpio está conectada a una bomba de jeringa y la entrada de suspensión celular a un tubo de teflón de 50 mm de longitud (0,3 mm de d.i.) con el otro extremo sumergido en un vaso de precipitados del que se aspira la suspensión de muestra a una velocidad definida por la diferencia entre el flujo de salida neto y el flujo de entrada de líquido limpio.

El ultrasonido usado para inducir la onda estacionaria entre las paredes del canal de separación se genera usando una cerámica piezoeléctrica de 20x20 mm (Pz26, Ferroperm Piezoceramics AS, Kvistgard, Dinamarca) unida a la parte posterior del chip. El gel ultrasónico (Aquasonic Clear, Parker Laboratories Inc., Fairfield, NJ) garantiza un buen acoplamiento acústico entre los dos. La cerámica piezoeléctrica se acciona mediante un amplificador de potencia (modelo 75A250, Amplifier Research, Souderton, PA) conectado a un generador de funciones (HP 3325A, Hewlett-Packard Inc., Palo Alto, CA). Aunque las ondas acústicas entran en el chip desde la parte posterior, se induce una onda estacionaria entre las paredes laterales del canal de separación como resultado del acoplamiento de las vibraciones mecánicas a lo largo de los tres ejes de la estructura cristalina.

El procedimiento de separación se supervisa usando un microscopio convencional y un vatímetro (vatímetro ThruLine 43, Bird Electronic Corp., Cleveland, OH). El procedimiento se puede controlar posteriormente sintonizando la frecuencia de la señal, la potencia de actuación y los caudales.

Las distribuciones de tamaños celulares en las muestras se analizan usando un contador Coulter (Multisizer 3, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Cada muestra se mezcla con un electrolito (Isoton II, Beckman Coulter Inc.) y se analiza usando una apertura de 100 µm. El nivel de hemólisis, es decir, la concentración de hemoglobina libre de glóbulos rojos dañados, se mide usando un fotómetro (fotómetro de plasma/HB bajo, HemoCue AB, Angelholm, Suecia).

Ejemplo 49: Purificación por maduración *ex vivo*

Se pueden conducir células eritroides que no son completamente maduras a la madurez mediante incubación *ex vivo* en un sistema que imita los desencadenantes naturales de la maduración *in vivo*.

1. Cocultivo con células estromales

En la etapa final del cultivo, las células eritroides se cultivan en una capa estromal adherente en medio nuevo sin citocinas. Los cultivos se mantienen a 37 °C en CO₂ al 5 % en aire. La capa de células adherentes consiste en la línea celular del estroma MS-5 o células estromales mesenquimatosas (MSC) establecidas a partir de médula ósea adulta normal completa (véase Prockop, DJ (1997) Science 276: 71) en RPMI (Invitrogen) complementado con suero de ternera fetal al 10 %. Las MSC adherentes se expanden y purifican a través de al menos dos pases sucesivos antes de su uso en cocultivo.

2. Cultivo en placas recubiertas con fibronectina

En la etapa final del cultivo, Las células eritroides se cultivan en placas adsorbidas con fibronectina humana. Para producir estas placas, la fibronectina (Sigma Aldrich) se reconstituye con 1 ml de H₂O estéril/mg de proteína y se permite que se disuelva durante al menos 30 minutos a 37 °C. Puede quedar una pequeña cantidad de material sin disolver. Esto no afectará el rendimiento del producto. La solución de fibronectina se diluye 100x en solución salina equilibrada estéril y se añade a la superficie de cultivo con un volumen mínimo. La superficie de cultivo se deja secar al aire durante al menos 45 minutos a temperatura ambiente. El exceso de fibronectina se elimina por aspiración.

Ejemplo 50: Purificación por magnetoforesis

Se conocen en la técnica estrategias para separar, enriquecer y/o purificar células eritroides mediante magnetoforesis, véase, p. ej., Zborowski y col., 2003, Biophys J 84 (4) 2638 y Jin y Chalmers 2012, PLOS One 2012 7 (8): e39491. Se usa un sistema de separación magnética comercial (separador QuadroMACS™ que combina cuatro unidades de separación MidiMACS™ y columnas LD, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) para el enriquecimiento de eritrocitos magnéticos a partir de cultivos de eritrocitos procedentes de CMH. Las células se desoxigenan en una cámara de guantes inflable Glove-Bag™ (Cole Parmer, Vernon Hills, IL), llena de nitrógeno (nitrógeno Medipure™, concentración >99 %, Praxair, Inc., Danbury, CT). Antes de la desoxigenación, todos los materiales y equipos, incluyendo el sistema de separación, tampón estéril desgasificado (PBS + EDTA 2 mM + BSA 0,5 %) y tubos de recogida estériles se colocan en la bolsa de guantes, que después se sella herméticamente. Los cultivos desoxigenados se cargan directamente en una columna MACS® LD que se colocó en el separador QuadroMACS™ mantenido en condiciones anóxicas dentro de una cámara de guantes inflable llena de gas N₂. Las células que pasan a través de la columna contenida en el imán se etiquetan como fracción negativa y se espera que sean "no magnéticas", incluyendo CMH y células eritroides antes de la maduración final. Las células retenidas en la columna de separación se etiquetan como fracción positiva, que es "magnética" y consiste en células de tipo eritrocítico en maduración casi llenas de hemoglobina funcional. Se eluyen de la columna LD después de retirarla del imán. Una vez finalizada la separación, las células oxigenadas se recuperan de forma reversible mediante la exposición de las células recogidas al aire.

Ejemplo 51: Purificación por FACS

Se clasifica una población de células cultivadas eritroides usando un clasificador celular Becton-Dickinson Aria IIu. Antes de clasificar, las células se recogen, se lavan con PBS y se tiñen con un anticuerpo fluorescente contra glucosforina A (Life Technologies) y la tinción de ácido nucleico DRAQ5 (Pierce) en las diluciones recomendadas por el fabricante. Se usa una boquilla de 100 µm con una frecuencia de accionamiento de gotas de 28 000 gotas/segundo. La frecuencia de umbral de muestras es de aproximadamente 4000 acontecimientos/segundo. Se usa la opción de control de la temperatura para mantener la muestra y los tubos de recogida a 4 °C durante todo el transcurso de la clasificación. Adicionalmente, se usa la función de agitación de la muestra a 200 rpm para evitar que la muestra se sedimente durante la clasificación. La muestra se clasifica en alícuotas de aproximadamente 750 µl repartidas con la jeringa. Al mismo tiempo, durante estas pausas los tubos de recogida se mantienen a 4 °C, protegidos de la luz, y se mezclan suavemente antes de reanudar la clasificación. Las muestras clasificadas se recogen en un tubo de recogida de vidrio de borosilicato de 12 x 75 mm que contiene 250 µl de DMEM complementado con FCS al 10 %.

Ejemplo 51: Purificación por tratamiento enzimático de células

La obtención de eritrocitos alogénicos puede aprovechar la eliminación de los antígenos A y B para generar un producto con compatibilidad universal. Esto puede facilitarse mediante un conjunto de enzimas capaces de escindir de forma selectiva los grupos galactosa, haciendo que las células eritroides sean más inmunogénicamente favorables.

Se producen dos tipos de proteínas recombinantes de endo-β-galactosidasa, que se han identificado originalmente partir de *Clostridium perfringens*, en *E. coli* BL-21 usando procedimientos de clonación convencionales. Se prepara ABasa para liberar Ag A/B y endo-β-galactosidasa C (EndoGalC) para liberar Galα1-3Galβ1-4GlcNAc (Gal Ag), que se sabe que es muy inmunogénica en xenotrasplantes y tiene una estructura de hidratos de carbono que se asemeja al Ag A/B. ABasa escinde el enlace Galβ1-4GlcNAc en sangre de grupo A [GalNAcα1-3(Fuca1-2) Galβ1-4GlcNAc] y en sangre de grupo B [Galα1-3(Fuca1-2) Galβ1-4GlcNAc].

En resumen, después de la clonación de ABasa, se construye un plásmido de expresión con un marcador His C-terminal en el vector pET-15b eabC sin péptido señal. Este gen exógeno se usa para transformar células *E. coli* BL-21. La enzima producida en las células como una fracción de proteína soluble se purifica sobre una columna de ácido níquel-nitrilotriacético (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). Por último, se obtienen 5 ml de ABasa recombinante purificada a la concentración de 3,6 mg/ml con la actividad específica de 1500 U/mg. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 µmol del sustrato por minuto.

Se examina el efecto del tratamiento de ABasa sobre la presencia de Ag, la unión de Ab y la activación del complemento. Los eritrocitos A/B humanos se digieren con ABasa y se someten a análisis de citometría de flujo después de la incubación con sueros humanos con reactividad cruzada (anti-A o anti-B o anti-A y B que contienen; grupo B, grupo A o grupo 0, respectivamente). La intensidad de fluorescencia media (IFM) se usa para cuantificar el nivel de expresión de Ag del grupo sanguíneo A, B y Gal. El nivel de digestión se expresa como un porcentaje de Ag del grupo sanguíneo A o B expresado en eritrocitos después de la incubación en ausencia de ABasa.

Se agrupan sueros de sangre nueva de grupo 0 de tres voluntarios humanos sanos y se congelan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para conservar la actividad del complemento endógeno hasta su uso. Se usan sueros inactivados por calor (durante 30 min a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$) para el análisis de la unión de Ab. Los eritrocitos con y sin digestión enzimática (ABasa) se incuban con sueros de grupo sanguíneo 0 al 50 % (100 μl) diluidos con solución salina tamponada con fosfato que contiene albúmina de suero bovino al 0,2 % (PBS/BSA) durante 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después del lavado, los eritrocitos reaccionan con IgG/IgM antihumanas marcadas con FITC (DAKO, Glostrup, Dinamarca) ($\times 30$, 100 μl) durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después se someten a análisis de citometría de flujo.

El efecto inhibitor del tratamiento enzimático sobre la activación del complemento también se evalúa mediante el cambio de la deposición de C3d. Después de incubar los eritrocitos con sueros humanos al 50 % en presencia de actividad del complemento durante 15 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, los eritrocitos se hacen reaccionar con Ab de conejo anti-C3d humano marcado con FITC (DAKO, Glostrup, Dinamarca) ($\times 100$, 100 μl) durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después se aplican a análisis de citometría de flujo. El porcentaje del nivel de control (en ausencia de enzima) se calcula basándose en IFM para evaluar el efecto inhibitor del tratamiento enzimático sobre la unión de Ab y la deposición de C3d.

Ejemplo 52: Purificación de plaquetas mediante centrifugación

Las plaquetas se pueden purificar a partir de suspensiones de células mixtas mediante centrifugación. Se distribuyen unos 40 ml de sangre total en tubos de extracción de sangre con citrato de sodio al 3,2 % usado como anticoagulante. Los tubos se centrifugan a $400 \times g$ durante 10 min. Después de esta etapa, tres capas están claramente delimitadas: plasma, glóbulos rojos y una zona intermedia. El plasma está en la parte superior con las plaquetas, los glóbulos rojos están en la parte inferior debido a su mayor densidad; y la zona intermedia blanquecina, fina, consiste en plaquetas y leucocitos mayores y se denomina capa leucocitaria. Usando una aguja Jelco 18G, se extrae la parte superior del plasma con plaquetas y se coloca la capa leucocitaria en otros dos tubos, esta vez sin aditivos: un tubo para producir plasma (tubo P) y el otro para producir trombina (tubo T). Solo se usan 1,5 ml de plasma para producir trombina, al que se añaden 0,5 ml de gluconato de calcio al 10 %, con 15 min al baño María a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, los dos tubos se centrifugan de nuevo, esta vez a $800 \times g$, durante el mismo periodo de tiempo ($T = 10$ min). Después de esta centrifugación final, el tubo T contiene un líquido rico en trombina, mientras que el tubo P contiene la sedimentación plaquetaria y algunos glóbulos rojos (grupo de eritrocitos-plaquetas). En esta etapa, el volumen se reduce al eliminar dos tercios del volumen plasmático total. La parte extraída tiene pocas plaquetas, mientras que la parte restante con las plaquetas sedimentadas (que se dispersan fácilmente al agitar) es rica en plaquetas.

Ejemplo 53: Incorporación de timidina

El potencial de autorreplicación de una población celular se puede evaluar usando un ensayo de incorporación de timidina conocido en la técnica, véase, p. ej., Harkonen y col., 1991 Exp Cell Res 186L288 y Tanaka y col., 1992 PNAS 89: 8928.

En resumen, se obtiene timidina uniformemente enriquecida en 13C y 15N [U-13C, 15N-TdR] de Martek Biosciences (Columbia, MD) y se adquiere 3 H-TdR (80 Ci/mmol) de ICN Radiochemicals (Irvine, CA). Los medios y tampones se obtienen de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Todas las enzimas excepto fosfodiesterasa son de Boehringer Mannheim (Indianápolis, IN). Se obtiene fosfodiesterasa II de Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ). Los disolventes de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) son de EM Science (Gibbstown, NJ) y contenían $<0,1$ ppm de residuo de evaporación.

Se cultivan células eritroides como se describe en el presente documento. Después del cultivo, las células se recogen para su uso en el ensayo de incorporación de timidina.

Las células se marcan con [U-13C, 15N]-TdR a 1,6 $\mu\text{g/ml}$ durante 18 h, con la adición de timidina no enriquecida para lograr una concentración final de timidina de 1 μM . Después de lavarlos con solución salina tamponada con fosfato, las células se cultivan en DMEM complementado durante 6 h más antes de añadirse 3 H-TdR a las concentraciones indicadas (0,1-10 $\mu\text{Ci/ml}$) para otra incubación de 18 h. Se añade timidina sin marcar a las muestras para llevar la concentración final de timidina a 0,13 μM , que es equivalente a la concentración de 3 H-TdR en las muestras que reciben 10 μCi de radiomarcaje/ml. Después de la eliminación de 3 H-TdR, las células se incuban en DMEM complementado durante 6-54 h adicionales antes del aislamiento de ADN.

El ADN se extrae usando el equipo de aislamiento de ADN Puregene modificado (Gentra Systems, Mineápolis, MN). En función del número de células de la muestra, se usa un procedimiento de aumento/reducción de escala para determinar los volúmenes de reactivos añadidos. Por ejemplo, cuando se usan 1×10^7 células, se añaden 21 μl que contienen 328 μg de proteinasa K a 3 ml de solución de lisis celular. Después de mezclar, la muestra se deja durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se añaden 10 μg de RNasa y la muestra se mezcla y se incuba durante 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se añade una solución de precipitación de proteínas (1 ml) y la muestra se incuba en hielo durante 5 min. Después de centrifugar durante 10 min a 2000 g, el sobrenadante que contiene ADN se mezcla con 3 ml de 2-propanol al 100 % y se invierte suavemente 50 veces o hasta que se hacen visibles hilos blancos de ADN. A continuación, la muestra se centrifuga a 2000 g durante 5 min. El sedimento de ADN resultante se seca durante 5 min antes de lavarlo en 3 ml de etanol al 70 % y se vuelve a centrifugar durante 5 min a 2000 g. El sedimento final se seca al aire y después se rehidrata en H₂O desionizada y se cuantifica por absorción a 260 nm. El mismo procedimiento se

aplica a las células madre CD34+ como control de la capacidad de replicación.

5 Cualquier ADN se desnatura hirviéndolo durante 3 min, después se enfría rápidamente en hielo. El procedimiento de hidrólisis enzimática se lleva a cabo con una concentración de ADN de 0,5 mg/ml. El siguiente protocolo describe el volumen de reactivo añadido por mililitro de solución de ADN. El ADN se hidroliza con 10 µl de nucleasa P1 (0,5 U/µl) y 5 µl de DNasa I (4 U/µl) en 10 µl de tampón que contiene MgCl₂ 200 mM, ZnCl₂ 100 mM y Tris 1 M, pH 7,2, durante 2 h a 45 °C, seguido de la adición de 20 µl de fosfodiesterasa (4 mU/µl) e incubación adicional durante 2 h a 37 °C. Por último, se añaden 5 µl de acetato de amonio 10 M (pH 9,0) y 10 µl de fosfatasa alcalina (1 U/µl) y las muestras se incuban durante otras 2 h a 37 °C.

10 La muestra de ADN digerida se filtra con un filtro de nailon de 0,22 µm. Esta muestra se analiza con el sistema HPLC/CRI/IRMS, usando una columna de HPLC Supelcosil LC-18-S de 4,6 x 250 mm (Supelco, Bellefonte, PA). Se usa el mismo sistema de disolvente a 1 ml/min y un gradiente lineal de 5 % a 25 % de B en 15 min.

15 Después de la separación por HPLC, los desoxinucleósidos se analizan usando espectrometría de masas de interfaz de reacción química (CRIMS, por sus siglas en inglés). En este procedimiento, los desoxinucleósidos fluyen hacia un sistema de nebulización y desolvatación impulsados por una corriente de helio, en el que emergen como un haz de partículas secas. Las abundancias de ¹³CO₂/¹²CO₂ de este CO₂ generado en línea se determinan con un espectrómetro de masas de relación de isótopos Finnigan/MAT Delta S (ThermoFinnigan, San José, CA) y el sistema de datos Isodat que lo acompaña. Se usa 5-fluorodesoxiuridina (Sigma) como patrón de relación de isótopos internos.

20 Se obtienen las relaciones de isótopos (RI en la siguiente ecuación) para tres nucleósidos de cada muestra: T, dA y dG. El enriquecimiento de CO₂ procedente de cada desoxinucleósido derivado de ADN se calcula mediante la ecuación (13)CO₂ (por mil) = 1000 x (RI experimental - patrón de RI)/patrón de RI. Para mantener el mayor nivel de coherencia interna y evitar cualquier deriva interexperimental, la relación de isótopos para dG se resta en todos los experimentos de la relación de isótopos para T. Se evalúan los datos desde el final del periodo de marcaje de isótopos estables (día 0) hasta el final del lavado (día 3).

Ejemplo 54: Cuantificación de material nuclear

25 El número de células en una población mixta que contienen ADN se evalúa mediante citometría de flujo usando la tinción de ADN DRAQ5 (Pierce). Las células se incuban con la tinción según las instrucciones del fabricante y se analizan en un citómetro de flujo, p. ej., un citómetro Attune (Life Technologies). Se cuantifica el porcentaje de células por encima de un umbral predefinido de contenido de material nuclear.

Ejemplo 55: Ensayo de tumorigenicidad *in vitro*

30 Para evaluar el potencial de replicación de las células, se puede realizar un ensayo de formación de colonias en agar blando. En resumen, se prepara una capa de agar de base preparando una solución de Agar al 0,5 % + RPMI 1x + FCS al 10 %, todos los componentes calentados a 40 °C, y añadiendo 1,5 ml de la solución a una placa de Petri de 35 mm. Se deja solidificar el agar durante 30 min a temperatura ambiente antes de su uso.

35 La capa superior de agarosa se prepara fundiendo agarosa al 0,7 % en un microondas y enfriando a 40 °C. Se calienta una solución de 2x RPMI + FCS al 20 % a 40 °C. Las células se cuentan y se preparan para su siembra en placas a 5000 células por placa a una densidad de 200 000 células por ml. Se añaden 0,1 ml de suspensión celular a tubos de 10 ml, seguido de 3 ml de la agarosa al 0,7 % caliente y 3 ml de la solución de RPMI/FCS caliente. La solución se mezcla suavemente agitando y se añade (1,5 ml) a cada una de las tres o cuatro placas de agar de base repetidas.

40 Las placas se incuban a 37 °C en una incubadora humidificada durante 10-30 días. Las células se alimentan 1-2 veces por semana con medio de cultivo celular, 0,75 ml/placa.

Para evaluar la formación de colonias, las placas se tiñen con 0,5 ml de violeta de cristal al 0,005 % durante >1 h. Las colonias se cuentan usando un microscopio de disección.

Ejemplo 56: Ensayo de tumorigenicidad *in vivo*

45 Se implantan células eritroides cultivadas diferenciadas terminalmente en diversos modelos animales para evaluar el potencial de tumorigenicidad. Se recogen varios tejidos de los diversos modelos y se analizan con ensayos histológicos, inmunoquímicos y fluorescentes para cuantificar la tumorigenicidad.

50 Los animales reciben inyecciones intraperitoneales diarias de CsA (10 mg/kg, Sandimmune, Novartis Pharma, Núremberg) comenzando dos días antes del injerto. Para el agotamiento de linfocitos NK, algunas ratas reciben, además de las inyecciones intraperitoneales de CsA del anticuerpo monoclonal (mAb), anti-NKR-PIA (clon 10/78, IgG₁ de ratón, BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) o el control de isotipo respectivo (clon PPV-06, IgG₁ de ratón, Exbio, Praga, República Checa). El mAb anti-NKR-PIA (clon 10/78) se dirige contra el mismo epítipo que el mAb (clon 3.2.3). Se administra un mg de los anticuerpos respectivos un día antes de la inyección de células eritroides seguido de 0,5 mg el día 4 después del trasplante de células.

Se toman muestras de sangre antes de iniciar estos experimentos, el día 0 y 4 días después del trasplante de células

eritroides y en la autopsia (día 92) para determinar la proporción de linfocitos NK en la sangre mediante citometría de flujo. Para el análisis del crecimiento tumoral subcutáneo, se inyectan células eritroides en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en el costado de los animales. El crecimiento tumoral se supervisa cada dos días mediante palpación y el tamaño se registra usando calibradores lineales. Los animales se sacrifican antes del día 100 cuando se alcanza un volumen tumoral de 1 cm³ en ratones y 5 cm³ en ratas, cuando se produce una pérdida de peso de más del 10 % o cuando se observan signos de comportamiento de dolor o padecimiento. Se realizan autopsias de todos los animales.

El tejido murino cerca del sitio de inyección se congela inmediatamente en nitrógeno líquido o se coloca en formalina al 4 % tamponada con fosfato durante 16 h y después se incluye en parafina. Los bazo y los ganglios linfáticos se extraen para análisis inmunológicos posteriores. Se realiza el trasplante de células eritroides al cuerpo estriado de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA. Estos animales se sacrifican 6 semanas después del trasplante.

El tejido animal se analiza mediante citometría de flujo. Se añaden anticuerpos adecuados fluorescentes y conjugados con PE contra biomarcadores establecidos de células cancerosas de CD133, CD3, CD, CD16, CD19, CD20, CD56, CD44, CD24 y CD133 a las muestras de tejidos extirpados y se analizan para cuantificar el potencial tumorigénico.

15 **Ejemplo 57: Deformabilidad por EKTA**

Se evalúan las características de deformabilidad de células eritroides cultivadas como se describe en el presente documento en relación con las muestras de eritrocitos naturales mediante ektacitometría.

El ektacitómetro consiste en un viscosímetro de tipo Couette combinado con un láser de helio-neón usado para producir una imagen de difracción de glóbulos rojos suspendidos en un líquido viscoso entre los dos cilindros. Cuando el viscosímetro gira, los glóbulos rojos normales se alargan en el campo de cizallamiento, provocando que la imagen de difracción se vuelva elíptica. La elipticidad de la imagen se mide cuantificando la intensidad de la luz a lo largo de los ejes mayor (A) y menor (B) del patrón de difracción y expresando esta como una relación $(A - B)/(A + B)$, el índice de deformabilidad (ID) o índice de alargamiento (IA). La viscosidad del medio se elige para que sea mayor que la viscosidad interna de las células eritroides más densas. Una solución de 31 g/litro de polivinilpirrolidona (PVP), pm = 360 000, en un tampón fosfato de 0,04 M compuesto de K₂HPO₄ y KH₂P0₄ en agua destilada produce una viscosidad de 0,20 poise a 25 °C y 12 poise a 37 °C.

La osmolaridad se ajusta con NaCl al nivel deseado y se mide en un osmómetro de punto de congelación de Roebing. El pH final se varía usando pequeñas adiciones de soluciones 1 M de NaOH y HCl y se mide en un analizador de gases en sangre Technicon BG 11. Se añade azida de sodio como conservante a las soluciones de reserva para obtener 0,4 g/l.

El ektacitómetro recopila tres métricas primarias de las muestras de células eritroides y las compara con los eritrocitos nativos; mínimo de osmolalidad (O_{mm}), índice de deformabilidad ($DI_{máx}$) y la osmolalidad a la que la ID alcanza la mitad de su valor máximo (O_{hip}).

O_{min} está relacionado con la relación entre el área de la superficie y el volumen de la célula y se ha descubierto que es igual al punto de hemólisis del 50 % en la prueba de fragilidad osmótica clásica.

$DI_{máx}$ es el valor máximo del índice de deformabilidad, que normalmente se alcanza a 290 mosmol (el valor de osmolalidad fisiológica). Esto indica la deformabilidad máxima de la célula bajo tensión de cizallamiento y está relacionado con varios factores, tales como el área superficial, volumen, viscosidad interna y propiedades mecánicas de la membrana celular.

O_{hip} es la osmolalidad a la que la ID alcanza la mitad de su valor máximo. Esto da una indicación de la posición de la parte hipertónica de la curva, que está relacionada con la viscosidad interna de la célula, así como con las propiedades mecánicas de la membrana, tales como la forma en que se doblará bajo presión (rigidez).

Los parámetros obtenidos para las células eritroides cultivadas se comparan con los mismos valores para las células eritroides primarias.

45 **Ejemplo 58: Deformabilidad por LORCA**

La deformabilidad de las poblaciones de cRBC purificados se mide mediante una técnica de difracción por láser (LORCA, analizador óptico de células rotacional por láser, R&R Mechanotrics). En resumen, una suspensión de células muy diluida se cizalla en un sistema Couette con un hueco de 0,3 mm entre 2 cilindros, uno de los cuales puede girar para inducir tensiones de cizallamiento. Se pasa un rayo láser a través de la suspensión y se mide el patrón de difracción a 37 °C. Con una tensión de cizallamiento baja, las células son discos circulares, mientras que con tensión de cizallamiento alta, las células se vuelven elípticas. La deformabilidad de la célula se expresa mediante el índice de alargamiento (IA), que depende de la elipticidad de las células que se deforman. Se diluyen alícuotas que contienen 12,5 µl de sedimentos de eritrocitos sedimentados en 5 ml de solución de polivinilpirrolidona (peso molecular 360 000). Los valores de IA a 30 Pa (denominados $El_{máx}$) y 3 Pa se seleccionan como valores representativos de la deformabilidad para facilitar la comparación entre muestras a diversas tensiones de cizallamiento.

Ejemplo 59: Evaluación de la oclusión vascular - vasculatura de rata *ex vivo*

El potencial de oclusión vascular de las células eritroides se puede evaluar con vasculatura de rata aislada perfundida artificialmente usando procedimientos conocidos en la técnica, véase, p. ej., Kaul y col., 1983, J Clin Invest 72: 22. En resumen, en ratas anestesiadas (pentobarbital sódico 30 mg/kg) de la cepa Wistar, 120-150 g, la arteria y la vena ileocólicas derechas se canulan con un tubo de silastic heparinizado (100 ul/ml) en un sitio a 3 cm de distancia de la unión ileocólica. En perfusión en estado estacionario con Ringer que contiene albúmina de suero bovino al 1 %, el colon ascendente y el íleon terminal (3 cm cada uno) se cortan entre uniones. Una vez que se realizan uniones hemostáticas de todas las conexiones vasculares, se aísla el tejido. El mesoapéndice aislado se extiende suavemente sobre un bloque de Lucite ópticamente transparente en una platina de microscopio. Toda la preparación se cubre con una envoltura plástica de saran excepto las salidas de las cánulas y el objetivo del microscopio.

La presión de perfusión arterial de control (Ppa) y las presiones de flujo de salida venosa (Pv) se mantienen constantes a 80 y 3,8 mmHg, respectivamente, y se supervisan a través de transductores de presión Statham-Gould P-50 (Statham Instruments Inc, Oxnard CA). La velocidad del flujo de salida venoso (Fv) se supervisa usando un contador de gotas fotoeléctrico y se expresa en ml/min. Se deja un tiempo de 10-12 min para el equilibrio tisular y la estabilización de Fv. Solo se usan preparaciones que presentan una microvasculatura del mesoapéndice exenta de células sanguíneas del huésped y con un Fv estable de 4,6 +/- 0,5 (media +/- DT). Los experimentos se realizan a 37 °C.

Se aíslan células eritroides como se describe en el presente documento. Después de las mediciones de control de Ppa y Fv, las células eritroides (0,2 ml, Hct 30 %) se administran suavemente a través de un orificio de inyección a 15 cm de distancia del sitio de la canulación arterial y los cambios de Ppa y Fv se registran en el diagrama de bandas de un polígrafo Grass (Grass Instrument Co, Quincy MA). Las preparaciones tisulares se perfunden durante 10-15 minutos antes de la infusión de muestras con solución de Ringer para permitir la estabilización del tejido y limpiar la vasculatura de las células sanguíneas restantes del animal huésped. La obstrucción resultante después de la infusión de células puede eliminarse y el flujo puede restablecerse mediante la perfusión breve (2-3 min) de la vasculatura con solución de Ringer completamente oxigenada a alta presión (100 mmHg).

Al final de cada experimento, se pesa toda la preparación tisular (exenta de cánulas y contenido luminal). Las unidades de resistencia periférica (URP) se calculan y expresan como $URP = \Delta P/Q = \text{mmHg/ml}/(\text{min-g})$ donde ΔP (mmHg) es la diferencia de presión arteriovenosa y Q (ml/min-g) es la tasa de flujo de salida venoso por gramo de tejido.

En cada experimento, el tiempo de recuperación de presión-flujo (Tpf) se determina después de la infusión en embolada de las muestras. Tpf se define como el tiempo (segundos) necesario para que Ppa y Fv regresen a sus niveles de referencia después del suministro de una muestra dada y representa el tiempo de tránsito total a lo largo de la vasculatura del mesoapéndice. Los valores de los parámetros obtenidos para células eritroides cultivadas se comparan con los valores obtenidos para las células eritroides primarias.

Ejemplo 60: Evaluación de la oclusión vascular - cámara de flujo *in vitro*

Se conocen en la técnica procedimientos para evaluar la oclusión vascular de células eritroides usando cámaras de flujo de altura graduada *in vitro*, véase, p. ej., Zennadi y col., 2004, Blood 104 (12): 3774.

En resumen, se usan cámaras de flujo de altura graduada para cuantificar la adhesión de células eritroides a células endoteliales (CE). Los portaobjetos recubiertos con CE se lavan con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) con Ca^{2+} 1,26 mM, Mg^{2+} 0,9 mM (Gibco, Grand Island, NY) calentada previamente a 37 °C y después encajó en una cámara de flujo de altura variable. La cámara de flujo se monta en la platina de un microscopio de contraste de fase invertida (Diaphot; Nikon, Melville, NY) conectado a una termoplaca (Tokai Hit, Fujinomiya-shi, Japón) a 37 °C. Las células se observan usando una cámara de vídeo (RS Photometrics, Tucson, AZ) acoplada al microscopio y conectada a un ordenador Macintosh G4 (Apple, Cupertino, CA). Las células eritroides se cultivan como se describe en el presente documento y se marcan con el equipo conector de células fluorescentes rojas de colorante fluorescente PKH 26 (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se infunden células (3 ml) suspendidas a 0,2 % (vol/vol) en HBSS con Ca^{2+} , Mg^{2+} en la cámara de flujo y se permite que se adhieran al portaobjetos durante 15 minutos sin flujo. Antes de la exposición al flujo, se examinan un mínimo de 3 campos en cada una de 7 ubicaciones diferentes a lo largo de una línea orientada normal al flujo futuro para determinar el número total de células fluorescentes. Después se inicia el flujo de líquido (HBSS con Ca^{2+} , Mg^{2+}) usando una bomba de jeringa calibrada. Después de la exposición al flujo, los campos se examinan de nuevo y se cuenta el número de células adherentes. La fracción de células adherentes se presenta de la siguiente manera: Número de células conectadas después de la exposición al flujo/Células presentes por campo antes del flujo. La tensión de cizallamiento de la pared se calcula de la siguiente manera: $\tau_w = (6 \mu Q)/(wH [x]^2)$, en la que τ_w indica la tensión de cizallamiento de la pared (10^{-5} N/cm²); Q , caudal volumétrico (cm³/s); μ , viscosidad del medio; w , anchura del canal de flujo; y $H(x)$, altura de la cámara de flujo en función de la posición a lo largo del portaobjetos del microscopio.

Ejemplo 61: Evaluación de la oclusión vascular - microscopia intravital

Se conocen en la técnica procedimientos para evaluar la oclusión vascular de células eritroides usando microscopia intravital, véase, p. ej., Zennadi y col., 2007 Blood 110 (7): 2708.

En resumen, se realiza anestesia general de un animal de prueba mediante inyección intraperitoneal de 100 mg/kg de ketamina (Laboratorio Abbott, Chicago, IL) y 10 mg/kg de xilacina (Bayer, Shawnee Mission, KS). Una cámara de ventana con marco de titanio de doble cara se implanta quirúrgicamente en el pliegue cutáneo dorsal en condiciones estériles usando una campana de flujo laminar. La cirugía consiste en eliminar cuidadosamente las capas epidérmica y dérmica de un lado de un pliegue cutáneo dorsal, exponer los vasos sanguíneos del tejido subcutáneo adyacentes a los músculos estriados del pliegue cutáneo opuesto y después fijar los 2 lados de la cámara a la piel usando tornillos de acero inoxidable y suturas. Se coloca una ventana de vidrio en la cámara para cubrir el tejido expuesto y se fija con un anillo de retención. Posteriormente, los animales se mantienen entre 32 °C y 34 °C hasta que se realizaron estudios *in vivo* 3 días después de la cirugía.

Los animales anestesiados con cámaras de ventana se colocan en la platina de un microscopio Axoplan (Carl Zeiss, Thornwood, NY); la temperatura se mantiene a 37 °C usando una almohadilla térmica controlada termostáticamente. Todas las infusiones se realizan a través de la vena dorsal de la cola. Se cultivan células eritroides como se describe en el presente documento. A continuación, las células se marcan con colorantes Dil o DiO (Molecular Probes, Eugene, OR) colorantes según las instrucciones del fabricante. Se infunden células marcadas (300 µl; hematocrito [Hct] 0,50 [50 %] en PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺) y se observan la adhesión de los eritrocitos y la dinámica del flujo sanguíneo en vasos subdérmicos durante al menos 30 minutos usando objetivos LD Achroplan 20x/0,40 Korr y Fluor 5x/0,25. Los acontecimientos microcirculatorios y la adhesión celular se registran simultáneamente usando un monitor de vídeo a color Trinitron (PVM-1353 MD; Sony, Tokio, Japón) y videgrabadora JVC (BR-S3784; VCR King, Durham, NC) conectada a una cámara de vídeo digital C2400 (Hamamatsu Photonics KK, ciudad de Hamamatsu, Japón). Se examinan treinta segmentos de vénulas para cada conjunto de condiciones. Las arteriolas se distinguen de las vénulas basándose en (1) la observación del flujo divergente en oposición al flujo convergente; (2) apariencia birrefringente de las paredes de los vasos usando transiluminación, que es característica del músculo liso vascular arteriolar; y (3) trayectoria del vaso relativamente recta sin pruebas de tortuosidad.

La medición del flujo y la adhesión de los glóbulos rojos se realiza examinando cintas de vídeo producidas con un aumento de x20. La adherencia celular se cuantifica considerando las células adheridas a las paredes de los vasos e inmóviles durante 1 minuto. El porcentaje de la longitud de los vasos con diámetros de hasta 25 µm o más de 25 µm, ocupado por eritrocitos SS, se cuantifica de la siguiente manera: % de longitud venular ocupada por eritrocitos SS = (longitud de la pared vascular con células adherentes/longitud total de los segmentos vasculares analizados) × 100. Los cambios en el flujo de eritrocitos se calculan de la siguiente manera: flujo = número de eritrocitos humanos fluorescentes circulantes que cruzan un único punto marcado en vasos de menos de 50 µm de diámetro por minuto.

Ejemplo 62: Evaluación de la oclusión vascular - plaquetas

Los procedimientos para evaluar la oclusión vascular de las plaquetas usando células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) se pueden adaptar a partir de procedimientos similares para eritrocitos. En resumen, se añade un volumen de 2 ml de suspensión de 0,05 % de hematocrito a las HUVEC confluentes en una placa de Petri de cultivo tisular. El aparato de cono y placa se ensambla en 1 min después de la adición de plaquetas y se coloca en un microscopio de contraste de fases invertido Nikon Diaphot-TMD (Southern Micro Instruments, Atlanta, GA). El motor se pone en marcha para hacer girar el cono y la adherencia se supervisa continuamente a una tensión de cizallamiento de 0,1 o 1 × 10⁻⁵ N/cm² durante 30 min. La temperatura se mantiene constante a 37 °C mediante una incubadora de cortina de aire (Nicholson Precision Instruments, Inc., Bethesda, MD) que sopla sobre el aparato de adhesión. La adherencia plaquetaria se visualiza y registra cada 5 min al enfocarse en 8 campos de visión diferentes durante 20 s por campo para cada punto temporal. Todo el experimento se observa con un aumento total de 400x a través de una cámara de la serie CCD-72 (Dage-MTI, Inc., Michigan City, IN) y se graba en cinta de vídeo con una videgrabadora SVO 2000 (Sony Electronics, San José, CA). La adherencia se cuantifica fuera de línea al final de cada experimento contando las células adherentes individuales durante la reproducción manual de las imágenes de vídeo grabadas. Los recuentos celulares en 8 campos para cada punto temporal se promedian y normalizan con respecto a glóbulos rojos adherentes por milímetro cuadrado de endotelio.

Ejemplo 63: Evaluación de masa/volumen/densidad con resonador

Se usa un sistema de resonador de microcanal suspendido (RMS) para caracterizar la masa, el volumen y la densidad de una población de células eritroides diferenciadas terminalmente según Bryan y col., LabChip, 2014. Al comienzo de una medición de la densidad celular, el sistema se enjuaga en primer lugar con medio Percoll filtrado, que actúa como líquido de alta densidad. A continuación, la derivación de la muestra se llena con una muestra celular diluida y las alturas de los frascos en la entrada y salida de la muestra se ajustan para dirigir el flujo de líquido al primer RMS. La presión en la entrada de líquido de alta densidad se usa para establecer la densidad del líquido 2 y la presión en la salida de residuos controla la velocidad de flujo general en el dispositivo. Para minimizar la probabilidad de sesgo de tamaño debido a que las células más pesadas se depositan en el fondo del tubo o frasco de muestra, se introduce una muestra nueva a intervalos regulares enjuagando el canal de derivación de la muestra. Los datos se adquieren a través de LabVIEW y se procesan con MATLAB.

La concentración celular se supervisa usando un contador Coulter. Se realizan mediciones de células en cultivos que han crecido hasta 5 × 10⁵-1 × 10⁶ células/ml. El líquido de alta densidad introducido para la medición en el segundo RMS se formula como una solución de Percoll (Sigma) al 50 % (v/v), medio L15 en polvo al 1,38 % (p/v) (Sigma),

glucosa al 0,4 % (p/v), 100 UI de penicilina y estreptomina 100 µg ml⁻¹. El pH del medio se ajusta a 7,2. Este medio Percoll se almacena a 4 °C y se filtra inmediatamente antes de su uso en el RMS doble.

Ejemplo 64: Evaluación del contenido de fosfatidil serina mediante anexina V

5 Se cultivan células eritroides como se describe en el presente documento. Se lavan 50 µl de suspensión celular en una solución de Ringer que contiene CaCl₂ 5 mM y después se tiñe con Anexina-V-FITC (dilución 1:200; ImmunoTools, Friesoythe, Alemania) en esta solución a 37 °C durante 20 min bajo protección de la luz. Las células se lavan y tiñen mediante citometría de flujo como se describe en el presente documento y se mide la intensidad de la fluorescencia de la anexina-V con una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. La exposición relativa a la fosfatidil serina se evalúa a partir de la fluorescencia de la anexina-V.

10 Ejemplo 65: Evaluación del contenido de lípidos por cromatografía

Se extraen lípidos de CHD que expresan antígenos exógenos lavados mediante tres extracciones con metanol cloroformo 1:1 a temperatura ambiente en presencia del antioxidante BHT (Sigma Aldrich). Los extractos agrupados se lavan con KCl 0,05 M en el procedimiento de Folch, Lees y Sloane Stanley 1957, J Biol Chem 226: 497. En resumen, para la primera extracción, se añaden 15 ml de metanol que contiene BHT 0,05 mg/ml a los complejos lavados en un tubo de centrifuga y se dejan reposar durante 30 min con agitación ocasional para romper el sedimento. Después se añaden 15 ml de cloroformo y la mezcla se deja reposar durante 30 min con agitación ocasional para romper las acumulaciones. Los tubos se centrifugan durante 5 minutos a 1500 g y las fracciones de sobrenadante se decantan en embudos de separación equipados con llaves de paso de teflón. La segunda y tercera extracciones se realizan de manera similar con 15 ml de metanol-BHT añadido al resto seguido de 15 ml de cloroformo, excepto que los extractos reposan durante solo 10 minutos con agitación ocasional después de cada adición. Después de la centrifugación, las fracciones de sobrenadante se agrupan en un embudo de separación, después se añaden 48 ml de cloroformo y 28 ml de KCl 0,05 M y se mezclan. Se deja reposar la mezcla durante una noche en la oscuridad a 4 °C para la separación de fases. Después de recalentar a temperatura ambiente, se recoge la más baja de las dos fases transparentes y se evapora hasta su sequedad al vacío a 40 °C en un evaporador rotatorio al vacío. El lípido se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado de 10 ml con cloroformo y se almacena a -22 °C.

La concentración de colesterol libre en el extracto lipídico se determina de la siguiente manera. El extracto lipídico se somete a cromatografía sobre una capa de 0,5 mm de gel de sílice HR (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, N.Y.) en hexano-dietiléter-ácido acético glacial 80:20:1, la placa de TLC se tiñe rociándola con una solución de 2,7-diclorofluoresceína (véase a continuación), la mancha de colesterol libre se raspa en un tubo de centrifuga cónico y se extrae una vez con 2,0 ml y tres veces con 1,0 ml de cloroformo, el extracto se evapora hasta su sequedad al vacío a 40 °C en un evaporador rotatorio al vacío y el colesterol se estima mediante el procedimiento del cloruro férrico de Mann 1961 Clin Chem 7: 275 sin saponificación. Se toma un patrón de colesterol libre, preparado a partir de un material de uso como reactivo certificado comercial por aislamiento a través del derivado de dibromuro (véase, p. ej., Fieser J Amer Chem Soc 1953 75: 5421), mediante el procedimiento cromatográfico y se estima con cada conjunto de determinaciones. Los valores para colesterol libre se corrigen en cada determinación para la recuperación del patrón, que promedió 95 %. El TLC es necesario para eliminar el BHT, que de otra manera interfiere con el procedimiento del cloruro férrico al producir un producto marrón que absorbe a 560 nm.

La distribución de fosfolípidos se determina por triplicado mediante TLC de alícuotas del extracto lipídico total a 4 °C en gel de sílice HR, 0,5 mm de grosor, en cloroformo-metanol-ácido acético glacial-agua 25:15:4:2 al que se añade BHT a una concentración de 50 mg/100 ml para evitar la autooxidación durante la cromatografía; las placas de TLC se preparan con agua (placas "neutras"). El uso de una "técnica de punta en forma de cuña" para aplicar la muestra de lípidos en el origen de la placa (véase p. ej., Stahl 1965 Thin-Layer Chromatography, Academic Press Inc.) da lugar a excelentes separaciones de los fosfolípidos individuales. En particular, el procedimiento proporciona una separación completa entre fosfatidil etanolamina (PE), fosfatidil serina (PS), lecitina y esfingomiélna; una mancha individual que migra entre PS y lecitina se identifica como fosfatidil inositol (PI). Las manchas se hacen visibles a la luz UV al rociar con una solución de 2,7-diclorofluoresceína (33,3 mg/100 ml de NaOH acuoso 2 mM) y después raspar directamente en tubos Kramer-Gittleman, donde los fosfolípidos se digieren a 190 °C durante 60 min con 1,0 ml de ácido perclórico al 70 %. El resto del procedimiento se realiza como se ha descrito anteriormente, excepto que, después del desarrollo del color, se elimina el gel de sílice mediante centrifugación a 3000 g durante 5 min y se determina la absorbancia en la solución sobrenadante transparente. Se realizan correcciones con respecto a la absorbancia de las áreas correspondientes de los carriles en blanco.

Se realiza cromatografía de gas-líquido en muestras disueltas en hexano con un instrumento Barber-Colman, modelo 5000, equipado con columnas emparejadas de 243,84 cm de EGSS-X (un poliéster de succinato de etilenglicol combinado con una silicona) al 8 % en Gas-Chrom P, malla de 100-120 (Applied Science Laboratories Inc.) y detectores de ionización de llama doble. El caudal de nitrógeno es de 50 ml/min en la entrada. La temperatura de la columna se mantiene a 165 °C durante 10 min después de la inyección de la muestra, después se incrementó a 2 °C/min hasta 200 °C.

Ejemplo 66: Evaluación de la viscosidad de la membrana

La viscosidad de la membrana de una población de células se puede evaluar mediante un ensayo de fotoblanqueo por fluorescencia. Se recoge una muestra de 0,5 ml de células eritroides y se lava una vez en solución salina tamponada con HEPES (NaCl 132 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,0 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 20 mM, ajustado a pH 7,4). A continuación, el concentrado de células se lava una vez en NaCl 145 mM - NaHCO₃ 10 mM, pH 9,5 y se resuspende en el mismo tampón con DTAF 1 mg/ml (obtenido de Research Organics, Cleveland, Ohio). Las células se incuban en hielo durante 1 h, después se lavan dos veces en glicina 50 mM - NaCl 95 mM - NaHCO₃ 10 mM, pH 9,5, para eliminar cualquier colorante que no se haya unido covalentemente a la proteína. Por último, las células se lavan dos veces y se resuspenden a un hematocrito al -2 % en solución salina tamponada con HEPES con seroalbúmina bovina 1 mg/ml. Se aplica el mismo tratamiento para controlar los eritrocitos nativos.

La cámara de flujo se monta sobre la platina de un microscopio invertido Leitz Diavert (Rockleigh, NJ) equipado para microscopía de fluorescencia de luz incidente. El espejo dicróico y los filtros de excitación/emisión son la combinación convencional para su uso con colorantes de fluoresceína (designación Leitz 12), con una longitud de onda de excitación en el intervalo de 450-490 nm. El objetivo es un tipo de inmersión en aceite con un aumento 100x y una apertura numérica de 1,25. Una lámpara de arco de mercurio de alta presión de 100 vatios (Osram, Múnich) con una fuente de alimentación y una carcasa adecuadas (Oriol, Stamford, CT) sirve como fuente de excitación de fluorescencia.

Un obturador electrónico controlado por ordenador (Vincent Associates, Rochester, NY) limita la duración de la exposición y está sincronizado con un sistema electrónico de recuento de fotones para medir la intensidad de la fluorescencia. El diafragma de campo del iluminador de luz incidente se usa para limitar la excitación a un área circular de 20-40 μ m de diámetro. A intervalos regulares, un pulso de salida del ordenador provoca que el obturador se abra durante una duración habitual de 20 ms. La luz de la breve imagen fluorescente se divide con una serie de prismas de modo que la mitad de la luz se dirija a una cámara de vídeo SIT de bajo nivel de luz (Modelo 66-SIT, Dage-MTI, Michigan City, IN) y la otra mitad a un tubo fotomultiplicador (Modelo 8850, RCA, Harrison, NJ) contenido en una carcasa a temperatura ambiente. Durante el tiempo que el obturador electrónico está abierto, se activa un procesador de imágenes de vídeo (Modelo 794, Hughes Aircraft, Carlsbad, CA) para adquirir la imagen fluorescente, proporcionando una instantánea de vídeo que se puede supervisar para garantizar que el sujeto permanezca enfocado y que ningún objeto extraño se interponga en el campo de visión. Las distancias en la pantalla de vídeo se miden con un calibrador de vídeo y se calibran en comparación con la imagen de vídeo de un micrómetro de platina. También durante el tiempo que el obturador está abierto, la señal del fotomultiplicador se procesa con la técnica de recuento de fotones. Un amplificador/discriminador (modelo AD6, Pacific Instruments, Concord, CA) genera un pulso lógico digital para cada pulso de señal por encima de una magnitud dada, y esos pulsos digitales se cuentan en un contador sincronizado de 100 MHz (Modelo 770, EG&G Ortec, Oak Ridge, TN). El microordenador controla la sincronización, el restablecimiento y el registro del recuento de fotones.

Un experimento habitual consiste en una serie de mediciones preliminares de la fluorescencia realizadas durante pulsos breves (20 ms) de luz de excitación, seguido de un periodo prolongado de iluminación (normalmente 30 s) durante el que las células de la muestra se blanquean, seguido de otra serie de exposiciones breves, cada 15-30 s, hasta que la fluorescencia parezca haber completado su recuperación.

El tiempo de recuperación y otros valores de parámetros obtenidos para células eritroides cultivadas se comparan con los mismos valores obtenidos para células eritroides primarias.

40 **Ejemplo 67: Evaluación del volumen corpuscular medio con el analizador de hematología Advia**

El volumen globular medio (VGM) de las células eritroides cultivadas se mide usando impedancia eléctrica en un analizador de hematología Advia 120 (Siemens Healthcare). Los resultados se comparan con los de los eritrocitos humanos naturales.

Ejemplo 68: Prueba de patógenos de células eritroides cultivadas

Se usa RT-PCR para cuantificar la presencia de virus adventicios en poblaciones de células eritroides cultivadas y confirmar la ausencia de contaminación (Ensayo n.º 003000.BSV, BioReliance). Se realizan pruebas de esterilidad del volumen final y sin procesar, frascos finales, células antes del banco y bancos de células y virus inoculando directamente la población de eritroides en 2 tipos diferentes de medios que apoyan el crecimiento de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, respectivamente. Las muestras se incuban durante 14 días seguido de pruebas de contaminantes microbianos según el protocolo de pruebas de esterilidad de BioReliance USP 71.

Ejemplo 69: Evaluación de la fragilidad osmótica

La fragilidad osmótica se evalúa para medir la resistencia de las células eritroides a la lisis cuando se exponen a soluciones hipotónicas. Se prepararon soluciones de NaCl en agua a concentraciones que abarcaban entre el 0 % y el 1 %. Las células se incubaron en cada una de las soluciones salinas durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron para sedimentar las células intactas. Se analizó el contenido de hemoglobina del sobrenadante por absorción de luz a 540 nm usando un espectrofotómetro. Se calcula el punto en el que se produce el 50 % de la hemólisis y se compara con el valor obtenido para los eritrocitos primarios.

Ejemplo 70: Evaluación de la formación de rosetas/inmunogenicidad

5 La prueba de antiglobulina directa, también conocida como prueba de Coombs, evalúa la aglutinación o restablecimiento de las células eritroides provocados por la unión de anticuerpos policlonales del suero a antígenos de superficie en la célula. Puede realizarse con suero humano agrupado para evaluación de la inmunogenicidad alogénica general o con suero del receptor previsto para predicción de la inmunogenicidad específica.

10 En resumen, se añaden 1-2 gotas de células almacenadas en un tubo de EDTA a un tubo de reacción. Se lava este tubo tres veces con solución salina isotónica. Después del tercer lavado, se prepara una suspensión al 3 % de las células lavadas. Se marcan 2 tubos A y B. Se añade una gota de la suspensión lavada al 3 % a cada tubo. Se lavan estos tubos una vez más. Al decantar, se colocan los tubos de modo que el botón celular esté en la parte superior. Esto evitará que se pierdan demasiadas células en el procedimiento de lavado. Se escurre bien y se seca con una toallita biológica. Se añade inmediatamente una gota de suero de prueba humano a ambos tubos y se agita para mezclar. Se deja que el tubo B se incube a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifuga el tubo A durante el tiempo calibrado para la centrifugación de Coombs en la serófuga. Inmediatamente se resuspende suavemente y se examina la aglutinación con el visor de aglutinación iluminado (Beckton Dickinson). Si el tubo A es positivo, no es necesario leer el tubo B ni examinar el tubo A microscópicamente. Si el tubo A es negativo según el visor de aglutinación iluminado, se examina la aglutinación bajo el microscopio. Si el tubo A fuera negativo a través de la lectura microscópica, se centrifuga el tubo B después de su periodo de incubación y se repiten las etapas 2-4 con la muestra del tubo B. Si el tubo B también es negativo, se añade una gota de células de control de Coombs recubiertas con IgG (células de comprobación) al tubo y se centrifuga. Se examina la aglutinación. Debería haber aglutinación en esta etapa, de lo contrario la prueba no es válida.

Si no hay aglutinación en ninguna de las etapas antes de la adición de las células de comprobación (ccc), la prueba se interpreta como negativa. Si se observa aglutinación en cualquiera de las etapas antes de la adición de las células de comprobación, la prueba se interpreta como positiva.

Ejemplo 71: Evaluación de la capacidad de unión al oxígeno

25 Se determinan las curvas de equilibrio de unión al oxígeno a 37 °C en un tonómetro conectado a una cubeta de 1 cm de longitud de trayectoria. Se realizan mediciones espectrales con un espectrofotómetro (Cary 50; Variant Inc) y la temperatura se controla con un módulo Peltier. Se realizan análisis en tampón bis-Tris 50 mM (pH 7,2) que contiene NaCl 140 mM y glucosa 2 mM. Después de una desoxigenación completa en nitrógeno, las suspensiones de glóbulos rojos se equilibran a diferentes presiones parciales de oxígeno mediante la inyección de volúmenes conocidos de oxígeno puro en el tonómetro a través de un tapón de caucho con una jeringa Hamilton. La saturación fraccionada se estima mediante la simulación de los espectros de absorción en las regiones visible y de Soret como una combinación lineal de los espectros completamente desoxigenado y oxigenado de la suspensión de RBC mediante regresión de mínimos cuadrados.

Ejemplo 72: Evaluación del estado metabólico de las células

35 La población de células eritroides puede verificarse como metabólicamente activa usando diversos ensayos diferentes basados en enzimas para cuantificar productos finales metabólicos importantes. La glucólisis activa es una ruta metabólica crucial para evaluar y puede medirse con el siguiente ensayo (equipo de ensayo de glucólisis basado en células, Cayman Chemical, artículo 600450).

40 Se colocan alícuotas de 450 ul de tampón de ensayo en un tubo de prueba, seguido de 50 ul del patrón de ácido L-láctico y se mezcla exhaustivamente. Se construye una curva de valoración usando el patrón de concentración de ácido láctico, comenzando con una dilución de 1 mM.

45 Se añaden células a una placa de 96 pocillos y se centrifugan a 1000 RPM durante 5 minutos. Se transfieren 100 ul de los patrones a una placa de 96 pocillos separada. A continuación, se añaden 90 ul de tampón de ensayo a cada pocillo. A continuación, se transfieren 10 ul de sobrenadante de cada pocillo celular a los pocillos nuevos correspondientes. Se añaden 100 ul de solución de reacción a cada pocillo usando una pipeta de repetición. A continuación, las placas se incuban en un agitador orbital durante 30 minutos a TA. La absorbancia se lee a 490 nm con un lector de placas. Los resultados se comparan con células naturales para identificar cualquier diferencia metabólica.

Ejemplo 73: Evaluación de la agregación plaquetaria

50 Se puede supervisar la propensión a la agregación de plaquetas cultivadas o de origen primario. Las plaquetas se someten a análisis de remolinos agitándolas frente a una fuente de luz, expresando los resultados como presencia o ausencia de birrefringencia. Las unidades de concentrados de plaquetas producidas con un volumen de 50-70 ml se dejan reposar durante una hora y se colocan en un agitador lineal (C-Mar®) a 70 rpm a una temperatura controlada de 22 ± 2 °C ($71,6 \pm 3,6$ °F).

55 Las pruebas de concentrados de plaquetas (recuento plaquetario, agregación plaquetaria y pH) se llevan a cabo los días 1, 3 y 5 después del procesamiento; se realiza un recuento de leucocitos solo el día 1 y el control microbiológico

se realiza solo el día 5 de almacenamiento. Para obtener alícuotas de muestras de concentrados de plaquetas, se usa una conexión estéril (Haemonetics®) que garantiza la integridad del medio ambiente. Se logra agregación plaquetaria usando la técnica de agregometría turbidimétrica con un Chronolog de doble canal (Crono-Log Corporation®) en las cuatro horas posteriores a la extracción de sangre. Para esto, las células se obtienen inicialmente mediante centrifugación ligera a 1000 rpm durante cinco minutos y después se centrifugan a 3000 rpm durante quince minutos (Eppendorf®). Las muestras se someten a un recuento de plaquetas en un contador automático (Human Count®).

Después de ajustar la concentración de plaquetas, se evalúa la agregación usando diferentes concentraciones de agonistas inductores: colágeno 2,0 µg/ml y ADP 7,0 µg/ml (Crono-Log Corporation®). Para cada prueba, se usan 400 µl de PRP y 400 µl de PPP, cada uno en una cubeta diferente después de esperar la agregación espontánea. La curva de agregación se observa después de cinco minutos de estimulación induciendo agonistas y, poco después, se mide la agregación y se expresa como un porcentaje según las curvas formadas durante las pruebas. El resultado de la prueba se expresa habitualmente como un porcentaje de agregación por la cantidad de luz transmitida a través de la solución de prueba; la agregación se clasifica como normal, baja o alta.

Ejemplo 74: Procedimiento de cultivo autólogo

El cultivo de células eritroides usando células progenitoras CD34+ de origen autólogo se realiza para optimizar la inmunocompatibilidad celular de los pacientes. Las células CD34+ de la médula ósea se movilizan hacia la periferia en un paciente usando GM-CSF como se describe en el presente documento. Se recogen y cultivan entre 10^6 y 10^8 células CD34+ usando el protocolo de 22 días mencionado anteriormente con medios definidos. Durante el día 4, las células se transfectan con un vector lentivírico que contiene un gen que codifica la expresión de un agente terapéutico. Tras completarse el protocolo de cultivo, las células se purifican y evalúan a través de varias métricas de control de calidad, incluyendo las propiedades físicas que se correlacionan con la viabilidad de la circulación, la inmunogenicidad, el potencial replicativo, la pureza y la dosis terapéutica. A continuación, las células se almacenan en una solución estabilizadora adecuada y se formulan en una jeringa o un vehículo de suministro adecuado. A continuación, las células se infunden en el mismo paciente que donó las células CD34+ iniciales.

Ejemplo 75: Procedimiento de carga autólogo

Para la preparación de células eritroides terapéuticas cargadas con un antígeno exógeno adecuado, se pueden usar eritrocitos de origen autólogo para optimizar la inmunocompatibilidad celular de los pacientes. Se extrae sangre del paciente y se centrifuga a 5000 g durante 20 minutos. La capa leucocitaria se elimina y los glóbulos rojos restantes se resuspenden en tampón anticoagulante a una densidad de 10^8 células/ml, lo que proporciona un total de 10^{10} células. En las células se carga un antígeno exógeno terapéutico de interés mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente. Tras completarse el protocolo de carga, las células se purifican y evalúan a través de varias métricas de control de calidad, incluyendo las propiedades físicas que se correlacionan con la viabilidad de la circulación, la inmunogenicidad, el potencial replicativo, la pureza y la dosis terapéutica. A continuación, las células se almacenan en una solución estabilizadora adecuada y se formulan en una jeringa o un vehículo de suministro adecuado. Las células se infunden en el mismo paciente que donó los eritrocitos iniciales.

Ejemplo 76: Procedimiento de cultivo alogénico

Para crear un producto terapéutico universal, graduable, las células eritroides se pueden cultivar a partir de una fuente alogénica. El cultivo de células eritroides usando células progenitoras CD34+ de origen alogénico se realiza para optimizar el procedimiento y cultivar un volumen de producto terapéutico capaz de tratar pacientes a escala. Se determinan los grupos sanguíneos de los donantes con respecto a los principales antígenos sanguíneos, incluyendo A, B, Rh para identificar donantes universales (p. ej., 0 Rh- o Bombay Rh-). Las células CD34+ de la médula ósea se movilizan hacia la periferia en un donante adecuado usando GM-CSF como se describe en el presente documento. Se recogen y cultivan entre 10^6 y 10^8 células CD34+ usando el protocolo de 22 días mencionado anteriormente con medios definidos. Durante el día 4, las células se transfectan con un vector lentivírico que contiene un gen que codifica la expresión de un agente terapéutico. Tras completarse el protocolo de cultivo, las células se purifican y evalúan a través de varias métricas de control de calidad, incluyendo las propiedades físicas que se correlacionan con la viabilidad de la circulación, la inmunogenicidad, el potencial replicativo, la pureza y la dosis terapéutica. A continuación, las células se almacenan en una solución estabilizadora adecuada y se formulan en una jeringa o un vehículo de suministro adecuado. A continuación, las células se infunden en los pacientes independientemente de sus grupos sanguíneos principales.

Ejemplo 77: Procedimiento de carga alogénico

El cultivo de células eritroides usando células progenitoras CD34+ de origen alogénico se realiza para optimizar el procedimiento para preparar mayores volúmenes de células terapéuticas capaces de tratar pacientes a escala. Se determinan los grupos sanguíneos de los donantes con respecto a los principales antígenos sanguíneos, incluyendo A, B, Rh para identificar donantes universales (p. ej., 0 Rh- o Bombay Rh-). En las células se carga un antígeno exógeno terapéutico de interés mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente. Tras completarse el protocolo de carga, las células se purifican y evalúan a través de varias métricas de control de calidad, incluyendo las propiedades físicas que se correlacionan con la viabilidad de la circulación, la inmunogenicidad, el potencial replicativo,

la pureza y la dosis terapéutica. A continuación, las células se almacenan en una solución estabilizadora adecuada y se formulan en una jeringa o un vehículo de suministro adecuado. A continuación, las células se infunden en los pacientes independientemente de sus grupos sanguíneos principales.

Ejemplo 78: Almacenamiento

5 1. Almacenamiento en solución de tampón refrigerada

Se conocen en la técnica protocolos convencionales para el almacenamiento de glóbulos rojos, véase, p. ej., Meryman y Hornblower 1986, Transfusion 26 (6): 500. El protocolo convencional para el almacenamiento de glóbulos rojos (durante hasta 42 días) es la recogida de sangre en soluciones anticoagulantes (citrato-dextrosa-fosfato). Se cultivan células eritroides como se describe en el presente documento. Los concentrados de glóbulos rojos se preparan mediante la eliminación de plasma por centrifugación. Las células se almacenan a 4 ± 2 °C en una solución de aditivo ligeramente hipertónica, SAGM (sodio, adenina, glucosa, manitol, 376 mOsm/l).

2. Almacenamiento en solución de tampón congelada

Se conocen en la técnica procedimientos de glicerolización, congelación y descongelación de células eritroides, véase, p. ej., Meryman y Hornblower 1977 Transfusion 17 (5): 4348. La sangre humana en citrato fosfato dextrosa se gliceroliza y se congela en los 4 días posteriores a la recogida. Para preparar eritrocitos glicerolizados, se centrifugan primero aproximadamente 10 ml de sangre total a 1400 g durante 10-15 min y se extrae el plasma. A continuación, las células concentradas resultantes se glicerolizan en dos etapas usando una solución acuosa de glicerol con la siguiente composición: 57,1 g de glicerol, 0,03 g de cloruro de potasio, 0,085 g de cloruro de magnesio hexahidratado, 0,08 g de fosfato disódico y 1,6 g de lactato de sodio en un volumen total de 100 ml, ajustado a un pH de 6,8.42 En la primera etapa, se añaden gota a gota 1,5 ml de esta solución de glicerol a las células concentradas con agitación suave durante un periodo de 3 min. A continuación, se permite que la mezcla se equilibre sin perturbaciones durante al menos 5 min. En la segunda etapa de glicerolización, se añaden gota a gota 5 ml de la solución de glicerol mientras se agita suavemente la mezcla durante un periodo de 3 min, produciendo una composición final de glicerol de ~40 % p/v. Todo el procedimiento de glicerolización se lleva a cabo a temperatura ambiente. A continuación, los eritrocitos glicerolizados se dividen en alícuotas de 0,6-1,1 ml en frascos criogénicos, se colocan en un recipiente de congelación NalgeneVR Cryo "Mr. Frosty" (Thermo Scientific, NC) y se almacenan en un congelador a -80 °C durante al menos 12 h y hasta 10 años. Los eritrocitos congelados se descongelan colocando el frasco criogénico en un baño de agua a 37 °C durante 1 min. Todas las muestras de sangre glicerolizadas se usan en experimentos de desglicerolización en las 2 h posteriores a la descongelación.

30 3. Formulación como jeringa

La población celular puede administrarse por vía intravenosa mediante una jeringa. Las células terapéuticas se diluyen a una densidad de 10^7 células/ml usando tampón salino convencional a 37 °C, de modo que se suministran 100 ml de volumen, o 10^9 células. La solución celular se carga en una jeringa de 150 cm³, aguja de calibre 20 y se inyecta en el paciente a través de la vena basilíca a 5 cm³/min. Durante la inyección, se controlan los signos vitales del paciente para detectar cualquier reacción inmunogénica o de coagulación.

35 4. Formulación como bolsa

La población celular puede administrarse por vía intravenosa mediante una jeringa conectada a una bolsa y una cámara de goteo (es decir, un goteo intravenoso). Las células terapéuticas se diluyen a una densidad de 10^7 células/ml usando tampón salino convencional a 37 °C, de modo que se suministran 100 ml de volumen, o 10^9 células. La solución celular se carga en una bolsa de plástico de 1 l, se conecta a un catéter y se deja drenar por gravedad al paciente a través de la vena basilíca. Durante la infusión, se controlan los signos vitales del paciente para detectar cualquier reacción inmunogénica o de coagulación.

Ejemplo 79: Tratamiento de enfermedades

1. Hemofilia

Se diagnostica a un paciente que padece hemofilia A. Se prepara una composición de células hematopoyéticas desnucleadas que expresan FVIII exógeno como se describe en el presente documento. Se administran 10^9 de las células por vía intravenosa al paciente. La tasa de coagulación se evalúa con un ensayo de tiempo de coagulación *in vitro* convencional conocido en la técnica. Se detectan anticuerpos circulantes contra el FVIII en suero como se describe en el presente documento. Se evalúan los niveles de anticuerpos circulantes para rastrear la eficacia de la inducción de tolerancia inmunitaria. Si la actividad de la cascada de coagulación es insuficiente para garantizar una coagulación saludable, se administran FVIII recombinante o aislado simultáneamente por vía intravenosa para reducir los síntomas de la hemofilia A.

2. Síndrome urémico hemolítico atípico

Se diagnostica a un paciente que padece síndrome urémico hemolítico atípico (SHUa). Se prepara una composición

de células hematopoyéticas desnucleadas que expresan CFH exógeno como se describe en el presente documento. Se administran 10^9 de las células por vía intravenosa al paciente. La tasa de hemólisis sintomática se evalúa con un ensayo de hemólisis urinaria convencional conocido en la técnica. Se detectan anticuerpos circulantes contra el CFH en suero como se describe en el presente documento. Se evalúan los niveles de anticuerpos circulantes para rastrear la eficacia de la inducción de tolerancia inmunitaria. Se administra el tratamiento al paciente hasta que se observa que los síntomas de la enfermedad mejoran usando los ensayos descritos en el presente documento.

3. Esclerosis múltiple

Un individuo con esclerosis múltiple (EM) recibe una única infusión de 1×10^9 antígeno que expresa células hematopoyéticas desnucleadas que expresan el polipéptido antigénico, la proteína básica de mielina (PBM), producido y formulado como se describe en el presente documento. El día de la administración del fármaco del estudio, se supervisa al paciente en una unidad de hospitalización de fase 1 durante 24 horas. Se realiza la medición del resultado primario el mes 3 y se realiza un seguimiento de seguridad adicional hasta el mes 6 con exámenes clínicos, de IRM y físicos generales consecutivos, así como análisis clínicos y de laboratorio para evaluar acontecimientos adversos y supervisar la actividad de la enfermedad EM. El procedimiento se repite hasta que se induce la tolerancia de modo que los síntomas de la EM se alivien en el individuo. Véase, por ejemplo, Andreas Lutterotti y col., Sci Transl Med 5, 188ra75 (2013).

La frecuencia de diferentes subconjuntos de células se analiza en sangre completa (tubos con EDTA) mediante citometría de flujo con los siguientes paneles de anticuerpos: para subconjuntos de células inmunitarias (granulocitos, eosinófilos, monocitos y linfocitos B, T, NK y T NK)-anti-CD45 (PE-Cy7, eBioscience), anti-CD16, (APC-Cy7, BioLegend), anti-CD19 [isotiocianato de fluoresceína (FITC), BD], anti-CD14 (V450, BD), anti-CD3 [proteína clorofila de peridinina (PerCP), BD] y anti-CD56 [ficoeritrina (PE), eBioscience]; para subconjuntos de linfocitos T, incluyendo CD4+, Treg FoxP3+, CD8+CD57+ILT2+ reguladores y linfocitos T proinflamatorios CD8+CD161alto anti-CD3 (PE-Cy7, eBioscience), anti-CD4 (APC, eBioscience), anti-CD8 [Pacific Blue (PB), Dako-Biozol], anti-FoxP3 (PE, Miltenyi), anti-CD25 (APC, eBioscience), anti-CD57 (FITC, BD), anti-I LT2 (PE, Beckman) y anti-CD161 (APC, Miltenyi). Los controles de isotipo correspondientes se incluyen en todas las tinciones. Las células se analizan con un citómetro de flujo LSR-II (BD) y el software FACSDiva (BD).

Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (PAA) y se evalúa el fenotipo funcional de linfocitos T mediante tinción con citocinas intracelulares de la siguiente manera: Se incuban 5×10^5 PBMC recién aisladas durante una noche en 200 ml de X-VIVO 15 (Lonza) en un tubo FACS estéril. El día siguiente, las células se estimulan con 12-miristato 13-acetato de forbol (50 ng/ml, Sigma) e ionomicina (1 mg/ml, Sigma) en presencia de brefeldina A (10 mg/ml, eBioscience) durante 5 horas. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato, las células se tiñen con el equipo LiveDead (AmCyan, Invitrogen), se fijan, se permeabilizan y se tiñen con diferentes anticuerpos: anti-IL-17 (Alexa Fluor 647; eBioscience), anti-IL-4 (PE-Cy7, BioLegend), anti-IFN-g (FITC, BioLegend), anti-IL-10 (PE; BioLegend), anti-CD3 (PE, DakoCytomation), anti-CD4 (PB, DakoCytomation) y anti-CD8 (PB, BioLegend) o con los controles de isotipo correspondientes.

Las respuestas de linfocitos T específicas de antígeno hacia el péptido de mielina usado en el estudio se miden en PBMC recién aisladas antes del procedimiento de tolerización y después de 3 meses. Las respuestas de linfocitos T específicas de antígeno se analizan mediante ensayos de proliferación con incorporación de timidina. En resumen, se siembran PBMC aisladas en placas de 96 pocillos a $1,5 \times 10^5$ PBMC por pocillo en medio X-VIVO 15 (Lonza) con 1 mM de péptido. Se siembran cuarenta y ocho pocillos por antígeno y solo seis pocillos con medio como control negativo en cada placa. Se usa TTx (5 mg/ml) (Novartis Behring) como control positivo. El día 7, las placas se incuban durante 15 horas con 1 mCi de $[3H]$ timidina (Hartmann Analytic). Las placas pulsadas con $[3H]$ timidina se analizan con un contador b de centelleo (Wallac 1450, PerkinElmer). Se miden los recuentos de centelleo (CPM) de cada pocillo. Los pocillos que muestran un CPM más alto que la media +3 DT de los pocillos sin estimular se consideran positivos.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la materia a la que pertenece la presente divulgación.

TABLAS A-J

Tabla A: Células circulantes

| | |
|---|--|
| Células madre embrionarias (CME) | Células madre pluripotentes inducidas (iPSC) |
| Célula madre de sangre del cordón umbilical (CM-SC) | Célula madre mesenquimatosas |
| Células CD34+ | Normoblastos policromáticos |
| Células madre hematopoyéticas (CMH) | Normoblastos ortocromáticos |

(continuación)

| | |
|--|------------------------------|
| Unidad formadora de colonias del bazo (UFC-B) | Proeritroblasto |
| Células progenitoras mieloides comunes (PMC) capaces de formar un granulocito, eritrocito, monocito o megacariocito (UFC-GEMM) | Eritrocito policromatofílico |
| Células formadoras de colonias de blastocitos | Normoblasto |
| Unidad formadora de brote eritroide (UFB-E) | Plaquetas |
| Célula progenitora eritroide-megacariocítica (PEM) | Leucocitos |
| Unidad formadora de colonias eritroide (UFC-E) | Células linfoides |
| Reticulocitos | Linfocitos T |
| Eritrocitos | Linfocitos B |

Tabla A1: Células eritroides

| | |
|--|--|
| Células madre embrionarias (CME) | Células madre pluripotentes inducidas (iPSC) |
| Célula madre de sangre del cordón umbilical (CM-SC) | Normoblastos policromáticos |
| Células CD34+ | Normoblastos ortocromáticos |
| Células madre hematopoyéticas (CMH) | Proeritroblasto |
| Unidad formadora de colonias del bazo (UFC-B) | Eritrocito policromatofílico |
| Células progenitoras mieloides comunes (PMC) capaces de formar un granulocito, eritrocito, monocito o megacariocito (UFC-GEMM) | Normoblasto |
| Células formadoras de colonias de blastocitos | |
| Unidad formadora de brote eritroide (UFB-E) | |
| Célula progenitora eritroide-megacariocítica (PEM) | |
| Unidad formadora de colonias eritroide (UFC-E) | |
| Reticulocitos | |
| Eritrocitos | |

Tabla B: Proteínas circulantes asociadas a las células

| | | | | | |
|-------|------|-------|------|-------|--------|
| CD1 | CD23 | CD46 | CD72 | CD120 | CD195 |
| CD2 | CD24 | CD47 | CD73 | CD122 | CD197 |
| CD3 | CD25 | CD48 | CD74 | CD127 | CD199 |
| CD4 | CD26 | CD49a | CD80 | CD132 | CD209 |
| CD5 | CD27 | CD49b | CD81 | CD133 | CD202a |
| CD6 | CD28 | CD49c | CD82 | CD134 | CD220 |
| CD7 | CD29 | CD49d | CD83 | CD135 | CD221 |
| CD8 | CD30 | CD49e | CD86 | CD138 | CD235a |
| CD9 | CD31 | CD49f | CD87 | CD141 | CD271 |
| CD10 | CD32 | CD53 | CD88 | CD142 | CD279 |
| CD11a | CD33 | CD54 | CD89 | CD143 | CD303 |
| CD11b | CD34 | CD55 | CD90 | CD144 | CD304 |
| CD11c | CD35 | CD56 | CD91 | CD147 | CD309 |

(continuación)

| | | | | | |
|-------|------|-------|--------|-------|-------|
| CD12w | CD36 | CD57 | CD95 | CD151 | CD326 |
| CD13 | CD37 | CD58 | CD96 | CD152 | TLR 1 |
| CD14 | CD38 | CD59 | CD100 | CD154 | TLR 2 |
| CD15 | CD39 | CD61 | CD103 | CD156 | TLR 4 |
| CD16 | CD40 | CD62E | CD105 | CD158 | TLR 5 |
| CD17 | CD41 | CD62L | CD106 | CD163 | TLR 6 |
| CD18 | CD42 | CD62P | CD107 | CD165 | |
| CD19 | CD43 | CD63 | CD107a | CD166 | |
| CD20 | CD44 | CD68 | CD107b | CD168 | |
| CD21 | CD45 | CD69 | CD109 | CD184 | |
| CD22 | | CD71 | CD117 | CD186 | |

Tabla C: Proteínas asociadas a eritrocitos

| | | | |
|---|--|---|---|
| Nucleótido 2',3'-cíclico 3'-fosfodiesterasa | Creatina cinasa | Proteína hipotética XP_100510 | RAP1A o RAP1B |
| Acetilcolinesterasa | DC 38 | Proteína hipotética XP_100619 | RAP2B |
| Cadena alfa y beta de actina | Citocromo b duodenal | Proteína hipotética XP_100665 | Polipéptido antigénico del grupo sanguíneo D de Rh |
| Adenosina desaminasa | Proteína potenciadora | Proteína hipotética XP_100925 | Proteína de tipo III de categoría VI de Rhesus D |
| Subunidad alfa de aducina | Proteína asociada a la membrana de eritroblasto | Proteína hipotética XP_103707 | Similar al precursor de proteína de la matriz de placa adhesiva |
| Aldolasa A | Proteína de unión a elementos corriente arriba lejanos | Proteína hipotética XP_106269 | Similar a anquirina 1 |
| Isoforma 2 de anquirina 1 | Flotilina 1 | Región V-V de cadena pesada de Ig | Similar a flotilina 2 |
| Isoforma 4 de anquirina 1 | Flotilina 2 47 | Kell | Similar a la glucoforina A |
| Forma de corte y empalme 2 de anquirina 1 | Glucoproteína transportadora de glucosa | KIAA0340 | Similar al grupo sanguíneo luterano |
| Acuaporina 1 | Glutación transferasa | Proteína KIAA1741 | Similar a la proteína RAB-15 relacionada con RAS |
| Arginasa de tipo 1 | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa | Proteína Lyn B | Similar a la proteína RAL-A relacionada con RAS |
| Variante eritroide de arginasa de tipo 1 | Glucoforina A | Proteína de membrana p55 | Similar a la tropomiosina |
| Semitransportador de casete de unión a ATP | Precursor de la glucoforina A | Fosfatidilinositol-4-fosfato 5 cinasa de tipo III | Similar a la tropomiosina 4 18 |

(continuación)

| | | | |
|--|--|---|---|
| Miembro 6 de la subfamilia C del casete de unión a ATP | Isoforma 1 de glucoforina C | Fosforribosil pirofosfato sintetasa | Miembro 1 de la familia de vehículos de solutos 2 (transportador de glucosa facilitado) |
| bA421H8.2 (proteína nueva) | Hemoglobina alfa | Ribonucleasa específica de poli (A) | Miembro 1 de la familia de vehículos de solutos 29 (transportador de nucleósidos) |
| Proteína B-CAM | Hemoglobina beta | Proteína asociada a presenilina | Cadena alfa de la espectrina |
| Bloque de proliferación 1 | Hemoglobina delta | Proteína banda 3 | Cadena beta de espectrina |
| C-1-tetrahidrofolato sintasa | Hemoglobina épsilon | Proteína banda 4.1 | Factor de inicio de la traducción 2C |
| ATPasa 4 transportadora de calcio | Hemoglobina gamma | Proteína banda 4.1 (eliptocitosis 1, ligada a RH) | Tropomodulina |
| CD55 | HGTD-P | Proteína banda 4.2 | Tropomiosina 3 |
| CD58 | Proteína hipotética XP_061743 o XP_089854 | Proteína banda 4.9 (dematina) | Isoforma de tropomiosina |
| Antígeno CD59 | Proteína hipotética XP_091430 | Proteína banda 7.2b, estomatina | Cadena de tropomiosina alfa (músculo liso) 26 |
| Glucoproteína de superficie celular CD44 | Proteína hipotética XP_091724 | RAB 35 | Proteína desconocida |
| Proteína de membrana integral de tipo canal | Proteína hipotética XP_092517 | Proteína integradora de rabfilina-3 A | Proteína de membrana asociada a la vesícula 2 (sinaptobrevina 2) |
| Receptor del complemento 1 | Proteína hipotética XP_095819 | Proteína de unión a Ral A | Proteína de unión a la zona pelúcida |
| Proteína asociada a la membrana plasmática de adipocito | Estomatina | Miosina-9 | Histona H1.1 |
| Transportador de amonio de Rh de tipo A | Proteína de tipo estomatina 2 | Proteína 4.1 | Histona H2A de tipo 1-B/E |
| Acuaporina 1 | Proteína transmembrana 4 relacionada con la tiorredoxina | Cadena alfa de la espectrina, eritrocito | Histona H3.1 |
| Acuaporina 7 | TMCC2 | Cadena beta de espectrina, eritrocito | Histona H4 |
| Miembro 6 de la subfamilia B del casete de unión a ATP, mitocondrial | Proteína 1 del receptor de transferrina | Talina-1 | Lamina A/C |
| Proteína de transporte de aniones de banda 3 | Familia de dominios transmembrana y superenrollados 2 | Talina-2 | Polipéptido 2 asociado a lámina, isoforma alfa |
| Basigina | Transportador de urea 1 | Tropomodulina-1 | Polipéptido 2 asociado a lámina, isoformas beta/gamma |
| CD44 | Transportador de cinc 1 | Isoforma 4 de tropomiosina 1 (alfa) | Receptor de lamina-B |

(continuación)

| | | | |
|--|---|---|---|
| CD47 | Proteína de la membrana de eritrocitos de 55 kDa | Tropomiosina 3 | Lamina-B1 |
| Transportador equilibrante de nucleósidos 1 | Actina, músculo cardíaco alfa | Cadena alfa-3 de tropomiosina | Lamina-B2 |
| Proteína asociada a la membrana eritroide | Actina, citoplasmática | Cadena alfa-1 de tubulina | Matrina-3 |
| Flotilina-1 | Proteína 2 relacionada con la actina | Cadena beta de tubulina | Inositol polifosfato fosfatasa múltiple 1 |
| Flotilina-2 | Subunidad 1B del complejo de proteína 2/3 relacionada con la actina | Tubulina, alfa 1 (específica de testículo) | N-acilneuraminato citidililtransferasa |
| Transportador de glucosa, tipo 1 | Subunidad 2 del complejo de proteína 2/3 relacionada con la actina | Tubulina, alfa 8 | Alfaglucosidasa AB neutra |
| Glucoforina-A | Proteína 3 relacionada con la actina | Tubulina, beta 6 | Proteína del complejo de poros nucleares Nup93 |
| Glucoforina-B | Alfa-actinina-4 | Vinculina | Glucoproteína 210 de la membrana del poro nuclear |
| Glucoforina-C | Alfa-aducina | Proteína regulada por glucosa de 78 kDa | Nucleolina |
| Receptor 1 que contiene un dominio de tipo inmunoglobulina | Anquirina-1 | Antígeno KI-67 | Homólogo de nucleoporina NUP188 |
| Integrina alfa-X | Anquirina-3 | ARN helicasa DDX39A dependiente de ATP | Nucleoproteína TPR |
| Integrina beta-1 | Proteína 2 de tipo beta-actina | Calnexina | Prelamina-A/C |
| Glucoproteína del grupo sanguíneo Kell | Beta-aducina | Calreticulina | Proteína disulfuro-isomerasa |
| Subunidad pequeña 3 del transportador de aminoácidos neutros grandes | Línea Z muscular de proteína de recubrimiento (filamento de actina), beta | ADN topoisomerasa 1 | Proteína disulfuro-isomerasa A4 |
| Proteína de transporte de membrana XK | Cortactina | Subunidad catalítica de proteína cinasa dependiente de ADN | Proteína disulfuro-isomerasa A6 |
| Componente 2 del receptor de progesterona asociado a membrana | Dematina | Subunidad de 48 kDa de doliquil-difosfoligosacaridoproteína glucosiltransferasa | Proteína ERGIC-53 |
| Transportador de monocarboxilato 1 | Dinactina 2 (P50), isoforma CRA_b | Subunidad 1 de doliquil-difosfoligosacaridoproteína glucosiltransferasa | Riboforina II |
| Proteína 4 asociada a multirresistencia | Banda 4.2 de la proteína de la membrana de eritrocito | Proteína 29 residente en el retículo endoplásmico | ATPasa de retículo endoplásmico de transición |

(continuación)

| | | | |
|---|---|--|--|
| Éster de colesterol neutro hidrolasa 1 | Filamina-A | Proteína 44 residente en el retículo endoplásmico | UDP-glucosa: glucoproteína glucosiltransferasa 1 |
| ATPasa 1 transportadora de calcio de la membrana plasmática | Gamma-aducina | Endoplasmina | CD59 |
| ATPasa 3 transportadora de calcio de la membrana plasmática | Gelsolina | SNARE de 24 kDa de RE-Golgi | |
| ATPasa 4 transportadora de calcio de la membrana plasmática | Cadena pesada de kinesina-1 | Subunidad SPT16 del complejo de FACT | |
| Ubiquitina-proteína ligasa E3 probable C12orf51 | Miembro 1 de la familia de proteína RP/EB asociada a microtúbulos | Subunidad beta de glucosidasa 2 | |
| Grupo sanguíneo Rh, antígenos CcEe | Cadena ligera de miosina 4 | Hemo oxigenasa 1 | |
| SLC43A3 | Polipéptido ligero de miosina 6 | Hemógeno | |
| Intercambiador de sodio/calcio SCL8A3 | Miosina, cadena pesada 11, músculo liso | Proteína 3 de unión a la proteína 1 de heterocromatina | |
| Subunidad alfa-1 de ATPasa transportadora de sodio/potasio | Miosina-10 | Proteína B1 del grupo de alta movilidad | |
| Subunidad beta-3 de ATPasa transportadora de sodio/potasio | Miosina-14 | Proteína B2 del grupo de alta movilidad | |

Tabla C1: Proteínas transmembrana de eritrocitos

| | |
|---|---|
| Acuaporina 1 | Kell |
| Glucoproteína de superficie celular CD44 | Proteína de membrana p55 |
| Proteína de membrana integral de tipo canal | Proteína banda 3 |
| Receptor del complemento 1 | Polipéptido antigénico del grupo sanguíneo D de Rh |
| Proteína asociada a la membrana de eritroblasto | Proteína de tipo III de categoría VI de Rhesus D |
| Glucoproteína transportadora de glucosa | Similar a la glucoforina A |
| Glucoforina A | Similar al grupo sanguíneo luterano |
| Precursor de la glucoforina A | Miembro 1 de la familia de vehículos de solutos 2 (transportador de glucosa facilitado) |
| Isoforma 1 de glucoforina C | Miembro 1 de la familia de vehículos de solutos 29 (transportador de nucleósidos) |

Tabla C2: Proteínas unidas a GPI de eritrocitos

| |
|---------------------|
| Acetilcolinesterasa |
| CD55 |
| CD58 |
| Antígeno CD59 |

Tabla C3: Proteínas intracelulares de eritrocitos

| | | | |
|--|--|---|--|
| Nucleótido 2',3'-cíclico 3'-fosfodiesterasa | Proteína potenciadora | Proteína hipotética XP_100925 | RAP1A o RAP1B |
| Cadenas alfa y beta de actina | Proteína de unión a elementos corriente arriba lejanos | Proteína hipotética XP_103707 | RAP2B |
| Adenosina desaminasa | Flotilina 1 | Proteína hipotética XP_106269 | Similar al precursor de proteína de la matriz de placa adhesiva |
| Subunidad alfa de aducina | Flotilina 2 47 | Región V-V de cadena pesada de Ig | Similar a anquirina 1 |
| Aldolasa A | Glutación transferasa | KIAA0340 | Similar a flotilina 2 |
| Isoforma 2 de anquirina 1 | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa | Proteína KIAA1741 | Similar a la proteína RAB-15 relacionada con RAS |
| Isoforma 4 de anquirina 1 | Hemoglobina alfa | Proteína Lyn B | Similar a la proteína RAL-A relacionada con RAS |
| Forma de corte y empalme 2 de anquirina 1 | Hemoglobina beta | Fosfatidilinositol-4-fosfato 5 cinasa de tipo III | Similar a la tropomiosina |
| Arginasa de tipo 1 | Hemoglobina delta | Fosforribosil pirofosfato sintetasa | Similar a la tropomiosina 4 |
| Variante eritroide de arginasa de tipo 1 | Hemoglobina épsilon | Ribonucleasa específica de poli (A) | Cadena alfa de la espectrina |
| Semitransportador de casete de unión a ATP | Hemoglobina gamma | Proteína asociada a presenilina | Cadena beta de espectrina |
| Miembro 6 de la subfamilia C del casete de unión a ATP | HGTD-P | Proteína banda 4.1 | Factor de inicio de la traducción 2C |
| bA421H8.2 (proteína nueva) | Proteína hipotética XP_061743 o XP_089854 | Proteína banda 4.1 (eliptocitosis 1, ligada a RH) | Tropomodulina |
| Proteína B-CAM | Proteína hipotética XP_091430 | Proteína banda 4.2 | Tropomiosina 3 |
| Bloque de proliferación 1 | Proteína hipotética XP_091724 | Proteína banda 4.9 (dematina) | Isoforma de tropomiosina |
| C-1-tetrahidrofolato sintasa | Proteína hipotética XP_092517 | Proteína banda 7.2b, estomatina | Cadena de tropomiosina alfa (músculo liso) 26 |
| ATPasa 4 transportadora de calcio | Proteína hipotética XP_095819 | RAB 35 | Proteína desconocida |
| Creatina cinasa | Proteína hipotética XP_100510 | Proteína integradora de rabfilina-3 A | Proteína de membrana asociada a la vesícula 2 (sinaptobrevina 2) |
| DC 38 | Proteína hipotética XP_100619 | Proteína de unión a Ral A | Proteína de unión a la zona pelúcida |
| Citocromo b duodenal | Proteína hipotética XP_100665 | | |

Tabla D: Procedimientos de conjugación

| | |
|--|--|
| Conector X de longitud cero | Conector X de amina-sulfhidrilo |
| EDC | SPDP, LC-SPDP, sulfo-LC-SPDP |
| EDC más sulfo NHS | SMPT y sulfo-LC-SMPT |
| CMC | SMCC y sulfo-SMCC |
| DCC | MBS y sulfo-MBS |
| DIC | SIAB y sulfo-SIAB |
| Reactivo K de Woodward | SMPB y sulfo-SMPB |
| N,N'-carbonildiimidazol | GMBS y sulfo-GMBS |
| Base de Schiff + aminación reductora | SIAX y SIAXX |
| Ésteres de NHS homobifuncionales | SIAC y SIACX |
| DSP | NPIA |
| DTSSP | Conector X de carbonil-sulfhidrilo |
| DSS | MPBH |
| BS ³ | M2C2H |
| DST | PDPH |
| Sulfo-DST | Conector x fotorreactivo de amina |
| BSOCOES | NHS-ASA, Sulfo-NHS-ASA |
| Sulfo-BSOCOES | Sulfo-NHS-LC-ASA |
| EGS | SASD |
| Sulfo-EGS | HSAB y sulfo-HSAB |
| DSG | SANPAH y sulfo-SANPAH |
| DSC | ANB-NOS |
| Imidoésteres homobifuncionales | SAND |
| DMA | SADP y sulfo-SADP |
| DMP | Sulfo-SAPB |
| DMS | SAED |
| DTBP | Sulfo-SAMCA |
| Conectores x reactivos de sulfhidrilo | p-Nitrofenil diazopiruvato |
| DPDPB | PNP-DTP |
| BMH | Conector x fotorreactivo de sulfhidrilo |
| Derivados de difluorobenceno | ASIB |
| DFDNB | APDP |
| DFDNPS | Benzofenona-4-yodoacetamida |
| Conector x fotorreactivo | Benzofenona-4-maleimida |
| BASED | Conector x fotorreactivo de carbonilo |
| Aldehídos homobifuncionales | ABH |

(continuación)

| | |
|--------------------------------------|--|
| Formaldehído | Conector x fotorreactivo de carboxilato |
| Glutaraldehído | ASBA |
| bis-epóxido | Conector x fotorreactivo de arginina |
| Éter diglicidílico de 1,4-butanodiol | APG |
| Hidracidas homobifuncionales | Reacciones bioortogonales |
| dihidracida de ácido adípico | Pares de reactivos de Diels-Alder |
| carbohidracida | Pares de reactivos de hidracina-aldehído |
| Derivado de bis-diazonio | Salicilhidroxamato de ácido borónico |
| o-tolidina diazotizada | Química clic |
| Bencidina bis-diazotizada | Ligadura de Staudinger |

Tabla D1: Procedimientos de conjugación enzimática

| |
|------------------------------------|
| Reacciones enzimáticas |
| SpyCatcher/SpyTag |
| Derivados de Spy0128 |
| Transpeptidasas |
| Isopeptidasas |
| Sortasa |
| DD-transpeptidasa |
| Peptidil transferasa |
| G-glutamil transpeptidasa |
| D-glutamil transpeptidasa |
| Farnesiltransferasa |
| Preniltransferasa |
| Dimetilaliltrans-transferasa |
| Geranilgeranil pirofosfato sintasa |
| Deshidrodolicol difosfato sintasa |

Tabla E: Química de grupos reactivos

| Reacciones de amina | Reacciones de tiol | Reacciones de hidroxilo | Reacciones de hidrógeno activo |
|---------------------|--|--|--------------------------------|
| Isotiocianatos | Derivados de haloacetilo y haluro de alquilo | Epóxidos y oxiranos | Derivados de diazonio |
| Isocianatos | Maleimidias | Carbonildiimidazol | Condensación de Mannich |
| Azidas de acilo | Aziridinas | Carbonato de N,N'Odisuccinimidilo | Reacciones de yodación |
| Ésteres del NHS | Derivados de acrilóilo | Cloroformato de N-hidroxisuccinimidilo | |

(continuación)

| Reacciones de amina | Reacciones de tiol | Reacciones de hidroxilo | Reacciones de hidrógeno activo |
|----------------------------------|---|--|--|
| Cloruros de sulfonilo | Agentes arilantes | Oxidación con peryodato | |
| Aldehídos y glioxales | Reactivos de intercambio de tildisulfuro | Oxidación enzimática | Reacciones de cicloadición |
| Epóxidos y oxiranos | Derivados de vinilsulfona | Halógenos de alquilo | Reacción de Diels-Alder |
| Carbonatos | Enlaces dativos de metal-tiol | Isocianatos | Formación de complejos con derivados de ácido borónico |
| Agentes arilantes | | | Química clic: Cicloadición de azida-alquino [3+2] promovida por Cu |
| Imidoésteres | Reacciones de carboxilato | Reacciones de aldehído y cetona | |
| Carbodiimidas | Diazoalcanos y compuestos de diazoacetilo | Derivados de hidracina | |
| Anhídridos | Carbonildiimidazol | Formación de bases de Schiff | |
| Ésteres de fluorfenilo | Carbodiimidas | Aminación reductora | |
| Derivados de hidroximetilfosfina | | Condensación de Mannich | |
| Guanidínación de aminas | | | |

Tabla F: Enfermedades autoinmunitarias y antígenos

| Enfermedad | Antígeno conocido |
|-----------------------------------|---|
| Fiebre reumática aguda | anticuerpos de reacción cruzada para el músculo cardíaco |
| alopecia areata | Trichialina, queratina 16 |
| Vasculitis asociada a ANCA | Antígeno citoplasmático de neutrófilos, proteinasa 3, mieloperoxidasa, factor de aumento de la permeabilidad bacteriana |
| gastritis autoinmunitaria | H,K adenosina trifosfatasa |
| anemia hemolítica autoinmunitaria | Antígenos del grupo sanguíneo Rh, antígeno I |
| hepatitis autoinmunitaria | proteína nuclear, microsoma de hígado-riñón de tipo 1, citosol hepático de tipo 1 |
| miocarditis autoinmunitaria | miosina cardíaca |
| Tiroiditis autoinmunitaria | Peroxidasa tiroidea, tiroglobulina, receptor de la hormona estimulante del tiroides |
| Uveítis autoinmunitaria | Arrestina retiniana (antígeno S) |
| dermatomiositis | ATPasa Mi2 |
| diabetes (tipo 1) | Antígeno de células beta pancreáticas |
| síndrome de Goodpasture | Dominio no colagenoso del colágeno de membrana basal de tipo IV |
| Enfermedad de Graves | Receptor de la hormona estimulante del tiroides |
| Síndrome de Guillain-Barre | Neurofascina-186, gliomedina, moléculas de adhesión nodular |
| Hipoglucemia | Receptor de insulina |

(continuación)

| Enfermedad | Antígeno conocido |
|---|---|
| púrpura trombocitopénica idiopática | Integrina plaquetaria GpIIb, GpIIIa |
| Diabetes resistente a la insulina | Receptor de insulina |
| Nefritis membranosa | Fosfolipasa A2 |
| crioglobulinemia esencial mixta | complejos de IgG de factor reumatoide |
| esclerosis múltiple | Proteína básica de mielina, proteína proteolipídica, glucoproteína de oligodendrocitos de mielina |
| miastenia grave | Receptor de acetilcolina |
| Miastenia grave - MUSC | Receptor muscarínico |
| pénfigo/penfigoide | Cadherina epidérmica |
| anemia perniciosa | factor intrínseco (gástrico) |
| polimiositis | antígeno nuclear y nucleolar |
| cirrosis biliar primaria | antígeno nuclear de neutrófilos, complejo multienzimático mitocondrial |
| psoriasis | PSO p27 |
| artritis reumatoide | complejos de IgG de factor reumatoide, antígeno de la articulación sinovial, proteína citrulinada, proteína carbamylada |
| esclerodermia/esclerosis sistémica | Scl-86, antígeno de esclerodermia nucleolar |
| Síndrome de Sjogren | SS-B, Proteína La de lupus |
| lupus eritematoso sistémico | ADN, histonas, ribosomas, RNPnp, RNPcp |
| vitiligo | VIT-90, VIT-75, VIT-40 |
| Granulomatosis de Wegener | antígeno nuclear de neutrófilos |
| Síndrome antifosfolipídico (SAP) y SAP catastrófico | Glucoproteína 1 beta-2 |
| Neuropatía periférica inducida por quimioterapia | Antígenos neuronales |
| Púrpura trombocitopénica trombótica | ADAMTS13 |
| Síndrome urémico hemolítico atípico | Factor de complemento H |

Tabla G: Enfermedades inflamatorias y antígenos

| Enfermedad | Antígeno |
|------------------------------------|---|
| Enfermedad de Crohn | Flagelina, antígenos microbianos |
| Colitis ulcerosa | Antígeno citoplasmático de neutrófilos, antígenos microbianos |
| Enfermedad celíaca | Gluten |
| Enfermedad inflamatoria intestinal | Antígenos microbianos |

Tabla H: Desencadenantes de enfermedades alérgicas

| Alergia | Antígeno |
|----------------|---|
| Caspa animal | fel d 1, can f6 |
| Nogal negro | Albúmina 2S, proteína de tipo vicilina (7S) |

(continuación)

| Alergia | Antígeno |
|--------------------|---|
| nuez de Brasil | Albúmina 2S, proteína de almacenamiento de semillas de tipo leguminosa (11S) |
| Anacardo | Proteína de tipo vicilina 7S, proteína de almacenamiento de semillas de tipo leguminosa 11S |
| Castaña | Quitinasa 1b, proteína de transferencia de lípidos Cas s8 |
| Ácaros del polvo | Der p2 |
| Huevo | Ovomucoide, ovoalbúmina, ovotransferrina, lisozima, alfa-livetina |
| Nogal | Albúmina 2S, Proteína de tipo vicilina 7S, proteína de transferencia de lípidos, proteína de almacenamiento de semillas de tipo leguminosa 11S |
| Pescado | Parvalbúminas |
| Avellana | Homólogo de Bet v1, profilina, proteína de transferencia de lípidos, proteína de tipo globulina 11s, proteína de tipo vicilina 7S |
| Veneno de insectos | Melitina, fosfolipasa A2, hialuronidasa, fosfatasa ácida, proteasa, antígeno 5, Api m1-4, Bom p1, p4, Dol m1, 2,5; Vesp c1, c5; Pol a1, a2, a5; Ves v1, v2, v5; Sol I 1-4 |
| Látex | Hev b 1, 2, 3, 5, 6.01, 6.02, 8, 9, 11 |
| Leche | Caseína alfa s1, beta-lactoglobulina |
| Moho | enzimas, toxinas, componentes de la pared celular |
| Cacahuete | Ara h1, Ara h2, Ara h3, Ara h6 |
| Polen | Aconitato hidratasa, fructosa bisfosfato aldolasa, ATP sintasa, proteína de unión luminal, calmodulina, calreticulina, chaperonina, enolasa, proteína de transferencia de lípidos 1, proteína de transferencia de lípidos 2, profilinas |
| Polen, hierba | Phl p 1, 2, 4, 5, 6, 11, 12, 13 |
| Marisco | arginina cinasa, tropomiosina, cadena ligera de miosina, proteína sarcoplásmica de unión a calcio, triosa fosfato isomerasa, aldolasa, titina |
| Soja | Proteína hidrofóbica de soja Gly m1, gly m4, gly m5, gly m6, Albúmina gly m 2s, proteínas de transferencia de lípidos, alfa-globulina, |
| Nueces arbóreas | Proteínas de transferencia de lípidos, profilinas, familia relacionada con Bet v1, legúminas, vicilinas, albúminas 2S |
| Trigo | gluten, prolaminas, albúminas 2S, proteínas de transferencia de lípidos, inhibidores de α -amilasa/proteasa, puroindolina, alfa-globulina, alfa-gliadina, beta-gliadina, gamma-gliadina, omega-gliadina rápida, omega-gliadina lenta |

Tabla I: Proteínas terapéuticas para tratar enfermedades

| Nombre comercial | Empresa | Indicación |
|-------------------------|------------------|--|
| Amevive | Astellas Pharma | Psoriasis en placas crónica de moderada a grave |
| BayGam | Bayer | Hepatitis A, sarampión, varicela, rubéola, deficiencia de inmunoglobulina |
| CinnoVex | CinnaGen | Esclerosis múltiple |
| Synagis | Medlummne | Infecciones por virus sincitial respiratorio (VSR) |
| Lucentis | Roche Genentech | Degeneración macular húmeda asociada a la edad (DMAE) |
| Actemra | Hoffman-La Roche | Artritis reumatoide |
| Avastin | Roche Genentech | Diversos tipos de cáncer |
| Benefix | Pfizer | Hemofilia B/enfermedad de Christmas (deficiencia del factor de coagulación IX) |

(continuación)

| Nombre comercial | Empresa | Indicación |
|-------------------------|-----------------------------|---|
| Benlysta | HGS, GlaxoSmithKline | Lupus eritematoso sistémico (LES) |
| Bexxar | GlaxoSmithKline, Corixa | CD20 +. folicular, NHL |
| Campath | Genzyme | Leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B) |
| Ceredase | Genzyme | Enfermedad de Gaucher de tipo I |
| Cerezyme | Genzyme | Enfermedad de Gaucher de tipo 1 |
| Erbix | Lilly | Cáncer colorrectal metastásico |
| Helixate FS | CSL Behring | Hemofilia A |
| Herceptin | Roche Genentech | Cáncer de mama |
| Kogenate FS | Bayer Healthcare | Hemofilia A |
| Lumizyme | Genzyme | Enfermedad de Pompe (enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo II) |
| NovoSeven | Novo Nordisk | Pacientes con hemofilia A o B con inhibidores del factor VIII o factor IX y en pacientes con hemofilia adquirida |
| Privigen | CSL Behring | Terapia de IVIG |
| Recombinate | Baxter, Wyeth | Hemofilia A |
| Refacto | Pfizer | Hemofilia A |
| Remicade | Janssen Biotech (J&J) | Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, psoriasis en placas, colitis ulcerosa |
| ReoPro | Lilly | Adjunto de PTCA (angioplastia) |
| Rituxan/MabThera | Roche Genentech/Biogen Idec | Cánceres de sangre y artritis reumatoide |
| Simulect | Novartis | Profilaxis del rechazo de órganos |
| Soliris | Alexion Pharmaceuticals | Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome urémico hemolítico atípico (SHUa) |
| Tysabri | Biogen Idec, Elan Pharma. | Esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn |
| Vectibix | Amgen | Tratamiento del carcinoma colorrectal metastásico (CCRm) que expresa receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) |
| Xyntha | Wyeth | Hemofilia A (deficiencia de factor VIII) |
| Zenapax | Roche/PDL | Profilaxis del rechazo agudo de órganos en pacientes que reciben trasplantes renales |
| Arcalyst | Regeneron Pharmaceuticals | Síndromes periódicos asociados a criopirina (SPAC), incluyendo FCAS y MWS |
| Betaseron | Bayer Healthcare | Esclerosis múltiple, enfermedad miocárdica |
| Cetrotide | Merck Serono | Infertilidad |
| Cimzia | UCB | Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn |
| Copaxone | Teva Pharmaceuticals | Esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, glaucoma, enfermedad de las neuronas motoras, corea de Huntington, enfermedad neurodegenerativa |
| Enbrel | Amgen, Wyeth | Artritis reumatoide, psoriasis |
| Epogen | Amgen | Anemia |
| Humira | Abbott | Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn |

(continuación)

| Nombre comercial | Empresa | Indicación |
|------------------|---------------------------|---|
| Kineret | Amgen, Biovitrum | Artritis reumatoide activa |
| Lantus | Sanofi-Aventis | Diabetes |
| Pegasys | Roche Genentech | Hepatitis C crónica, hepatitis B crónica |
| Prolia | Amgen, GSK | Osteoporosis, pérdida ósea inducida por terapia (cáncer de mama u ovario), metástasis ósea, tumor óseo gigantomieloma, mieloma múltiple |
| - | - | - |
| Rebif | Merck Serono, Pfizer | Esclerosis múltiple (recidivante) |
| Simponi | Johnson & Johnson | Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, Colitis ulcerosa, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica |
| Stelara | Centocor, Janssen-Cilag | Psoriasis en placas de moderada a grave candidatas a fototerapia o terapia sistémica. |
| Vivaglobin | CSL Behring | Inmunodeficiencia primaria (IDP) |
| Xgeva | Amgen | Metástasis ósea de tumores sólidos |
| Xolair | Roche Genentech, Novartis | Asma alérgica persistente de moderada a grave |
| Avonex | Biogen Idec | Esclerosis múltiple (recidivante) |
| Aranesp | Amgen | Anemia |
| Orencia | Bristol-Myers-Squibb | Artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil |
| Procrit | Janssen Biotech (J&J) | Anemia |
| Erwinaze | Jazz | Leucemia linfoblástica aguda |

Tabla J: Clases de proteínas terapéuticas para tratar enfermedades

| | |
|-------------------------------|---------------------------|
| Proteína de la cápsida de VAA | Asparaginasa |
| alglucosidasa alfa | CTLA4 |
| Anti C5 | Eritropoyetinas |
| Anti gp lib/IIIa | Factor IX |
| Anti IGE | Factor VII |
| Anti IL-12, Anti IL-23 | Factor VIII |
| Ligando anti RANK | Acetato de glatirámico |
| Integrina anti-alfa 4 | glucocerebrosidasa |
| Anti-APRI L | Antagonista de GnRH |
| Anti-BAFF | IgG |
| Anti-CD20 | Antagonista de IL1R |
| Anti-CD52 | Antagonista de IL1R o IL1 |
| Anti-EGFR | Insulina |
| Anti-Her2 | Interferón alfa |
| Receptor anti-IL2 | Interferón beta |

(continuación)

| | |
|---------------------|--------------------------------------|
| Receptor anti-IL6 | Proteína de la cápside de lentivirus |
| Anti-PD1 | LFA3-Fc |
| Proteína F anti-VSR | Proteína de la cápside de retrovirus |
| Anti-TNFa | TACI-Ig |
| Anti-VEGF | Receptor de TNF |

TABLAS 1-8

| Grupos sanguíneos AB0 | Estomatina | Peters | FAD Cromer |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|---|
| Acuaporina 3 | Tropomiosina | Rasmussen | Gerbich (GYPC) |
| Aubergers | Transportador de glucosa | Reid | CD47 |
| Banda 3 | Aducina | REIT | Glucosforina A, B, C |
| Basigina | Rabfilina | SARA | Banda 3 (AE3) |
| C41 | C1 tetrahidrofolato sintasa | Grupo D de sangre Rhesus | GYPB Ss |
| CD44 | Grupo Vel | Aldolasa | C4A, C4B Chido, componente Rodgers C4 del complemento |
| Cis AB | Antígeno Lan | Tropomodulina | HLA Bg HLA de clase I |
| Diego (Di) | Antígeno At | Arginasa | Transporte de amonio asociado a Rh RHAG |
| Antígeno de Colton | Antígeno Jr | Creatina cinasa | glucoproteína |
| Componente 4 del complemento | Antígeno AnWj | Proteína B-Cam | Proteína del canal de agua Colton (Co) |
| alfa(1,3) fucosiltransferasa | Antígeno Sd | Rap1A | Acetilcolinesterasa ACHE Cartwright (Yt) |
| CR1 | Batty | Bennett-Goodspeed | Glutación transferasa |
| FAD | Bilkes | Sistema de antígenos P | Glucosforina C |
| Diego | Wright (Wr) | Grupo sanguíneo Rh | Acuaporina |
| Duffy | Box | Sistema de antígeno Xg | Proteína de membrana asociada a eritroblastos |
| Antígeno Hh/Bombay | Christiansen | Proteína XK | CD44 |
| antígeno ii | alfa(1,2) fucosiltransferasa | Sistema de antígenos Yt/Cartwright | Sinaptobrevina 2 |
| Grupo sanguíneo indio | HJK | CD58 | Ribonucleasa |
| Kell | HOFM | Rh | Glucosil transferasas AB0 |
| Kidd | JFV | Receptor de adhesión AnWj | CD59 |
| Antígeno de Lewis | JONES | Scianna | CD44 |
| Antígeno luterano | Jensen | Radin | MER2 |

(continuación)

| Tabla 1. Polipéptidos eritroides y polipéptidos antigénicos no exógenos | | | |
|--|------------------------|------------------------------|---|
| Sistema de antígenos MNS | Katagiri | Citocromo B duodenal | ADP-ribosiltransferasa DOK Dombrock |
| Grupo Cost | Livesay | DARC (Duffy) | Receptor de adhesión potencial SEMA7AJMH |
| Grupo Er | Milne | CR1 Knops-McCoy | Proteína UMOD Sda Tamm-Horsfall (uromodulina) |
| Dematina | Oldeide | Familia FP | Proteína del canal intercambiador de aniones (banda 3, AE1) |
| Indio (In) | Familia de anexina | Familia Tweety | Familia CTL |
| Transportador de urea Kidd (Jk) | Familia Bcl-2 | Familia UT | Familia DAACS |
| FUT3 Lewis (Le) | Familia de bestrofina | Familia VIC | Familia DASS |
| Adenosina desaminasa | Familia BNip3 | Familia AAAP | Familia DMT |
| Neurotelina OK Oka, molécula de adhesión potencial | Familia CD20 | receptor de transferrina | Familia ENT |
| Receptor de adhesión LW | Familia CLIC | c-KIT | Familia GPH |
| Secretor de FUT2 (Se) | Familia de conexina | Receptores de insulina 1 y 2 | Familia GUP |
| FUT1 Hh alfa | Familia CRAC-C | Receptor de estrógenos | Familia LCT |
| Receptor de adhesión luterano (Lu) LU | Familia Ctr | Receptor de dexametasona | Familia MC |
| P1 glucosiltransferasa | Familia E-CIC | Cinasa JAK2 | Familia MET |
| Transportador de neurotransmisores potencial XK Kx | Familia ENaC | Familia ABC | Familia MFS |
| XG Xg denominado anteriormente PBDX | Familia GIC | Familia ArsAB | Familia MOP |
| MIC2 | Familia ICC | Familia de F-ATPasa | Familia MTC |
| Hemoglobina | Familia de inxina | Familia IISP | Familia NCS2 |
| Anquirina | Familia IRK-C | Familia MPT | Familia Nramp |
| Espectrina | Familia LIC | Familia de P-ATPasa | Familia NSS |
| Metaloproteínasa Kell KEL (K, k, Kp, Js) | Familia MIP | Familia AE | Familia OAT |
| Torkildsen | Familia MIT | Familia APC | Familia OST |
| Rab 35 | Familia NSCC2 | Familia ArsB | Familia Oxa1 |
| Proteína de unión a Ral A | Familia PCC | Familia BASS | Familia PIT |
| Proteína de unión a la zona pelúcida | Familia de plamolipina | Familia CaCA | Familia PNaS |
| Proteína Lyn B | Familia PLB | Familia CCC | Familia POT |
| Proteína Klau1741 | Familia PLM | Familia CDF | Familia RFC |
| DC38 | Familia de presenilina | Familia CIC | Familia RND* |

(continuación)

| Tabla 1. Polipéptidos eritroides y polipéptidos antigénicos no exógenos | | | |
|--|-----------------|--------------|-----------------|
| ATPasa transportadora de calcio | Familia RIR-CaC | Familia CNT | Familia SSS |
| Familia ACC | Familia TRIC | Familia CPA1 | Familia STRA6 |
| Familia Amt | Familia TRP-CC | Familia CPA2 | Familia SulP |
| Familia ZIP | Familia HCC | Familia NIPA | Familia N-MDE |
| Familia ATP-E | Familia LPI | Familia PPI | Receptor de Epo |
| Familia ARNbc-T | Familia MagT1 | Familia PPI2 | Familia MgtE |

| Tabla 2. Promotores de eritroides | |
|---|---------------|
| Promotor | Gen |
| promotor de beta globina | beta globina |
| potenciador de beta-globina 3' | beta globina |
| región de control del locus de beta globina | beta globina |
| promotor GATA-1 | GATA-1 |
| promotor GYPA | Glucoforina A |
| promotor HK1 | Hexocinasa |

Tabla 3. Secuencias del receptor del complemento 1

4A. Precursor de la isoforma S de CR1, Secuencia de referencia de NCBI de *Homo sapiens* n.º NP_000642.3

ES 2 865 825 T3

1 mgassprspe pvgppapglp fccggsllav vlllalpvaw gqcnawelp farptnltd
61 fefpigtyln yecrpgysgr pfsiiclkns vwtgakdrer rkscrnppdp vngmvhvik
121 iqfgsqikys ctkgyrligs ssatciisgd tviwdnetpi cdripcglpp titngdfist
181 nrenfhygs vtyrcnpgsg grkvfelvge psiyctsndd qvgiwsppap qciipnkctp
241 pnvengilvs dnrsflslne vvefrcqpgf vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp
301 pdvlhaertq rdkdnfsgq evfyscepgy dlrgaasmrc tpqgdwspaa ptcevkscdd
361 fmgqllngrv lfpvnlqlga kvdfvcdegf qlkgssasyc vlagmeslwn ssvpvceqif
421 cpsppvipng rhtgkplevf pfgktvnytc dphpdrgrtsf dligestirc tsdpqngvw
481 sspaprcgil ghcqapdhfl faklktqtna sdfpigtslk yecrpeyygr pfsitcldnl
541 vwsspkdvck rkscktpdp vngmvhvitd iqvgsrinys cttghrligh ssaecilsgn
601 aahwstkppi cqripcglpp tiangdfist nrenfhygs vtyrcnpgsg grkvfelvge
661 psiyctsndd qvgiwsppap qciipnkctp pnvengilvs dnrsflslne vvefrcqpgf
721 vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp pdvlhaertq rdkdnfsgq evfyscepgy
781 dlrgaasmrc tpqgdwspaa ptcevkscdd fmgqllngrv lfpvnlqlga kvdfvcdegf
841 qlkgssasyc vlagmeslwn ssvpvceqif cpsppvipng rhtgkplevf pfgktvnytc
901 dphpdrgrtsf dligestirc tsdpqngvw sspaprcgil ghcqapdhfl faklktqtna
961 sdfpigtslk yecrpeyygr pfsitcldnl vwsspkdvck rkscktpdp vngmvhvitd
1021 iqvgsrinys cttghrligh ssaecilsgn aahwstkppi cqripcglpp tiangdfist
1081 nrenfhygs vtyrcnpgsg grkvfelvge psiyctsndd qvgiwsppap qciipnkctp
1141 pnvengilvs dnrsflslne vvefrcqpgf vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp
1201 pdvlhaertq rdkdnfsgq evfyscepgy dlrgaasmrc tpqgdwspaa ptcevkscdd
1261 fmgqllngrv lfpvnlqlga kvdfvcdegf qlkgssasyc vlagmeslwn ssvpvceqif
1321 cpsppvipng rhtgkplevf pfgkavnytc dphpdrgrtsf dligestirc tsdpqngvw
1381 sspaprcgil ghcqapdhfl faklktqtna sdfpigtslk yecrpeyygr pfsitcldnl
1441 vwsspkdvck rkscktpdp vngmvhvitd iqvgsrinys cttghrligh ssaecilsgn
1501 tahwstkppi cqripcglpp tiangdfist nrenfhygs vtyrcnpgsg grkvfelvge
1561 psiyctsndd qvgiwsppap qciipnkctp pnvengilvs dnrsflslne vvefrcqpgf
1621 vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp peilhgehtp shqdnfsgq evfyscepgy
1681 dlrgaaslhc tpqgdwspea prcavkscdd flgqlphgrv lfpvnlqlga kvdfvcdegf
1741 rlgkssvshc vlvgmrlwn nsppvcehif cpnpailng rhtgtpsgdi pygkeisytc
1801 dphpdrgrtmf nligestirc tsdpqngvw sspaprcels vraghcktp qfpfasptip
1861 indfefpvgst slnyecrpgy fgkmsiscl enlvwssved ncrkscgpp pepfngmvi
1921 ntdtqfgstv nyscnegfrl igspsttclv sgnnvtwkk apiceisce ppptisngdf
1981 ysnrntsfhn gtvvtyqcht gpdgeqlfel vgersiycts kddqvgwss ppprcistnk
2041 ctapevenai rvpgnrsfft lteirfrcq pgfvmvgsht vqcqtngrwg pklphcsrv
2101 qpppeilhge htlshqdnfs pgqevfysce psydlrgaas lhctpqgdws peaprcvks
2161 cddflgqlph grvllplnlq lgakvsfvcd egfrlkgrsa shcvlagmka lwnssvpce
2221 qifcpnppai lngrrhtgtpf gdipygkeis yacdthpdrgr mtfnligess irtsdpqgn
2281 gvwsspaprc elsvpaacph ppkinqghyi gghvslylpg mtisyicdpg yllvgkgfif

ES 2 865 825 T3

2341 ctdqgiwsql dhyckevncs fplfmngisk elemkkvyhy gdyvtlkced gytlegspws
2401 qcqaddrwdp plaktsrth dalivgtlsg tiffilliif lswiilkhrk gnnahenpke
2461 vaihlhsqgg ssvhprtlqt neensrvlp **(Seq. ID No. 1)**

4B. Precursor de la isoforma F de CR1, Secuencia de referencia de NCBI de *Homo sapiens* n.º NP_000564.2

1 mgassprspe pvgppapglp fccggsllav vllalpvaw gqcnapewlp farptnltde
61 fefpigtyln yecrpgysgr pfsiiclkns vwtgakdr cr rkscrnppdp vngmvhvikg
121 iqfgsqikys ctkgyrligs ssatciisgd tviwdnetpi cdripcglpp titngdfist
181 nrenfhygsv vtyrcnpgsg grkvfelvge psiyctsndd qvgiwsppap qciipnkctp
241 pnvengilvs dnrsflsne vvefrcqpgf vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp
301 pdvlhaertq rdndfsgg evfyscepgy dlrgaasmrc tpqgdwspaa ptcevksdcd
361 fmgqllngrv lfpvnlqlga kvdfvcdegf qlkgssasyc vlagmeslwn ssvpvceqif
421 cpsppvipng rhtgkplevf pfgktvnytc dphpdrgtsf dligestirc tsdpqngvw
481 sspaprcgil ghcqapdhfl faklktqtna sdfpigtslk yecrpeyygr pfsitclndl
541 vwsspkdvck rkscktpdp vngmvhvitd iqvgsrinys cttghrligh ssaecilsgn
601 aahwstkppi cqripcglpp tiangdfist nrenfhygsv vtyrcnpgsg grkvfelvge
661 psiyctsndd qvgiwsppap qciipnkctp pnvengilvs dnrsflsne vvefrcqpgf
721 vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp pdvlhaertq rdndfsgg evfyscepgy
781 dlrgaasmrc tpqgdwspaa ptcevksdcd fmgqllngrv lfpvnlqlga kvdfvcdegf
841 qlkgssasyc vlagmeslwn ssvpvceqif cpsppvipng rhtgkplevf pfgkavnytc
901 dphpdrgtsf dligestirc tsdpqngvw sspaprcgil ghcqapdhfl faklktqtna
961 sdfpigtslk yecrpeyygr pfsitclndl vwsspkdvck rkscktpdp vngmvhvitd
1021 iqvgsrinys cttghrligh ssaecilsgn tahwstkppi cqripcglpp tiangdfist
1081 nrenfhygsv vtyrcnlgsr grkvfelvge psiyctsndd qvgiwsppap qciipnkctp
1141 pnvengilvs dnrsflsne vvefrcqpgf vmkgprrvkc qalnkwepel pscsrvcqpp
1201 peilhgehtp shqdnfsgg evfyscepgy dlrgaaslhc tpqgdwspea prcavksdcd
1261 flgqlphgrv lfplnlqlga kvsfvcdegf rlgkssvshc vlvgmrsln nsvpvcehif
1321 cpnpailng rhtgtpsgdi pygkeisytc dphpdrgmtf nligestirc tsdphngvw
1381 sspaprcels vraghcktp qfpfasptip indfefpvg t slnyecrpgy fgkmsfisc
1441 enlvwssved ncrkscgpp pepfngmvhi ntdtqfgstv nyscnegfrl igspsttclv
1501 sgnnvtwddk apiceisce ppptisngdf ysnrntsfhn gtvvtyqcht gpdgeqlfel
1561 vgersiycts kddqvgwss ppprcistnk ctapevenai rvpgnrsfft lteiirfrcq
1621 pgfvmvgsht vqcqtngrwg pklphcsrvc qpppeilhge htshqdnfs pgqevfysce
1681 psydlrgaas lhctpqgdws peaprctvks cddflgqlph grvllplnlq lgakvsfvcd
1741 egfrlkgrsa shcvlagmka lwnssvpvce qifcpnppai lngrrhtgtpf gdipygkeis
1801 yacdhpdrg mtfnligess irctsdpggn gwsspaprc elsvpaacph ppkiqnghyi
1861 gghvslylpg mtisyicdpg yllvgkfif ctdqgiwsql dhyckevncs fplfmngisk
1921 elemkkvyhy gdyvtlkced gytlegspws qcqaddrwdp plaktsrth dalivgtlsg
1981 tiffilliif lswiilkhrk gnnahenpke vaihlhsqgg ssvhprtlqt neensrvlp

(Seq. ID No. 2)

4C. Isoforma X1 de CR1 predicha, *Homo sapiens*, secuencia de referencia de NCBI n.º XP_005273121.1

ES 2 865 825 T3

1 mclgrmgass prspepvqpp apglpfccgg sllavvlla lpwawqcna pewlpfarpt
61 nltdefefpi gtylnyecrp gysgrpfsii clknsvwtga kdrckrkskr nppdpvngmv
121 hvikgiqfqs qikysctkgy rligsssatc iisgdtviwd netpicdrip cglpptitng
181 dfistnrenf hygsvvtyrc npgsggrkvf elvgepsiyc tsnddqvgiw sgpapqciip
241 nkctppnven gilvsdnrsl fslnevvefr cqpgfvmkqp rrvkcqalnk wepelpscsr
301 vcqpppdvlh aertqrkdnd fspgqevfys cepgydlrga asmrctpqgd wspaaptcev
361 kscddfmqql lngrvlfpvn lqlgakvdfv cdegfqlkgs sasycvlagm eslwnssvpv
421 ceqifcpspp vipngrhtgk plevfpfgkt vnytcdphpd rgtsfdlige stirctsdpq
481 gngvwsspap rcgilghcqa pdhflfaklk tqtnasdfpi gtslkyecrp eyygrpfsit
541 clndlwwssp kdvcckrksck tppdpvngmv hvitdiqvg rinycttgh rlighssaec
601 ilsgnaahws tkppicqrip cglpptiang dfistnrenf hygsvvtyrc npgsggrkvf
661 elvgepsiyc tsnddqvgiw sgpapqciip nkctppnven gilvsdnrsl fslnevvefr
721 cqpgfvmkqp rrvkcqalnk wepelpscsr vcqpppdvlh aertqrkdnd fspgqevfys
781 cepgydlrga asmrctpqgd wspaaptcev kscddfmqql lngrvlfpvn lqlgakvdfv
841 cdegfqlkgs sasycvlagm eslwnssvpv ceqifcpspp vipngrhtgk plevfpfgkt
901 vnytcdphpd rgtsfdlige stirctsdpq gngvwsspap rcgilghcqa pdhflfaklk
961 tqtnasdfpi gtslkyecrp eyygrpfsit clndlwwssp kdvcckrksck tppdpvngmv
1021 hvitdiqvg rinycttgh rlighssaec ilsgnaahws tkppicqlcq pppdvlhaer
1081 tqrkdndfsp qevfyscep gydlrgaasm rctpqgdwsp aaptcevksc ddfmqllng
1141 rvlfpvnlql gakvdfvcde gfqlkgssas ycvlagmesl wnssvpvceq ifcpsppvip
1201 ngrhtgkple vfpfgkavny tcdphdrgt sfdligesti rctsdpqngg vwsspaprcg
1261 ilghcqaqdh flfaklktqt nasdfpigts lkyecrpeyy grpfsitcld nlwsspdkv
1321 ckrkscktpdpvngmvhvi tdiqvgsrin yscttghrli ghssaecils gntahwstkp
1381 picqripqgl pptiangdftnrenfhyy svvtyrcnlgsrgkrkfelv gepsyctsn
1441 ddqvgiwsqp apqciipnkc tppnvengil vsdnrslfsl nevvefrqcp gfvmkqprrv
1501 kcqalnkwep elpscscrvcq ppeilhgeh tpshqdnfsp qevfyscep gydlrgaasl
1561 hctpqgdwsp eaprcavksc ddfqlgplhg rvlfpvnlql gakvsfvde gfrlkgssvs
1621 hcvlvgmrslnwnssvpvceh ifcpnppail ngrhtgtpsg dipygkeisy tcdphdrgm
1681 tfnligesti rctsdphgng vwsspaprce lsvraghckt peqfpfaspt ipindfefpv
1741 gtslkyecrp gyfgkmfss clenlvwssv edncrrkscg ppepfngmv hintdtqfqs
1801 tvnyscnegf rligspsttc lvsgnntwd kkapiceis cepptisng dfysnrtsf
1861 hngtvvtyqc htgpdgeqlf elvgersiyc tskdqvgvw sspprcist nkctapeven
1921 airvpgnrsf ftlteirfr cqpgfvmvgs htvcqtngr wgpklpchsr vcqpppeilh
1981 gehtlshqdn fspgqevfys cepsydlrga aslhctpqgd wspeaprctv kscddflgql
2041 phgrvllpln lqlgakvsfv cdegfrlkgr sashcvlagm kalwnssvpv ceqifcpnpp
2101 ailngrhtgt pfgdipygke isyacdthpd rgmtfnlige ssirctsdpq gngvwsspap
2161 rcelsvpaac phppkiqng yigghvslyl pgmtisyid pgyllvgkgf ifctdqgiws
2221 qldhyckevn csfplfmngi skelemkkvy hygdvltkc edgytlegsp wsqcqaddrw
2281 dpplaktsr thdalivgtl sgtiffilli iflswiilkh rkgnnahenp kevaihhsq
2341 ggssvhprt1 qtneensrvl p (Seq. ID No. 3)

| Tabla 4. Dianas | | | |
|---|----------------------------------|--|------------------------------------|
| Clases generales de dianas | | | |
| Microbios | Polipéptidos | ADN | Aminoácidos |
| Hongos | Toxinas | ARN | Priones |
| Bacterias | Lípidos | Parásitos | Citocinas |
| Virus | Células | Residuos celulares | Moléculas asociadas al complemento |
| Dianas relacionadas con el complemento | | | |
| Inmunocomplejos | C3dg | C4a | C6 |
| Factor B | C3dk | C4b | C7 |
| Factor D | C3e | C2 | C8 |
| Properdina | Bb | C4bp | C9 |
| C3 | complejo de ataque a la membrana | Lectina de unión a manosa (MBL) | |
| C3a | C1q | Serina proteasa 1 asociada a MBL (MASP1) | |
| C3b | C1r | Serina proteasa 2 asociada a MBL (MASP2) | |
| iC3b | C1s | C5 | |
| C3c | C4 | C5a | |
| Dianas relacionadas con enfermedades infecciosas | | | |
| Lipopolisacáridos | Proteína de invasión celular | Intermedilisisina | Proteína efectora secretada sptP |
| Toxina de zona de oclusión | Enterotoxina del cólera | Proteína de invasión sipA | Seeligeriolisisina |
| Proteína de polimerización de actina RickA | Cisteína proteasa | Componente Ia de la toxina iota | Serina proteasa |
| Proteína de polimerización de actina RickA | Toxina de distensión citoletal | Ivanolisina | Toxina Shiga |
| Adenosina monofosfato-proteína transferasa vopS | Citolisisina | LepB | Esfingomielinas |
| adenilato ciclasa | Factor necrosante citotóxico | Factor letal | Estafilocinas |
| Adenilato ciclasa ExoY | Citotoxina | Leucotoxina | Estreptocinas |
| Componente enzimático de ADP-ribosiltransferasa | Toxina dermonecrotica | Listeriolisisina | Estreptolisina |
| Aerolisina | Desubiquitinasa | Colagenasa microbiana | Estreptopaína |

(continuación)

| Dianas relacionadas con enfermedades infecciosas | | | |
|---|---|---|--------------------------------------|
| Alfa-toxina | Toxina diftérica | Autotransportador de proteína de la membrana externa lcsA | Suilisina |
| Alveolisina | Enterohemolisina | Leucocidina de Panton-Valentine F | Superantígeno |
| Alveolisina | Enterotoxina | Perfringolisina | Efactor EspF secretado por T3SS |
| Antrolisina 0 | Inhibidor de la diferenciación de células epidérmicas | Toxina pertúsica | Toxina tetánica |
| Proteína activadora del complejo Arp2/3 rickA | Exoenzima | Fosfolipasa | Tir |
| Toxina CDT de ADP-ribosiltransferasa binaria | Exotoxina | Activador de plasminógeno | ToIC |
| Neurotoxina botulínica | Factor de intercambio de nucleótidos G | Neumolisina | Toxina del síndrome de choque tóxico |
| Toxina C2, componente II | Factor de intercambio de nucleótidos de guanina sopE | Antígeno protector | Zink-carboxipeptidasa |
| CagA | Enterotoxina termoestable | Proteína cinasa | Zink-carboxipeptidasa |
| Adenilato ciclasa sensible a la calmodulina | Autotransportador de serina endopeptidasa específico de IgA | Piolisina | Peptidasa dependiente de Zn |
| Factor inhibidor del ciclo celular | Inositol fosfato fosfatasa sopB | Toxina RTX | |
| Otras dianas moleculares | | | |
| G-CSF | IL3 | IL10 | MIP1a |
| GM-CSF | IL4 | IL12 | MIP1b |
| M-CSF | IL5 | IFNa | TGFb |
| IL1a | IL6 | IFNb | TNFa |
| IL1b | IL7 | IFNg | TNFb |
| IL2 | IL8 | Autoanticuerpos | Anticuerpos no propios |
| PRP | PRPc | PRPsc | PRPres |
| Dianas lipídicas y celulares | | | |
| Células tumorales circulantes | lípidos de muy baja densidad (VLDL) | triglicéridos | Ácidos grasos |
| Metástasis | lipoproteína de alta densidad | quilomicrones | Colesterol |
| Células eucariotas | lipoproteínas de baja densidad | apolipoproteínas | |

| Tabla 5. Enfermedades y afecciones | | | |
|---|--|--|---|
| Cánceres | | | |
| Leucemia linfoblástica aguda (LLA) | Cáncer colorrectal | Macroglobulinemia, Waldenstrom | Blastoma pleuropulmonar, Infancia |
| Leucemia mieloide aguda (LMA) | Craneofaringioma, Infancia | Cáncer de mama masculino | Embarazo y cáncer de mama |
| Carcinoma adrenocortical | Linfoma cutáneo de linfocitos T | Histiocitoma fibroso maligno de hueso y osteosarcoma | Linfoma primario del sistema nervioso central (SNC) |
| Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA | Carcinoma ductal localizado (DCIS) | Melanoma | Cáncer de próstata |
| Linfoma relacionado con el SIDA | Tumores embrionarios, Infancia | Carcinoma de células de Merkel | Cánceres raros |
| Cáncer de ano | Cáncer de endometrio | Mesotelioma | Cáncer rectal |
| Cáncer de apéndice | Ependimoma, Infancia | Cáncer escamoso metastásico de cuello con origen primario oculto | Carcinoma de células renales |
| Astrocitomas, Infancia | Cáncer epitelial | Carcinoma del tracto de la línea media que implica el gen de NUT | Pelvis renal y uréter, Cáncer de células transicionales |
| Tumor teratoideo/rabdoide atípico, Infancia | Cáncer de esófago | Embarazo molar | Retinoblastoma |
| Carcinoma de células basales | Estesioneuroblastoma, Infancia | Cáncer de boca y orofaringe | Rabdomiosarcoma |
| Cáncer de las vías biliares | Sarcoma de Ewing | Síndromes de neoplasias endocrinas múltiples, Infancia | Cáncer de glándula salival |
| Cáncer de vejiga | Tumor extragonadal de células germinales | Mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas | Sarcoma |
| Cáncer de hueso | Cáncer extrahepático de las vías biliares | Micosis fungoide | Cánceres secundarios |
| Cáncer de intestino | Cáncer de ojo | Síndromes mielodisplásicos | Síndrome de Sezary |
| Glioma del tronco encefálico, Infancia | Cáncer de vesícula biliar | Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas | Cáncer de piel |
| Tumores cerebrales | Cáncer gástrico | Trastornos mieloproliferativos, Crónicos | Cáncer de piel (distinto de melanoma) |
| Cáncer de mama | Tumor carcinoide gastrointestinal | Cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal | Cáncer de pulmón microcítico |
| Tumores bronquiales, Infancia | Tumor de células germinales | Cáncer de nasofaringe | Cáncer de intestino delgado |
| Linfoma de Burkitt | Tumores trofoblásticos gestacionales (GTT) | Neuroblastoma | Sarcoma de tejido blando |

(continuación)

| Tabla 5. Enfermedades y afecciones | | | |
|---|---|--|--|
| Cánceres | | | |
| Cáncer de origen primario desconocido | Glioma | Linfoma no hodgkiniano | Carcinoma de células escamosas |
| Cáncer extendido a los huesos | Tricoleucemia | Cáncer de pulmón no microcítico | Cáncer escamoso de cuello con origen primario oculto, Metastásico |
| Cáncer extendido al cerebro | Cáncer de cabeza y cuello | Cáncer de esófago | Cáncer de estómago (gástrico) |
| Cáncer extendido al hígado | Cáncer de corazón, Infancia | Cáncer oral | Cáncer de estómago |
| Cáncer extendido al pulmón | Cáncer hepatocelular (hígado) | Cáncer de la cavidad oral | Linfoma de linfocitos T, Cutáneo - véase micosis fungoide y síndrome de Sezary |
| Tumor carcinoide | Histiocitosis, Células de Langerhans | Cáncer de orofaringe | Cáncer de testículo |
| Carcinoma de origen primario desconocido | Linfoma de Hodgkin | Osteosarcoma (cáncer de hueso) | Cáncer de garganta |
| Tumores cardíacos (corazón), Infancia | Cáncer hipofaríngeo | Osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno | Timoma y carcinoma tímico |
| Tumor teratoide/rabdoide atípico del sistema nervioso central, Infancia | Melanoma intraocular | Cáncer de ovario | Cáncer de tiroides |
| Tumores embrionarios del sistema nervioso central, Infancia | Tumores de células de los islotes, tumores pancreáticos neuroendocrinos | Cáncer de páncreas | Cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter |
| Sistema nervioso central, Infancia | Cáncer de riñón | Tumores neuroendocrinos pancreáticos (tumores de células de los islotes) | Cáncer primario desconocido |
| Cáncer de cuello uterino | Histiocitosis de células de Langerhans | Papilomatosis, Infancia | Uréter y pelvis renal, Cáncer de células transicionales |
| Cordoma, Infancia | Cáncer de laringe | Paraganglioma | Cáncer de uretra |
| Coriocarcinoma | Leucemia | Cáncer paratiroideo | Cáncer de útero, Endometrial |
| Leucemia linfocítica crónica (LLC) | Cáncer de labio y cavidad oral | Cáncer de pene | Sarcoma uterino |
| Leucemia mieloide crónica (LMC) | Cáncer de hígado | Cáncer de faringe | Cáncer vaginal |
| Trastornos mieloproliferativos crónicos | Carcinoma lobulillar localizado (LCIS) | Feocromocitoma | Cáncer de vulva |
| Cáncer de colon | Tumor de bajo potencial maligno | Tumor de la hipófisis | Macroglobulinemia de Waldenstrom |

(continuación)

| Tabla 5. Enfermedades y afecciones | | | |
|---|--|---|---|
| Cánceres | | | |
| Linfoma | Cáncer de pulmón | Neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple | Tumor de Wilms |
| Enfermedades relacionadas con el complemento y los inmunocomplejos | | | |
| Degeneración macular asociada a la edad | Vasculitis asociada a ANCA (incluye pauciinmunitaria) | Glomerulonefritis - cabello escaso - telangiectasia | Enfermedad asociada a MYH9 |
| Síndrome urémico hemolítico atípico | Enfermedad antimembrana basal glomerular (de Goodpasture) | Síndrome de Goodpasture | Síndrome onicorrotuliano |
| Anemia hemolítica autoinmunitaria | Reacción de Arthus | Granulomatosis con poliangeítis (ANCA y Wegener) | Enfermedad renal similar a onicorrotuliano |
| Deficiencia de inhibidor de C1 | Asma | Síndrome de Guillain-Barre | Nefritis |
| Deficiencia de C1q | Síndrome urémico hemolítico atípico | Angioedema hemolítico (AEH) | Enfermedad por depósito de inmunoglobulina monoclonal no amiloide |
| Deficiencia de C1r | Enfermedad autoinmunitaria del oído interno (EAOI) Hipoacusia neurosensorial | Púrpura de Henoch-Schonlein | Glomerulonefritis pauciinmunitaria |
| Deficiencia de C1s | Uveítis autoinmunitaria | HIVICK | Lupus eritematoso sistémico pediátrico |
| Deficiencia de C2 | Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth intermedia autosómica dominante de tipo E | Vasculitis por hipersensibilidad | Síndrome de Pierson |
| Deficiencia de C3 | Enfermedad de Behçet | Vasculitis urticarial hipocomplementémica | Poliarteritis |
| Deficiencia de C4 | Nefropatía de Berger (IgA) | Glomerulonefritis membranosa idiopática | poliarteritis nodosa |
| Deficiencia de C5 | Enfermedad de Buerger | Síndrome nefrótico idiopático | Polimialgia reumática |
| Deficiencia de C6 | Vasculitis del sistema nervioso central | Nefropatía por IgA (enfermedad de Berger) | Polimiositis |
| Deficiencia de C7 | Coroiditis | Nefropatía/vasculitis por IgA (púrpura de Henoch-Schonlein) | Polimiositis/dermatomiositis |
| Deficiencia de C8 | Polineuropatía desmielinizante crónica (CIDP) | Trombocitopenia inmunitaria | Glomerulonefritis postestafilocócica |
| Deficiencia de C9 | Síndrome de Churg-Strauss | Enfermedades inmunoampollosas | Glomerulonefritis postestreptocócica |

(continuación)

| Enfermedades relacionadas con el complemento y los inmunocomplejos | | | |
|---|--|---|--|
| Deficiencia de CD55 | Síndrome de Cogan | Glomerulopatía inmunotactoide o fibrilar | Glomerulonefritis membranoproliferativa primaria |
| Deficiencia de CD59 | Glomerulopatía por colágeno de tipo III | Glomerulonefritis asociada a infecciones | Glomerulonefritis rápidamente progresiva (semilunar) |
| Deficiencia del factor I del complemento | Síndrome nefrótico congénito e infantil | Miopatías inflamatorias | Glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP) |
| Deficiencia de proteína 1 asociada al factor del complemento H (CFHR1) | Nefropatía membranosa congénita debida a aloinmunización materna anti-endopeptidasa neutra | Dermatomiositis juvenil | Síndrome de Rasmussen |
| Deficiencia de proteína 3 asociada al factor del complemento H (CFHR3) | Crioglobulinemia/enfermedad por crioaglutinina | Polimiositis juvenil | Artritis reactiva |
| Deficiencia de CR3/CR4 (deficiencia de adhesión de leucocitos 1) | Vasculitis crioglobulinémica | Enfermedad de Kawasaki | Policondritis recidivante |
| Deficiencia de factor B | Vasculitis cutánea | Glomerulopatía por lipoproteínas | Amiloidosis renal |
| Deficiencia de factor D | Miopatías desmielinizantes (asociadas a paraproteínas) | Nefritis lúpica | Síndrome de Reynolds |
| Deficiencia de factor H | Síndrome de Denys-Drash | Nefropatía por lupus | Artritis reumatoide |
| Deficiencia de factor I | Dermatomiositis | Anomalía de May Hegglin | Sarcoidosis (enfermedad de Nesnier Boeck Schuamann) |
| Deficiencia de ficolina 3 | Dermatomiositis | Nefritis membranoglomerular | Displasia inmunoósea de Schimke |
| Deficiencia de MASP2 | Nefropatía diabética | Glomerulonefritis membranoproliferativa | Esclerodermia |
| Deficiencia de MBL | Vasculitis por inmunocomplejos farmacógena | Glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo I (GNMP de tipo I) | Síndrome de Sebastian |
| Esteatohepatitis no alcohólica | Granulomatosis eosinofílica con poliangeítis (Churgg-Strauss) | Glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II (enfermedad por depósitos densos, GNMP de tipo II) | Amiloidosis secundaria |
| Hemoglobinuria paroxística nocturna | Síndrome de Epstein | Glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo III (GNMP de tipo III) | Colitis por C dif grave o recurrente |
| Deficiencia de properdina | Crioglobulinemia mixta esencial | Glomerulonefritis membranosa | Síndrome de Sjogren |

(continuación)

| Enfermedades relacionadas con el complemento y los inmunocomplejos | | | |
|--|--|---|---|
| Mioclono por acción - síndrome de insuficiencia renal | Fiebre mediterránea familiar | Enfermedad de Ménière | Septicemia estafilocócica o estreptocócica |
| Síndrome de enfermedad respiratoria aguda (SDRA)/síndrome respiratorio agudo grave (SRAG) | Amiloidosis renal familiar | Poliangitis microscópica | Síndrome de la persona rígida |
| Enfermedad del suero aguda | Síndrome nefrótico familiar resistente a los esteroides con sordera neurosensorial | Enfermedad de cambios mínimos | Lupus eritematoso sistémico |
| Enfermedad de Still del adulto | Pulmón del granjero | Enfermedad mixta del tejido conectivo | Esclerosis generalizada |
| Degeneración macular asociada a la edad | Síndrome de Fechtner | Vasculitis principalmente de vasos grandes | Arteritis de Takayasu |
| Amiloidosis AL | Glomerulopatía por fibronectina | Vasculitis principalmente de vasos medianos | Necrólisis epidérmica tóxica (síndrome de Stevens Johnson) |
| Síndrome de Alport | Alveolitis fibrosante | Vasculitis principalmente de vasos pequeños | Trasplante/reperfusión (órgano sólido) |
| Enfermedad de Alzheimer | Glomerular segmentario focal | Síndrome de Muckle- Wells | Vasculitis |
| Amiloidosis (AL, AA, MIDD, Otro) | Glomeruloesclerosis segmentaria focal | Miastenia grave | Granulomatosis de Wegener |
| Arteritis gigantocelular | Síndrome de Frasier | Síndrome de Galloway-Mowat | |
| | | | |
| Diabetes de tipo 1 | Miastenia grave | Enfermedad de Graves | Anemia perniciosa |
| Enfermedad de Crohn | alopecia areata | púrpura trombocitopénica | Cirrosis biliar primaria |
| Colitis ulcerosa | hepatitis autoinmunitaria | Síndrome de Guillain- Barre | Psoriasis |
| Síndrome del intestino inflamatorio | dermatomiositis autoinmunitaria | Miocarditis autoinmunitaria | Artritis reumatoide |
| Esclerosis múltiple | Artritis idiopática juvenil | Pénfigo autoinmunitario | Vitíligo |
| Deficiencias enzimáticas y enfermedades vasculares | | | |
| Deficiencia de 2,4- dienoil-CoA reductasa | Enfermedad de Fabry (1:80 000 a 1:117 000) | Isobutiril-CoA deshidrogenasa | Neuropatía periférica |
| Aciduria 2-metil-3- hidroxi butírica | Hipercolesterolemia familiar (1:500) | Acidemia isovalérica | Trastornos peroxisómicos (1:50 000; p. ej., síndrome de Zellweger, adrenoleucodistrofia neonatal, enfermedad de Refsum) |

(continuación)

| Deficiencias enzimáticas y enfermedades vasculares | | | |
|---|---|--|--|
| 2-metilbutiril-CoA deshidrogenasa | Infarto de miocardio familiar/ictus | Deficiencia de lactasa (común) | Fenilcetonuria |
| Aciduria por 3-hidroxi-3-metilglutarilo (HMG) | Trastornos de la oxidación de ácidos grasos (1:10 000) | Síndrome de Lesch-Nyhan | Hiperoxaluria primaria |
| Aciduria 3-metilglutacónica | Deficiencia de galactocinasa | Deficiencia de lipoproteína lipasa (rara) | Acidemia propiónica |
| Deficiencia de 3-oxotiolasa (1:100 000) | Galactosa epimerasa | l-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga | Vómito recurrente |
| Aciduria 4-hidroxibutírica | Galactosemia | Intolerancia a la proteína lisinúrica (rara) | Acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta |
| Deficiencia de 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (común) | Galactosemia (1:40 000) | Intolerancia a la proteína lisinúrica (rara) | Deficiencia de sacarasa-isomaltasa (rara) |
| 5-oxoprolinuria (aciduria piroglutámica) | Enfermedad de Gaucher | Acidemia malónica | Síntomas de la pancreatitis |
| Abetalipoproteinemia (rara) | Acidemia glutárica de tipo I | Cetoaciduria de cadena ramificada | Galactosemia deficiente en transferasa (galactosemia de tipo 1) |
| Porfiria aguda intermitente | Acidemia glutárica de tipo II | Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media | Deficiencia de proteína trifuncional |
| Alcaptonuria | Deficiencia de glutatión sintetasa con 5-oxoprolinuria | L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena media/corta | Tirosinemia de tipo 1 |
| Argininemia | Deficiencia de glutatión sintetasa sin 5-oxoprolinuria | Cetoacil-coA tiolasa de cadena media | Tirosinemia de tipo 2 |
| aciduria de argininosuccinato | Trastornos de la glucogenólisis (1:20 000) | Leucodistrofia metacromática (1:100 000) | Tirosinemia de tipo 3 |
| Hiperfenilalaninemia benigna | Glucogenosis, de tipo I (1:70 000) | Leucodistrofia metacromática (1:100 000) | Síndrome de Parinaud |
| deficiencia de beta cetotiolasa | Anemia hemolítica por deficiencia de adenilato cinasa | Acidemia metilmalónica (Cbl C) | Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga |
| Defectos de la biosíntesis del cofactor de bipterina | Anemia hemolítica por deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa | Acidemia metilmalónica (Cbl D) | Enfermedad de Wilson |
| Defectos de regeneración del cofactor de bipterina | Anemia hemolítica por deficiencia de difosfoglicerato mutasa | Acidemia metilmalónica (que no responde a la vitamina B12) | Síndrome de Aicardi-Goutières (puede ser una forma alélica de CLE) |

(continuación)

| Deficiencias enzimáticas y enfermedades vasculares | | | |
|---|---|--|--|
| Deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa que no responde a la biotina | Anemia hemolítica por sobreproducción de adenosina desaminasa en eritrocitos | Acidemia metilmalónica sin homocistinuria | Lupus eritematoso cutáneo |
| Carbamoil fosfato sintetasa | Anemia hemolítica por deficiencia de glucofosfato isomerasa | Aciduria metilmalónica y homocistinuria | Dermatitis herpetiforme |
| Carnitina acilcarnitina translocasa | Anemia hemolítica por deficiencia de glutatión reductasa | Trastornos mitocondriales (1:30 000) | hemofilia A |
| Carnitina palmitoiltransferasa I | Anemia hemolítica por deficiencia de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa | Trastornos mitocondriales (1:30 000; p. ej., deficiencia de citocromo-c oxidasa; síndrome de MELAS; síndrome de Pearson [todos raros]) | hemofilia B |
| Carnitina palmitoiltransferasa II | Anemia hemolítica por deficiencia de pirimidina 5' nucleotidasa | Trastornos mitocondriales (1:30 000; p. ej., enfermedad de Leigh, síndrome de Kearns-Sayre [raro]) | Síndrome nefrótico idiopático sensible a los esteroides (igual que la glomeruloesclerosis focal segmentaria) |
| Defecto de la captación de carnitina | Anemia hemolítica por deficiencia de piruvato cinasa de glóbulos rojos | Trastornos mitocondriales (1:30 000; p. ej., deficiencia de lipoamida deshidrogenasa [rara]) | Púrpura trombocitopénica inmunitaria |
| citruinemia de tipo I | Síndrome de HHH (raro) | Trastornos mitocondriales (1:30 000; p. ej., síndrome de Pearson [raro]) | Miastenia grave |
| Citruinemia de tipo II | homocisteinuria | Carboxilasa múltiple (holocarboxilasa sintetasa) | Artritis juvenil oligoarticular |
| Trastornos congénitos de la glucosilación (raro) | Homocistinuria (1:200 000) | Deficiencia múltiple de carboxilasa (p. ej., holocarboxilasa sintetasa [rara]) y deficiencias de biotinidasa (1:60 000) | Esclerodermia |
| Aciduria D-2-hidroxi-glutárica | hiperamonemia/ornitinemia/citruinemia (defecto del transportador de ornitina) | Calambres musculares/espasticidad | Urticaria solar (tal vez eritema por protoporfiria) |
| Aciduria D-2-hidroxi-glutárica (rara) | Hiperlipoproteinemia, de tipos I y IV (rara) | Deficiencia de mioadenilato desaminasa (1:100 000) | Púrpura trombocitopénica trombótica |
| Deficiencia de enteropeptidasa (rara) | Hipermetioninemia por deficiencia de glicina N-metiltransferasa | Enfermedad de Niemann-Pick, de tipo C (rara) | Nefritis tubulointersticial con uveítis/ATIN |

(continuación)

| Deficiencias enzimáticas y enfermedades vasculares | | | |
|---|--|---|---|
| Encefalopatía etilmalónica | Encefalopatía de hipermetioninemia por deficiencia de adenosina cinasa | Hiperglicinemia no cetósica | Enfermedad de von Willebrand |
| | Hiperprolinemia | | |
| Enfermedades y agentes infecciosos | | | |
| <i>Acinetobacter</i> | Fiebre hemorrágica del dengue | Vasculitis por inmunocomplejos inducida por infección | Septicemia |
| Infección por <i>Arcobacter butzleri</i> - infección sanguínea | Infección diseminada con el complejo de <i>Mycobacterium avium</i> - infección sanguínea | <i>Klebsiella</i> | <i>Serratia</i> |
| Infección por <i>Arcobacter cryaerophilus</i> - infección sanguínea | <i>E. coli</i> | Lepra/enfermedad de Hansen | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Infección por <i>Arcobacter</i> - infección sanguínea | <i>Enterobacter</i> | Paludismo | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> - infección sanguínea |
| Bacteriemia | Enterococo | Meningococo | Enfermedad invasiva por estreptococos del grupo A - infección sanguínea |
| Endocarditis bacteriana | Muermo - infección sanguínea | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| Infección por <i>Campylobacter fetus</i> - infección sanguínea | Gonorrea | <i>Pseudomonas</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| Infección por <i>Campylobacter jejuni</i> - infección sanguínea | Hepatitis | <i>Rhodococcus equi</i> - infección sanguínea | Tripanosomiasis |
| <i>Candida</i> | Virus de la inmunodeficiencia humana | <i>Salmonella</i> | Fiebre amarilla |
| <i>Staphylococcus</i> negativo para coagulasa | | | |

| Tabla 6. Antígenos exógenos | | | |
|---|----------------------------------|--|--|
| Clases generales de antígenos exógenos | | | |
| Proteínas de repetición de anquirina | | Fibronectinas | Liasas |
| Anticuerpos | Receptores del complemento | Polipéptidos ligados a GPI | Nanocuerpos |
| Aptámeros | Péptidos cíclicos | Proteínas repetidas HEAT | Ácidos nucleicos |
| Proteínas repetidas ARM | DARPinas | Hidrolasas | Polipéptidos |
| Hidratos de carbono | DNasas | Cinasas | Fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) |
| Receptores de superficie celular | Enzimas | Lipoproteínas | Proteínas repetidas tetratricopeptídicas |
| Antígenos exógenos relacionados con el complemento | | | |
| Inhibidor de C1 | Proteína de unión a C4 | CR3 | Factor I |
| Receptor de cadena Beta C3 | CD59 | CR4 | Factor de restricción homólogo |
| C3aR | CR1 | Factor acelerador de la descomposición (FAD) | Proteína cofactor de membrana (PCM) |
| C3eR | CR2 | Factor H | PRELP |
| Enzimas | | | |
| triacilglicerol lipasa | ácido biliar-CoA hidrolasa | ferulil esterasa | fosfatidato fosfatasa |
| (S)-metilmalonil-CoA hidrolasa | bis(2-etilhexil)ftalato esterasa | formil-CoA hidrolasa | fosfatidilglicerofosfatasa |
| [proteína transportadora de acilo] fosfodiesterasa | bisfosfoglicerato fosfatasa | fructosa-bisfosfatasa | fosfatidilinositol desacilasa |
| [fosforilasa] fosfatasa | Éster carboxílico hidrolasas | fumarilacetoacetasa | fosfodiesterasa I |
| 1,4-lactonasa | carboximetilnbutenolidasa | fusarinina-C ornitinesterasa | fosfoglicerato fosfatasa |
| 11-cis-retinil-palmitato hidrolasa | celulosa-polisulfatasa | galactolipasa | fosfoglicolato fosfatasa |
| 1-alkil-2-acetilglicerofosocolina esterasa | cefalosporina-C desacetilasa | gluconolactonasa | fosfoinositido fosfolipasa C |
| 2'-hidroxibifenil-2-sulfonato desulfinaasa | cerebrósido-sulfatasa | glucosa-1-fosfatasa | fosfolipasa A1 |

(continuación)

| Enzimas | | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---|--|
| 2-pirona-4,6-dicarboxilato lactonasa | cetaxato bencilsterasa | glucosa-6-fosfatasa | fosfolipasa A2 |
| 3', 5'-bisfosfato nucleotidasa | clorogenato hidrolasa | glutatión trolesterasa | fosfolipasa C |
| 3-hidroxiisobutilil-CoA hidrolasa | clorofilasa | glicerol-1-fosfatasa | fosfolipasa D |
| 3'-nucleotidasa | colinesterasa | glicerol-2-fosfatasa | fosfonoacetaldéhidó hidrolasa |
| 3-oxoadipato enol-lactonasa | colina-sulfatasa | glicerofosocolina fosfodiesterasa | fosfonoacetato hidrolasa |
| 3-fitasa | coloil-CoA hidrolasa | Glucosidasas, es decir, enzimas que hidrolizan compuestos de O- y S-glucosilo | fosfonopiruvato hidrolasa |
| 4-hidroxibenzoil-CoA tioesterasa | condro-4-sulfatasa | glucosulfatasa | fosfoproteína fosfatasa |
| 4-metiloxaloacetato esterasa | condro-6-sulfatasa | Glucosilasas | Diéster fosfórico hidrolasas |
| 4-fitasa | citrato-liasa desacetilasa | histidinol-fosfatasa | Monoéster fosfórico hidrolasas |
| 4-piridoxolactonasa | cocaína esterasa | lipasa sensible a hormonas | Triéster-fosfórico hidrolasas |
| 5'-nucleotidasa | cutinasa | Compuestos de N-glicosilo hidrolizantes | fosfoserina fosfatasa |
| 6-acetilglucosa desacetilasa | ciclamaro sulfohidrolasa | Compuestos de S-glucosilo hidrolizantes | poli(3-hidroxiubitrato) despolimerasa |
| 6-fosfogluconolactonasa | Cisteína endopeptidasas | hidroxiacilglutatión hidrolasa | poli(3-hidroxiocianoato)despolimerasa |
| a-aminoácido esterasa | Carboxipeptidasas de tipo cisteína | dímero de hidroxibutirato hidrolasa | polineuridina-aldehído esterasa |
| a-amino-acil-péptido hidrolasas | D-arabinolactonasa | hidroximetilglutaril-CoA hidrolasa | proteína-glutamato metilesterasa |
| acetoacetil-CoA hidrolasa | anillo A de desoxilimonato-lactonasa | iduronato-2-sulfatasa | N-acilhomoserina lactonasa de interrupción de cuórum |
| acetoxibutirilbifitófeno desacetilasa | dGTPasa | inositol-fosfato fosfatasa | palmitato de retinilo esterasa |

(continuación)

| Enzimas | | | |
|---|--|---|--|
| acetilajmalina esterasa | dihidrocumarina hidrolasa | hormona juvenil esterasa | Serina deshidratasa o serina hidroximetil transferasa |
| acetilalquilglicerol acetil hidrolasa | Dipeptidasas | quinureninasa | Serina endopeptidasas |
| acetilcolinesterasa | Dipéptido hidrolasas | L-arabinonolactonasa | fosfato de serina-etanolamina fosfodiesterasa |
| acetil-CoA hidrolasa | Dipeptidilpeptidasas y tripeptidilpeptidasas | anillo D de limonina-lactonasa | Carboxipeptidasas de tipo serina |
| acetil esterasa | Monoéster difosfórico hidrolasas | lipoproteína lipasa | S-formilglutación hidrolasa |
| piruvato de acetilo hidrolasa | disulfoglucosamina-6-sulfatasa | L-ramnono-1,4-lactonasa | siolato O-acetilesterasa |
| acetilsalicilato desacetilasa | dodecanoil-[proteína transportadora de acilo] hidrolasa | lisofosfolipasa | sinapina esterasa |
| acetilxilano esterasa | Endodesoxirribonucleasas que producen 3'-fosfomonoésteres | manitol-1-fosfatasa | Endodesoxirribonucleasas específicas de sitio: la escisión no es específica de secuencia |
| fosfatasa ácida | Endodesoxirribonucleasas que producen 5'-fosfomonoésteres | Metalo-carboxipeptidasas | Endodesoxirribonucleasas específicas de sitio que son específicas para bases alteradas. |
| Que actúan sobre anhídridos ácidos para catalizar el movimiento transmembrana de sustancias | Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido | Metaloendopeptidasas. | Endodesoxirribonucleasas específicas de sitio: la escisión es específica de secuencia |
| Que actúan sobre anhídridos ácidos para facilitar el movimiento celular y subcelular | Endorribonucleasas que producen 3'-fosfomonoésteres | metilfosfoglicerato fosfatasa | esfingomielina fosfodiesterasa |
| Que actúan sobre GTP para facilitar el movimiento celular y subcelular | Endorribonucleasas que producen 5'-fosfomonoésteres | acetato de metilumbeliferilo desacetilasa | S-succinilglutación hidrolasa |
| Que actúan sobre enlaces de fósforo-nitrógeno | Endorribonucleasas que están activas con ácidos ribo o desoxirribonucleicos y producen 3'-fosfomonoésteres | monoterpeno e-lactona hidrolasa | esteroide-lactonasa |
| Que actúan sobre enlaces de azufre-nitrógeno | Endorribonucleasas que están activas con ácidos ribo o desoxirribonucleicos y producen 5'-fosfomonoésteres | N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa | esterol esterasa |

(continuación)

| Enzimas | | | | |
|---|--|--|---------------------------------------|--|
| actinomicina lactonasa | Enzimas que actúan sobre anhídridos ácidos | N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa | esteril-sulfatasa | |
| acilcarnitina hidrolasa | Enzimas que actúan sobre enlaces carbono-carbono | N-acetilgalactosaminoglucano desacetilasa | succinil-CoA hidrolasa | |
| acil-CoA hidrolasa | Enzimas que actúan sobre enlaces de carbono-nitrógeno, distintos de enlaces peptídicos | N-acetilglucosamina-6-sulfatasa | sacarosa-fosfato fosfatasa | |
| acilglicerol lipasa | Enzimas que actúan sobre enlaces de carbono-fósforo | N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa | azúcar-fosfatasa | |
| aciloxiacilo hidrolasa | Enzimas que actúan sobre enlaces de carbono-azufre | oleoil-[proteína transportadora de acilo] hidrolasa | Éster sulfúrico hidrolasas | |
| acilpiruvato hidrolasa | Enzimas que actúan sobre enlaces de éter | Peptidasas omega | tanasa | |
| ADAMTS13 | Enzimas que actúan sobre enlaces de haluro | orselinato-dépsido hidrolasa | Tioéster hidrolasas | |
| Adenosina desaminasa | Enzimas que actúan sobre enlaces peptídicos (peptidasas) | oxaloacetasa | Tioéter y trialkilsulfonio hidrolasas | |
| adenilil-[glutamato-amoniaco] ligasa] hidrolasa | Enzimas que actúan sobre enlaces de fósforo-nitrógeno | palmitoil[proteína] hidrolasa | Treonina endopeptidasas | |
| Acil-CoA hidrolasa de cadena media dependiente de ADP | Enzimas que actúan sobre enlaces de azufre-nitrógeno | palmitoil-CoA hidrolasa | timidina fosforilasa | |
| Acil-CoA hidrolasa de cadena corta dependiente de ADP | Enzimas que actúan sobre enlaces de azufre-azufre | pectinesterasa | trehalosa-fosfatasa | |
| ADP-fosfoglicerato fosfatasa | Éter hidrolasas. | Peptidil péptido hidrolasas | triacetato-lactonasa | |
| fosfatasa alcalina | Exodesoxirribonucleasas que producen 5'-fosfomonoésteres | Peptidil-aminoácido hidrolasas | Monoéster trifosfórico hidrolasas | |
| todo-trans-retinil-palmitato hidrolasa | Exonucleasas que están activas con ácidos ribo o desoxirribonucleicos y producen 3'-fosfomonoésteres | Peptidil-aminoácido hidrolasas o acilaminoácido hidrolasas | tritonato hidrolasa | |
| aminoacil-ARNt hidrolasa | Exonucleasas que están activas con ácidos ribo o desoxirribonucleicos y producen 5'-fosfomonoésteres | Peptidil-dipeptidasas | tropinesterasa | |

(continuación)

| Enzimas | | | |
|---------------------------|---|-----------------------------|----------------------------|
| Aminopeptidasas | Exorribonucleasas que producen 3'-fosfomonoésteres | fenilacetil-CoA hidrolasa | ubiquitina tiolesterasa |
| arilesterasa | Exorribonucleasas que producen 5'-fosfomonoésteres. | Fenilalanina amoníaco liasa | UDP-sulfoquinovosa sintasa |
| arilsulfatasa | Factor IX | Fenilalanina hidroxilasa | uricasa |
| Asparaginasa | Factor VIII | feoforbidasa | uronolactonasa |
| Endopeptidasas aspárticas | éster etílico de acilo graso sintasa | floreína hidrolasa | éster ceroso hidrolasa |
| b-dicetona hidrolasa | | forbol-diéster hidrolasa | xilono-1,4-lactonasa |

| Tabla 7. Enfermedades seleccionadas, antígenos exógenos y dianas | | | |
|---|--|---|--|
| Categoría | Enfermedad | Antígeno exógeno | Diana |
| Amiloidosis | Amiloidosis AA | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína amiloide A sérica o el componente amiloide P sérico | Proteína amiloide A sérica y placas amiloides |
| Amiloidosis | amiloidosis de microglobulina beta2 | un agente de unión similar a un anticuerpo para la microglobulina beta-2 o el componente amiloide P sérico | Microglobulina beta2 o placas amiloides |
| Amiloidosis | Amiloidosis de cadena ligera | un agente de unión similar a un anticuerpo para la cadena ligera, componente amiloide P sérico | Cadena ligera de anticuerpo o placas amiloides |
| Aclaramiento celular | Cáncer | un agente de unión similar a un anticuerpo para CD44 | una célula tumoral circulante |
| Aclaramiento celular | Cáncer | un agente de unión similar a un anticuerpo para EpCAM | una célula tumoral circulante |
| Aclaramiento celular | Cáncer | un agente de unión similar a un anticuerpo para Her2 | una célula tumoral circulante |
| Aclaramiento celular | Cáncer | un agente de unión similar a un anticuerpo para EGFR | una célula tumoral circulante |
| Aclaramiento celular | Cáncer (linfocito B) | un agente de unión similar a un anticuerpo para CD20 | un linfocito B canceroso |
| Aclaramiento celular | Cáncer (linfocito B) | un agente de unión similar a un anticuerpo para CD19 | un linfocito B canceroso |
| Ab de aclaramiento | Síndrome antifosfolipídico | beta2-glicoproteína-1 | autoanticuerpo patógeno contra la beta2-glicoproteína-1 |
| Ab de aclaramiento | Síndrome antifosfolipídico catastrófico | beta2-glicoproteína-1 | autoanticuerpo patógeno contra la beta2-glicoproteína-1 |
| Ab de aclaramiento | Enfermedad por crioaglutininas | Antígeno I/i | Autoanticuerpo patógeno contra el antígeno I/i |
| Ab de aclaramiento | Síndrome de Goodpasture | Dominio a3 NC1 del colágeno (IV) | autoanticuerpo patógeno contra el dominio a3 NC1 del colágeno (IV) |
| Ab de aclaramiento | Púrpura trombocitopénica inmunitaria | Glicoproteínas plaquetarias (Ib-IX, IIb-IIIa, IV, Ia-IIa) | autoanticuerpo patógeno contra la glicoproteína plaquetaria |
| Ab de aclaramiento | Nefropatía membranosa | Receptor de fosfolipasa A2 | autoanticuerpo patógeno contra el receptor de fosfolipasa A2 |
| Ab de aclaramiento | Anemia hemolítica caliente por anticuerpos | Glucoforina A, glucoforina B y/o glucoforina C, Antígeno Rh | autoanticuerpo patógeno contra glucoforinas y/o antígeno Rh |
| Complemento | Degeneración macular asociada a la edad | una proteína reguladora del complemento adecuada | complemento activo |

(continuación)

| Tabla 7. Enfermedades seleccionadas, antígenos exógenos y dianas | | | |
|---|--|---|--|
| Categoría | Enfermedad | Antígeno exógeno | Diana |
| Complemento | Síndrome urémico hemolítico atípico | factor del complemento H o una proteína reguladora del complemento adecuada | complemento activo |
| Complemento | Anemia hemolítica autoinmunitaria | una molécula reguladora del complemento adecuada | complemento activo |
| Complemento | Deficiencia del factor I del complemento | Factor I del complemento, una proteína reguladora del complemento adecuada | complemento activo |
| Complemento | Esteatohepatitis no alcohólica | una molécula reguladora del complemento adecuada | complemento activo |
| Complemento | Hemoglobinuria paroxística nocturna | una proteína reguladora del complemento adecuada | complemento activo |
| Enzima | Deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa | 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa | 3-hidroxicarnitina, 3-metilcrotonilglicina (3-MCG) y ácido 3-hidroxiisovalérico (3-HIVA) |
| Enzima | Porfiria aguda intermitente | Porfobilinógeno desaminasa | Porfobilinógeno |
| Enzima | Leucemia linfoblástica aguda | Asparaginasa | Asparagina |
| Enzima | Leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda | Asparaginasa | Asparagina |
| Enzima | Leucemia mieloblástica aguda | Asparaginasa | Asparagina |
| Enzima | Deficiencia de adenina fosforribosiltransferasa | adenina fosforribosiltransferasa | Purina insoluble 2,8-dihidroxiadenina |
| Enzima | Deficiencia de adenosina desaminasa | Adenosina desaminasa | Adenosina |
| Enzima | Afibrinogenemia | FI | reemplazo enzimático |
| Enzima | Intoxicación alcohólica | Alcohol deshidrogenasa/oxidasa | Etanol |
| Enzima | Enfermedad de Alexander | FVIII | reemplazo enzimático |
| Enzima | Alcaptonuria | homogentisato oxidasa | homogentisato |
| Enzima | Argininemia | Amoníaco monooxigenasa | amoníaco |
| Enzima | aciduria de argininosuccinato | Amoníaco monooxigenasa | amoníaco |
| Enzima | citrulinemia de tipo I | Amoníaco monooxigenasa | amoníaco |
| Enzima | Citrulinemia de tipo II | Amoníaco monooxigenasa | amoníaco |
| Enzima | Deficiencia completa de LCAT, Enfermedad del ojo de pez, aterosclerosis, hipercolesterolemia | Lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) | Colesterol |
| Enzima | Intoxicación por cianuro | Tiosulfato-cianuro sulfurtransferasa | Cianuro |
| Enzima | Diabetes | Hexocinasa, glucocinasa | Glucosa |
| Enzima | Deficiencia del factor II | FII | reemplazo enzimático |
| Enzima | Hiperarginemia familiar | Arginasa | Arginina |

(continuación)

| Tabla 7. Enfermedades seleccionadas, antígenos exógenos y dianas | | | |
|---|---|---|--|
| Categoría | Enfermedad | Antígeno exógeno | Diana |
| Enzima | Factor de estabilización de fibrina Def. | FXIII | reemplazo enzimático |
| Enzima | Acidemia glutárica de tipo I | lisina oxidasa | Ácido 3-hidroxiglutarico y glutárico (C5-DC), lisina |
| Enzima | Gota | Uricasa | Ácido úrico |
| Enzima | Gota - hiperuricemia | Uricasa | Ácido úrico (cristales de urato) |
| Enzima | Hageman Def. | FXII | reemplazo enzimático |
| Enzima | Anemia hemolítica por deficiencia de pirimidina 5' nucleotidasa | pirimidina 5' nucleotidasa | pirimidinas |
| Enzima | Hemofilia A | Factor VIII | Trombina (factor II a) o factor X |
| Enzima | Hemofilia B | Factor IX | Factor XIa o Factor X |
| Enzima | Hemofilia C | FXI | reemplazo enzimático |
| Enzima | Carcinoma hepatocelular, melanoma | Arginina desiminasa | Arginina |
| Enzima | Homocistinuria | Cistationina B sintasa | homocisteína |
| Enzima | hiperamoniemia/ornitinemia/citrulinemia (defecto del transportador de ornitina) | Amoniaco monooxigenasa | Amoniaco |
| Enzima | Acidemia isovalérica | Enzima metabolizadora de leucina | leucina |
| Enzima | Intoxicación por plomo | d-aminolevulinato deshidrogenasa | plomo |
| Enzima | Síndrome de Lesch-Nyhan | Uricasa | Ácido úrico |
| Enzima | Cetoaciduria de cadena ramificada | Enzima metabolizadora de leucina | Leucina |
| Enzima | Acidemia metilmalónica (que no responde a la vitamina B12) | metilmaloni-CoA mutasa | malonato de metilo |
| Enzima | Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial | timidina fosforilasa | timidina |
| Enzima | Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (ENGIM) | Timidina fosforilasa | Timidina |
| Enzima | Enfermedad de Owren | FV | reemplazo enzimático |
| Enzima | tumor sólido sin p53 | Serina deshidratasa o serina hidroximetil transferasa | serina |
| Enzima | Adenocarcinoma de páncreas | Asparaginasa | asparagina |
| Enzima | Fenilcetonuria | Fenilalanina hidroxilasa, fenilalanina amoniaco liasa | Fenilalanina |
| Enzima | Hiperoxaluria primaria | Oxalato oxidasa | Oxalato |
| Enzima | Acidemia propiónica | ¿Enzima de conversión de propionato? | Propionil coA |

(continuación)

| Tabla 7. Enfermedades seleccionadas, antígenos exógenos y dianas | | | |
|---|---|--|--|
| Categoría | Enfermedad | Antígeno exógeno | Diana |
| Enzima | Deficiencia de purina nucleósido fosforilasa | Purina nucleósido fosforilasa | Inosina, dGTP |
| Enzima | Stuart-Power Def. | FX | reemplazo enzimático |
| Enzima | Púrpura trombocitopénica trombótica | ADAMTS13 | factor de von Willebrand ultragrande (FVWUG) |
| Enzima | Galactosemia deficiente en transferasa (galactosemia de tipo 1) | galactosa deshidrogenasa | Galactosa-1-fosfato |
| Enzima | Tirosinemia de tipo 1 | tirosina fenol liasa | tirosina |
| Enzima | enfermedad de von Willebrand | FvW | reemplazo enzimático |
| Aclaramiento de IC | Nefropatía por IgA | Receptor del complemento 1 | Inmunocomplejos |
| Aclaramiento de IC | Nefritis lúpica | Receptor del complemento 1 | inmunocomplejo |
| Aclaramiento de IC | Lupus eritematoso sistémico | Receptor del complemento 1 | inmunocomplejo |
| Infecciosa | Infección por carbunco (<i>B. anthracis</i>) | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína de superficie de <i>B. anthracis</i> | <i>B. anthracis</i> |
| Infecciosa | Infección por <i>C. botulinum</i> | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína de superficie de <i>C. botulinum</i> | <i>C. botulinum</i> |
| Infecciosa | Infección por <i>C. difficile</i> | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína de superficie de <i>C. difficile</i> | <i>C. difficile</i> |
| Infecciosa | Infección por <i>Candida</i> | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína de superficie de <i>Candida</i> | <i>Candida</i> |
| Infecciosa | Infección por <i>E. coli</i> | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína de superficie de <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> |
| Infecciosa | Infección por virus del Ébola | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína de superficie del virus del Ébola | Ébola |
| Infecciosa | Infección por hepatitis B (VHB) | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína de superficie del VHB | VHB |
| Infecciosa | Infección por hepatitis C (VHC) | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína de superficie del VHC | VHC |
| Infecciosa | Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) | un agente de unión similar a un anticuerpo para las proteínas de la envoltura del VIH o CD4 o CCR5 o | VIH |
| Infecciosa | Infección por <i>M. tuberculosis</i> | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína de superficie de <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. tuberculosis</i> |
| Infecciosa | Infección por paludismo (<i>P. falciparum</i>) | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína de superficie de <i>P. falciparum</i> | <i>P. falciparum</i> |
| Lípido | Deficiencia de lipasa hepática, hipercolesterolemia | Lipasa hepática (LIPC) | Lipoproteína, densidad intermedia (IDL) |

(continuación)

| Tabla 7. Enfermedades seleccionadas, antígenos exógenos y dianas | | | |
|---|--|---|---|
| Categoría | Enfermedad | Antígeno exógeno | Diana |
| Lípido | Hiperalfalipoproteinemia 1 | Proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP) | Lipoproteína, alta densidad (HDL) |
| Lípido | hipercolesterolemia | un agente de unión similar a un anticuerpo para las lipoproteínas de baja densidad (LDL), Receptor de LDL | LDL |
| Lípido | hipercolesterolemia | un aglutinante similar a un anticuerpo para la lipoproteína de alta densidad (HDL) o el receptor de HDL | HDL |
| Lípido | deficiencia de lipoproteína lipasa | lipoproteína lipasa | quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) |
| Lípido | Deficiencia de lipoproteína lipasa, trastornos del metabolismo de las lipoproteínas | lipoproteína lipasa (LPL) | Lipoproteína, muy baja densidad (VLDL) |
| Almacenamiento lisosómico | Aspartilglucosaminuria (208400) | N-aspartilglucosaminidasa | glucoproteínas |
| Almacenamiento lisosómico | Xantomatosis cerebrotendinosa (lipidosis por colestanol; 213700) | Esterol 27-hidroxilasa | lípidos, colesterol y ácido biliar |
| Almacenamiento lisosómico | Forma adulta de lipofuscinosis cerioide (CLN4, enfermedad de Kufs; 204300) | Palmitoil-proteína tioesterasa-1 | lipopigmentos |
| Almacenamiento lisosómico | Forma infantil de lipofuscinosis cerioide (CLN1, enfermedad de Santavuori-Haltia; 256730) | Palmitoil-proteína tioesterasa-1 | lipopigmentos |
| Almacenamiento lisosómico | Forma juvenil de lipofuscinosis cerioide (CLN3, enfermedad de Batten, enfermedad de Vogt-Spielmeyer; 204200) | Proteína CLN3 transmembrana lisosómica | lipopigmentos |
| Almacenamiento lisosómico | Forma infantil tardía de lipofuscinosis cerioide (CLN2, enfermedad de Jansky-Bielschowsky; 204500) | Peptidasa insensible a pepstatina lisosómica | lipopigmentos |
| Almacenamiento lisosómico | Lipofuscinosis cerioidea Epilepsia progresiva con discapacidad intelectual (600143) | Proteína transmembrana CLN8 | lipopigmentos |
| Almacenamiento lisosómico | Forma infantil tardía variante de lipofuscinosis cerioide (CLN6; 601780) | Proteína transmembrana CLN6 | lipopigmentos |
| Almacenamiento lisosómico | Forma infantil tardía variante de lipofuscinosis cerioide, tipo finlandés (CLN5; 256731) | Proteína CLN5 transmembrana lisosómica | lipopigmentos |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad por almacenamiento del éster de colesterol (EAEC) | lipasa ácida lisosómica | lípidos y colesterol |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG Ia (únicamente formas neurológicas y neurológicas multiviscerales; 212065) | Fosfomanomutasa-2 | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG Ib (602579) | Manosa (Man) fosfato (P) isomerasa | Proteína N-glucosilada |

(continuación)

| Tabla 7. Enfermedades seleccionadas, antígenos exógenos y dianas | | | |
|---|--|--|------------------------|
| Categoría | Enfermedad | Antígeno exógeno | Diana |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG Ic (603147) | Dolico-P-Glc: Man9GlcNAc2-PP-dolicol glucosiltransferasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG Id (601110) | Dolico-P-Man: Man5GlcNAc2-PP-dolicol manosiltransferasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG Ie (608799) | Dolicol-P-manosa sintasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG If (609180) | Proteína implicada en la utilización de manosa-P-dolicol | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG Ig (607143) | Doliquil-P-manosa:Man-7-GlcNAc-2-PP-doliquil- α -6-manosiltransferasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG Ih (608104) | Doliquil-P-glucosa:Glc-1-Man-9-GlcNAc-2-PP-doliquil- α -3-glucosiltransferasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG Ii (607906) | α -1,3-manosiltransferasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG IIa (212066) | Manosil-a-1,6-glucoproteína- β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG IIb (606056) | Glucosidasa I | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG IIc (síndrome de Rambam-Hasharon; 266265) | Transportador de GDP-fucosa-1 | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG IId (607091) | β -1,4-galactosiltransferasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG IIe (608779) | Complejo oligomérico de Golgi-7 | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG Ij (608093) | UDP-GlcNAc:doliquil-P NAcGlc fosfotransferasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG Iik (608540) | β -1,4-manosiltransferasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación CDG II (608776) | α -1,2-manosiltransferasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Trastornos congénitos de la N-glucosilación, tipo I (defectos de glucosilación previos al Golgi) | α -1,2-manosiltransferasa | Proteína N-glucosilada |
| Almacenamiento lisosómico | Cistinosis | Cistinosina (transportador de cistina lisosómica) | Cisteína |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Fabry (301500) | Trihexosilceramida α -galactosidasa | globotriaosilceramida |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Farber (lipogranulomatosis; 228000) | Ceramidasa | lípidos |

(continuación)

| Tabla 7. Enfermedades seleccionadas, antígenos exógenos y dianas | | | |
|---|---|---|---------------------------------------|
| Categoría | Enfermedad | Antígeno exógeno | Diana |
| Almacenamiento lisosómico | Fucosidosis (230000) | α -L-fucosidasa | fucosa y azúcares complejos |
| Almacenamiento lisosómico | Galactosialidosis (síndrome de Goldberg, deficiencia combinada de neuraminidasa y β -galactosidasa; 256540) | Proteína protectora/catepsina A (PPCA) | contenido lisosómico |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Gaucher | Glucosilceramida β -glucosidasa | esfingolípidos |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad por almacenamiento de glutamil ribosa-5-fosfato (305920) | ADP-ribosa proteína hidrolasa | glutamil ribosa 5-fosfato |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad por almacenamiento del glucógeno de tipo 2 (enfermedad de Pompe) | alfa glucosidasa | glucógeno |
| Almacenamiento lisosómico | Gangliosidosis GM1, generalizada | Gangliósido β -galactosidasa | materia lipídica ácida, gangliósidos |
| Almacenamiento lisosómico | Deficiencia de la proteína activadora GM2 (variante AB de la enfermedad de Tay-Sachs, GM2A; 272750) | Proteína activadora GM2 | gangliósidos |
| Almacenamiento lisosómico | Gangliosidosis GM2 | Gangliósido β -galactosidasa | gangliósidos |
| Almacenamiento lisosómico | Trastorno por almacenamiento de ácido siálico infantil (269920) | Cotransportador de fosfato de sodio, sialina | ácido siálico |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Krabbe (245200) | Galactosilceramida β -galactosidasa | esfingolípidos |
| Almacenamiento lisosómico | Deficiencia de lipasa ácida lisosómica (278000) | Lipasa ácida lisosómica | ésteres de colesterol y triglicéridos |
| Almacenamiento lisosómico | Leucodistrofia metacromática (250100) | Ari sulfatasa A | sulfátidas |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolipidosis ML II (enfermedad de células I; 252500) | Subunidad catalítica de N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferasa | Glucoproteínas ligadas a N |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolipidosis ML III (polidistrofia de pseudo-Hurler) | N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferasa | Glucoproteínas ligadas a N |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolipidosis ML III (polidistrofia de pseudo-Hurler) de tipo III-A (252600) | Subunidad catalítica | Glucoproteínas ligadas a N |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolipidosis ML III (polidistrofia de pseudo-Hurler) de tipo III-C (252605) | Subunidad de reconocimiento de sustrato | Glucoproteínas ligadas a N |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS IH/S (síndrome de Hurler-Scheie; 607015) | α -L-iduronidasa | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS IH (síndrome de Hurler; 607014) | α -L-iduronidasa | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS II (síndrome de Hunter; 309900) | Iduronato sulfato sulfatasa | glucosaminoglucanos |

(continuación)

| Tabla 7. Enfermedades seleccionadas, antígenos exógenos y dianas | | | |
|---|---|--|---------------------|
| Categoría | Enfermedad | Antígeno exógeno | Diana |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS III (síndrome de Sanfilippo) de tipo III-A (252900) | Heparán-S-sulfato sulfamidasa | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS III (síndrome de Sanfilippo) de tipo III-B (252920) | N-acetil-D-glucosaminidasa | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS III (síndrome de Sanfilippo) de tipo III-C (252930) | Acetil-CoA-glucosaminida N-acetiltransferasa | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS III (síndrome de Sanfilippo) de tipo III-D (252940) | N-acetil-glucosaminina-6-sulfato sulfatasa | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS I-S (síndrome de Scheie; 607016) | α -l-iduronidasa | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS IV (síndrome de Morquio) de tipo IV-A (253000) | Galactosamina-6-sulfato sulfatasa | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS IV (síndrome de Morquio) de tipo IV-B (253010) | β -galactosidasa | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS IX (deficiencia de hialuronidasa; 601492) | Deficiencia de hialuronidasa | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS VI (síndrome de Maroteaux-Lamy; 253200) | N-acetil galactosamina α -4-sulfato sulfatasa (arilsulfatasa B) | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucopolisacaridosis MPS VII (síndrome de Sly; 253220) | β -glucuronidasa | glucosaminoglucanos |
| Almacenamiento lisosómico | Mucosulfatidosis (deficiencia múltiple de sulfatasa; 272200) | Factor modificador de sulfatasa-1 | sulfátidas |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Niemann-Pick de tipo A | Esfingomielinasa | esfingomielina |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Niemann-Pick de tipo B | Esfingomielinasa | esfingomielina |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Niemann-Pick de tipo C1/tipo D ((257220) | Proteína NPC1 | esfingomielina |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Niemann-Pick de tipo C2 (607625) | Proteína secretora 1 del epidídimo (HE1; proteína NPC2) | esfingomielina |
| Almacenamiento lisosómico | Deficiencia de prosaposina (176801) | Prosaposina | esfingolípidos |
| Almacenamiento lisosómico | Picnodisostosis (265800) | Catepsina K | quininas |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Sandhoff; 268800 | β -hexosaminidasa B | gangliósidos |

(continuación)

| Tabla 7. Enfermedades seleccionadas, antígenos exógenos y dianas | | | |
|---|---|--|--------------------------------------|
| Categoría | Enfermedad | Antígeno exógeno | Diana |
| Almacenamiento lisosómico | Deficiencia de saposina B (deficiencia del activador de sulfatida) | Saposina B | esfingolípidos |
| Almacenamiento lisosómico | Deficiencia de saposina C (deficiencia del activador de Gaucher) | Saposina C | esfingolípidos |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Schindler de tipo I (forma infantil grave; 609241) | N-acetil-galactosaminidasa | glucoproteínas |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Schindler de tipo II (enfermedad de Kanzaki, forma de aparición en adultos; 609242) | N-acetil-galactosaminidasa | glucoproteínas |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Schindler de tipo III (forma intermedia; 609241) | N-acetil-galactosaminidasa | glucoproteínas |
| Almacenamiento lisosómico | Sialidosis (256550) | Neuraminidasa 1 (sialidasa) | mucopolisacáridos y mucolípidos |
| Almacenamiento lisosómico | Sialuria de tipo finlandés (enfermedad de Salla; 604369) | Cotransportador de fosfato de sodio, sialina | ácido siálico |
| Almacenamiento lisosómico | Sialuria de tipo francés (269921) | UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa/N-acetilmanosamina cinasa, sialina | ácido siálico |
| Almacenamiento lisosómico | Esfingolipidosis de tipo I (230500) | Gangliósido β -galactosidasa | esfingolípidos |
| Almacenamiento lisosómico | Esfingolipidosis de tipo II (tipo juvenil; 230600) | Gangliósido β -galactosidasa | esfingolípidos |
| Almacenamiento lisosómico | Esfingolipidosis de tipo III (tipo adulto; 230650) | Gangliósido β -galactosidasa | esfingolípidos |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Tay-Sachs; 272800 | β -hexosaminidasa A | gangliósidos |
| Almacenamiento lisosómico | Síndrome de Winchester (277950) | Metaloproteinasa-2 | mucopolisacáridos |
| Almacenamiento lisosómico | Enfermedad de Wolman | lipasa ácida lisosómica | lípidos y colesterol |
| Almacenamiento lisosómico | α -Manosidosis (248500), de tipo I (grave) o II (leve) | α -D-manosidasa | hidratos de carbono y glucoproteínas |
| Almacenamiento lisosómico | β -manosidosis (248510) | β -D-manosidasa | hidratos de carbono y glucoproteínas |
| Molécula tóxica | intoxicación por alfa hemolisina | un agente de unión similar a un anticuerpo para la alfa hemolisina | alfa hemolisina |
| Molécula tóxica | intoxicación por toxina del carbunco | un agente de unión similar a un anticuerpo para la toxina del carbunco | toxina del carbunco |
| Molécula tóxica | choque inducido por toxinas bacterianas | un agente de unión similar a un anticuerpo para la toxina bacteriana | toxina bacteriana |
| Molécula tóxica | intoxicación por toxina botulínica | un agente de unión similar a un anticuerpo para la toxina botulínica | toxina botulínica |

(continuación)

| Tabla 7. Enfermedades seleccionadas, antígenos exógenos y dianas | | | |
|---|--|--|--------------------------|
| Categoría | Enfermedad | Antígeno exógeno | Diana |
| Molécula tóxica | Hemocromatosis (intoxicación por hierro) | quelante de hierro | hierro molecular |
| Molécula tóxica | Intoxicación por metanol | Metanol deshidrogenasa | Metanol |
| Molécula tóxica | Intoxicación por gas neurotóxico | Butiril colinesterasa | Sarín |
| Molécula tóxica | Enfermedad priónica provocada por PRP | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína priónica PRP | Proteína priónica PRP |
| Molécula tóxica | Enfermedad priónica provocada por PRPc | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína priónica PRPc | Proteína priónica PRPc |
| Molécula tóxica | Enfermedad priónica provocada por PRPsc | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína priónica PRPsc | Proteína priónica PRPsc |
| Molécula tóxica | Enfermedad priónica provocada por PRPres | un agente de unión similar a un anticuerpo para la proteína priónica PRPres | Proteína priónica PRPres |
| Molécula tóxica | Septicemia o hipercitocinemia | un agente de unión similar a un anticuerpo para las citocinas o el receptor de quimiocinas antígeno Duffy (DARC) | citocinas |
| Molécula tóxica | intoxicación por veneno de araña | un agente de unión similar a un anticuerpo para el veneno de araña | veneno de araña |
| Molécula tóxica | Enfermedad de Wilson | quelante de cobre | cobre molecular |

| Tabla 8: Complemento y moléculas reguladoras del complemento | |
|---|----------------------------|
| Moléculas solubles | |
| Ruta alternativa | Componentes tardíos |
| Factor B | C5 |
| Factor D | C5a |
| Properdina | C6 |
| C3 | C7 |
| C3a | C8 |
| C3b | C9 |
| iC3b | |
| C3c | Receptores |
| C3dg | CR1 |
| C3dk | CR2 |
| C3e | CR3 |
| Bb | CR4 |

(continuación)

| Tabla 8: Complemento y moléculas reguladoras del complemento | |
|---|--|
| Moléculas solubles | |
| Factor I | C3aR |
| | C3eR |
| Ruta clásica | Factor acelerador de la descomposición (FAD) |
| C1q | Proteína cofactor de membrana (PCM) |
| C1r | CD59 |
| C1s | Receptor de cadena Beta C3 |
| C4 | Factor de restricción homólogo |
| C4a | |
| C4b | Proteínas de control |
| C2 | Inhibidor de C1 |
| C4bp | Proteína de unión a C4 |
| | Factor I |
| Ruta de la lectina | Factor H |
| Lectina de unión a manosa (MBL) | |
| Serina proteasa 1 asociada a MBL (MASP1) | |
| Serina proteasa 2 asociada a MBL (MASP2) | |

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento para inducir tolerancia inmunitaria en un sujeto humano que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección inmunitarios, la composición farmacéutica que comprende una célula eritroide desnucleada que expresa un antígeno exógeno, en el que la composición farmacéutica se administra en una cantidad eficaz para inducir inmunotolerancia en el sujeto al antígeno que media en la enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios; y en el que:
- 5 el antígeno exógeno se une a la membrana celular de la célula eritroide desnucleada; y
el antígeno exógeno es una fusión o un polipéptido quimera, en el que el polipéptido de fusión o quimera es un polipéptido que procede de la combinación de dos o más secuencias de aminoácidos que no se encuentran juntas en la naturaleza.
- 10 2. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, nefritis membranosa, síndrome antifosfolipídico (SAP) y SAP catastrófico.
3. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el sujeto padece una enfermedad autoinmunitaria.
- 15 4. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un periodo de tratamiento de modo que el porcentaje de células inmunitarias específicas de antígeno disminuya sustancialmente durante el periodo de tratamiento.
- 20 5. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula eritroide es: (a) un eritrocito o un reticulocito; (b) procedente de una célula precursora nucleada por un procedimiento basado en cultivo que induce la expulsión de su núcleo; (c) procedente de una fuente humana; (d) presenta sustancialmente la misma fragilidad de la membrana osmótica que una célula eritroide aislada, sin modificar, sin cultivar correspondiente; o (e) no cargado por diálisis hipotónica.
- 25 6. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido de fusión o quimera comprende al menos uno de un dominio S, un dominio A o un dominio U, en el que el dominio S es un dominio de superficie en la célula eritroide desnucleada, en el que el dominio A es un anclaje en o sobre la membrana celular, en el que el dominio U se encuentra frente al lado intracelular, no expuesto, de la célula eritroide desnucleada y en el que el dominio S, el dominio A y/o el dominio U son de origen polipeptídico diferente.
- 30 7. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 6, en el que el dominio S y/o el dominio A comprenden al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o al menos 500 aminoácidos.
8. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el que el antígeno exógeno comprende un antígeno polipeptídico seleccionado del grupo que consiste en proteína básica de mielina, proteína proteolipídica, glucoproteína de oligodendrocitos de mielina, insulina, preproinsulina, proinsulina, receptor de fosfolipasa A2, glucoproteína 1 beta-2 y fragmentos antigénicos de los mismos.
- 35 9. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula eritroide desnucleada comprende al menos 10 copias, 100 copias, 1000 copias, 10 000 copias, 25 000 copias, 50 000 copias, 100 000 copias, 500 000 copias, 1 000 000 de copias o 2 000 000 de copias del antígeno exógeno.
- 40 10. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 9, en el que la célula eritroide desnucleada comprende al menos 1000 copias, p. ej., al menos 10 000 copias, del antígeno exógeno.
11. La composición farmacéutica para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno exógeno comprende un antígeno polipeptídico localizado extracelularmente en la superficie de la célula.
12. La composición farmacéutica para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno exógeno comprende un antígeno polipeptídico fusionado con una proteína celular endógena.
- 45 13. La composición farmacéutica para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno exógeno comprende un antígeno polipeptídico fusionado con una región intracelular de una proteína transmembrana endógena.
14. La composición farmacéutica para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno exógeno se expresó a partir de un ácido nucleico exógeno introducido en la célula eritroide o un precursor de la misma.
- 50 15. La composición farmacéutica para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica se formula como una suspensión líquida para inyección intravenosa.
16. Una composición farmacéutica que comprende una célula eritroide desnucleada que expresa un antígeno

exógeno, en el que la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica es capaz de inducir tolerancia inmunitaria en un sujeto humano que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios; y en el que:

- 5 el antígeno exógeno se une a la membrana celular de la célula eritroide desnucleada; y
el antígeno exógeno es una fusión o un polipéptido quimera, en el que el polipéptido de fusión o quimera es un polipéptido que procede de la combinación de dos o más secuencias de aminoácidos que no se encuentran juntas en la naturaleza.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, en la que la composición farmacéutica es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5-15.
- 10 18. Un equipo médico que comprende la composición farmacéutica de la reivindicación 16 o 17 y un dispositivo médico para inyección intravenosa de la composición farmacéutica a un sujeto.

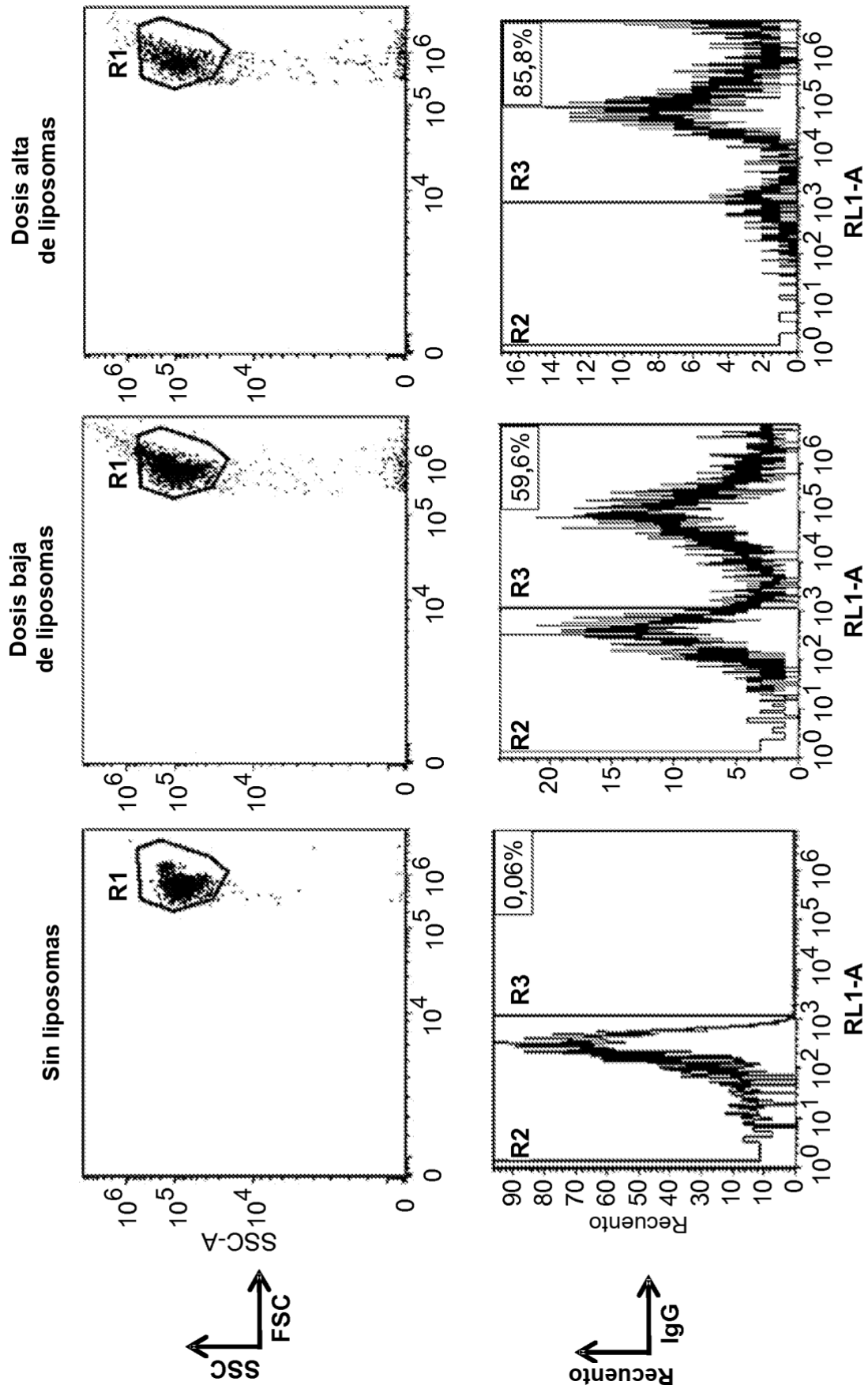


Fig 1

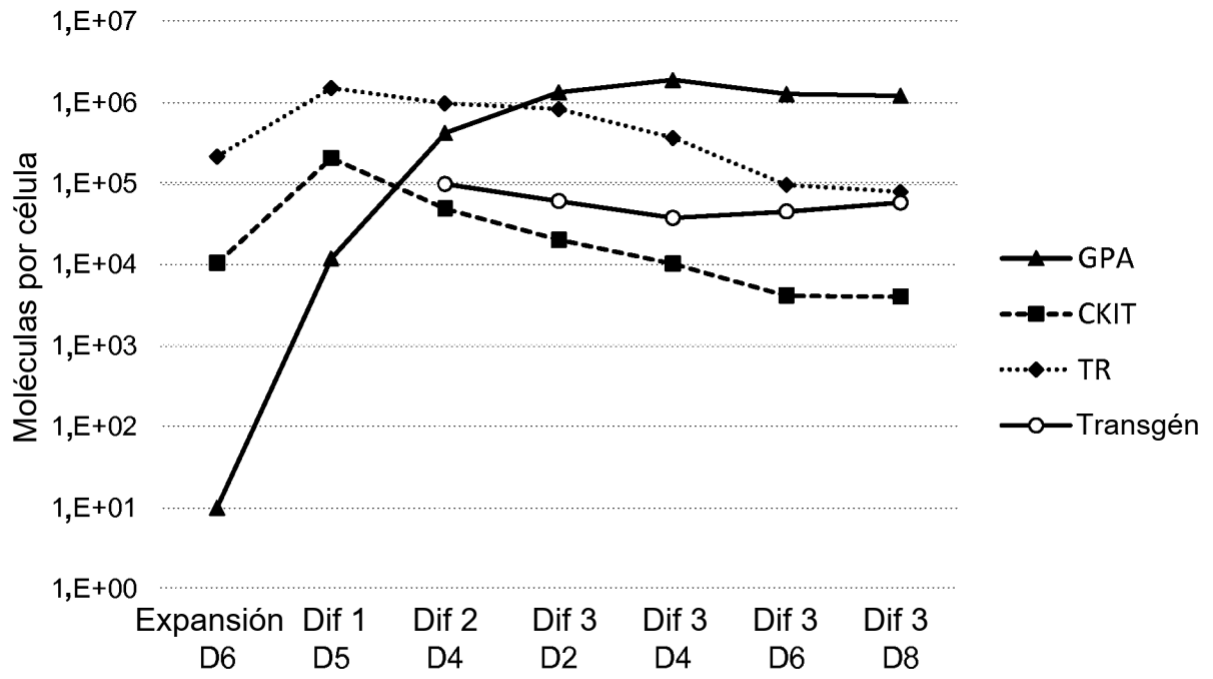
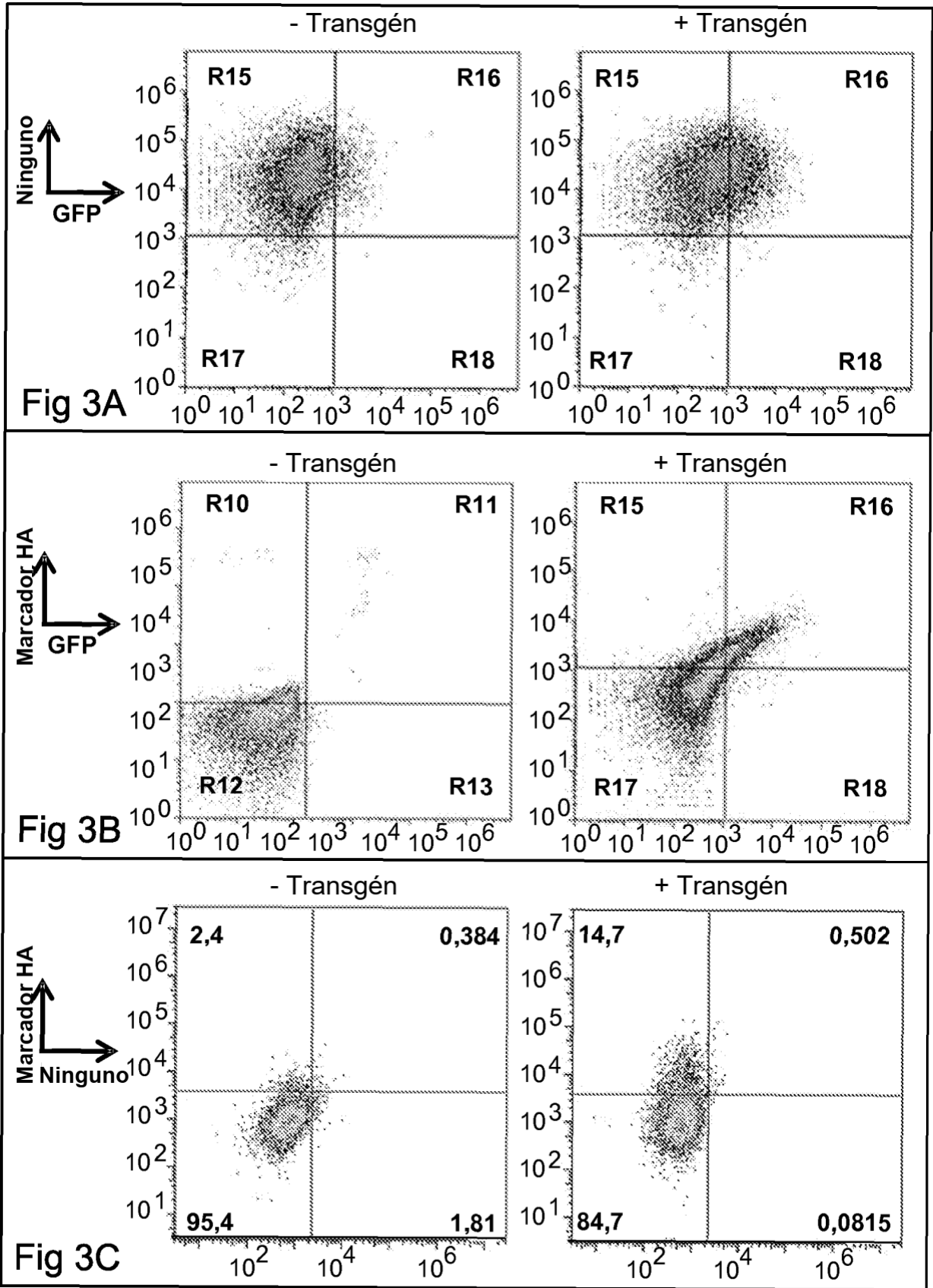
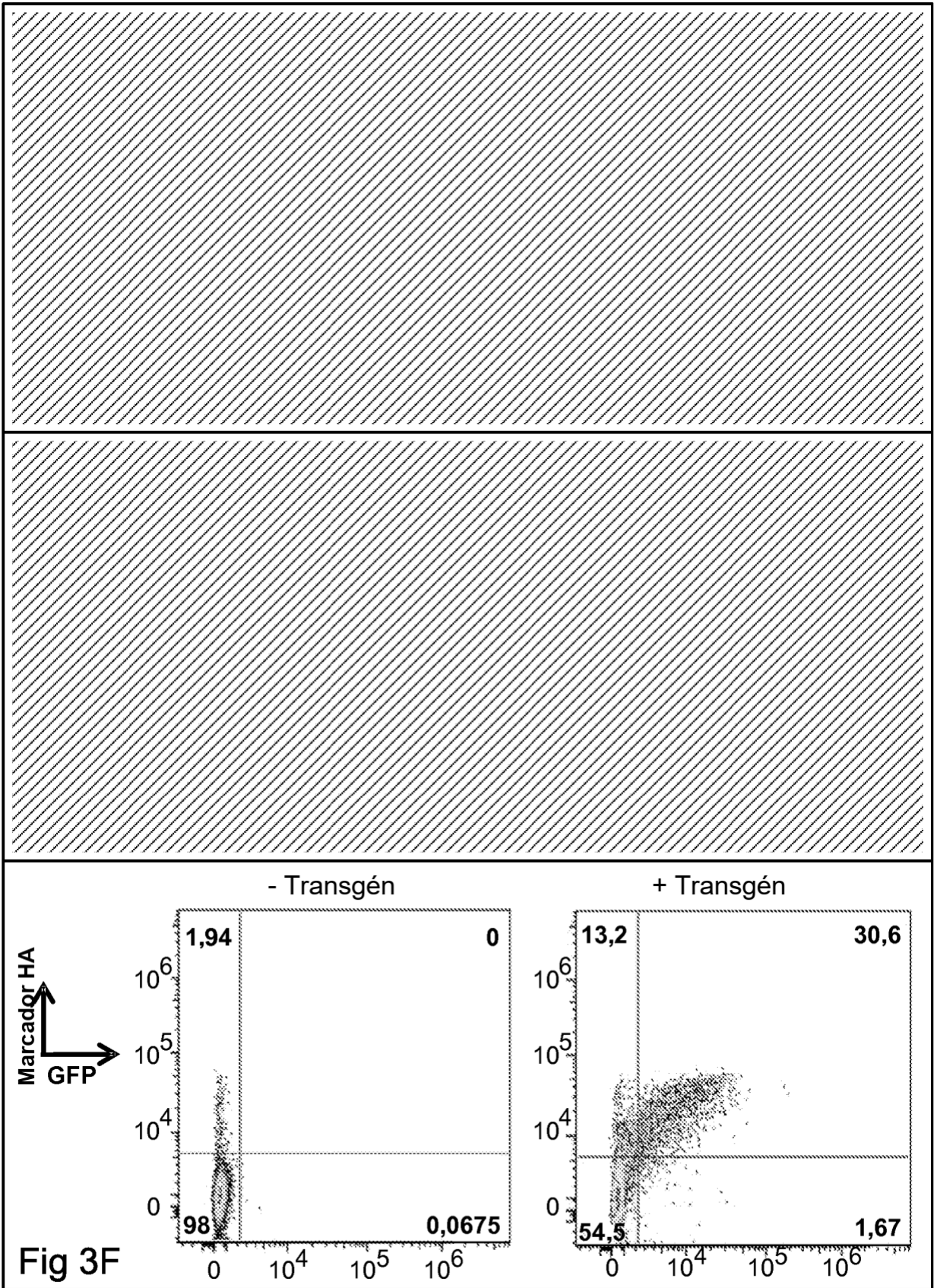
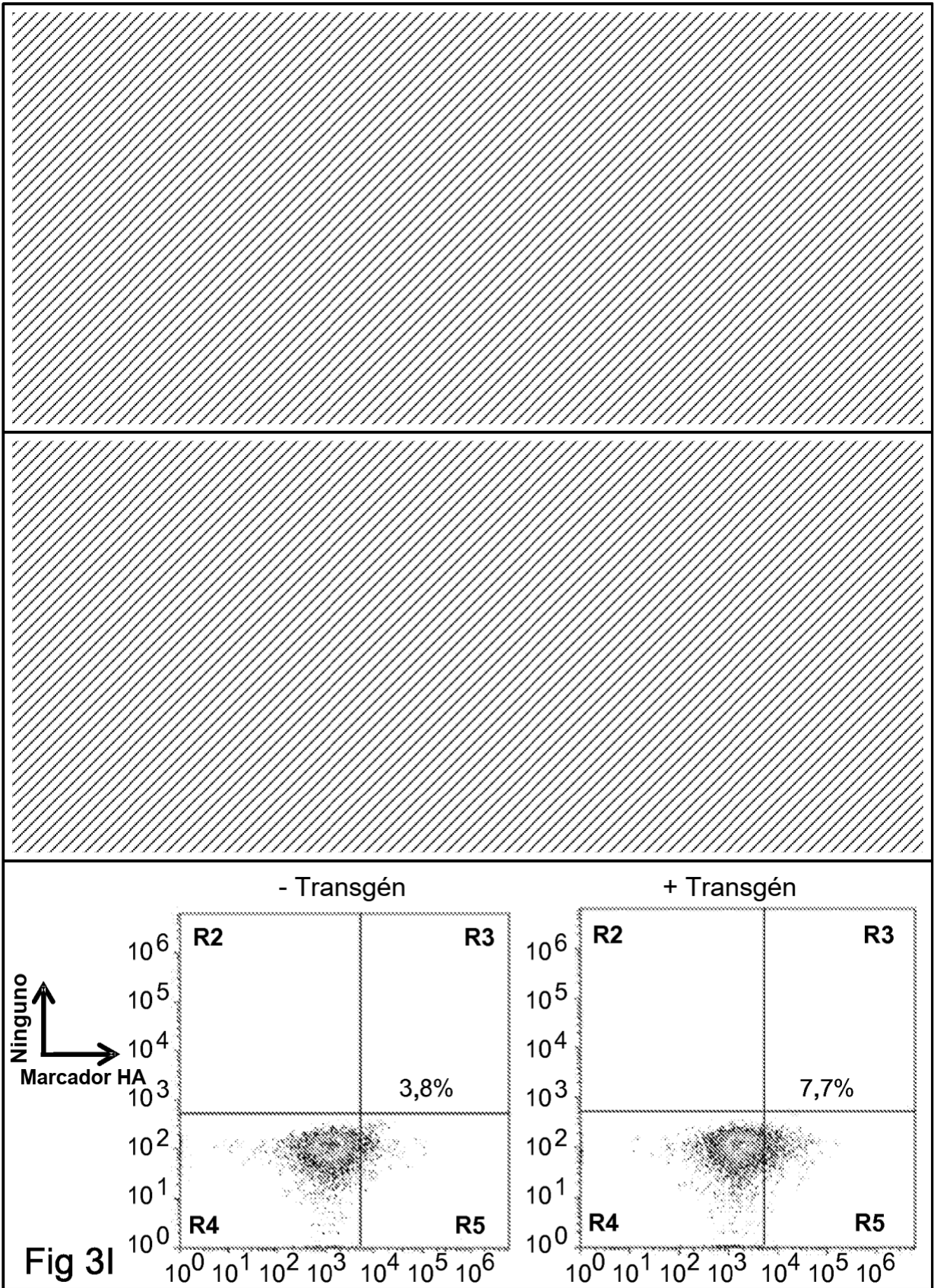
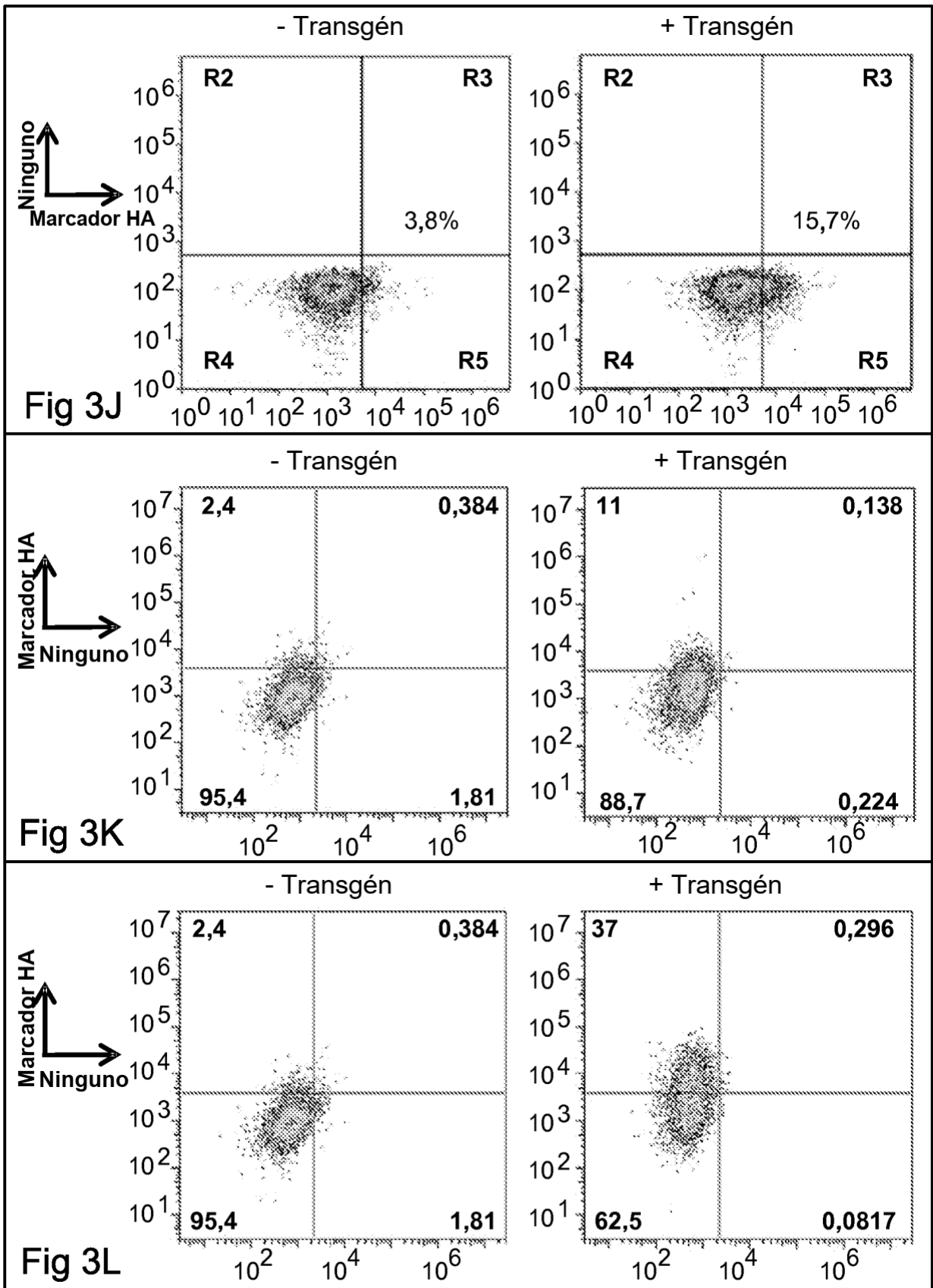


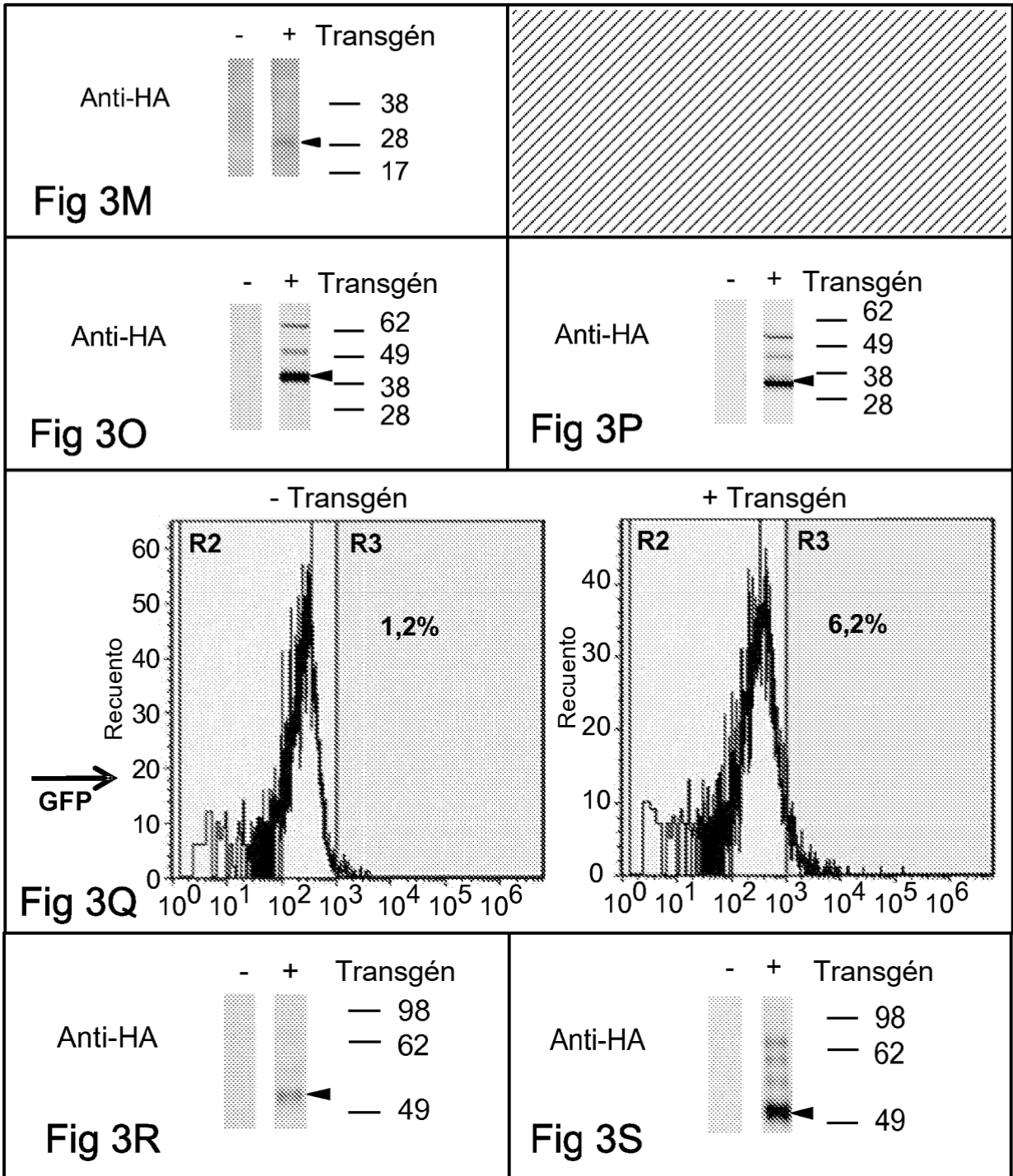
Fig 2

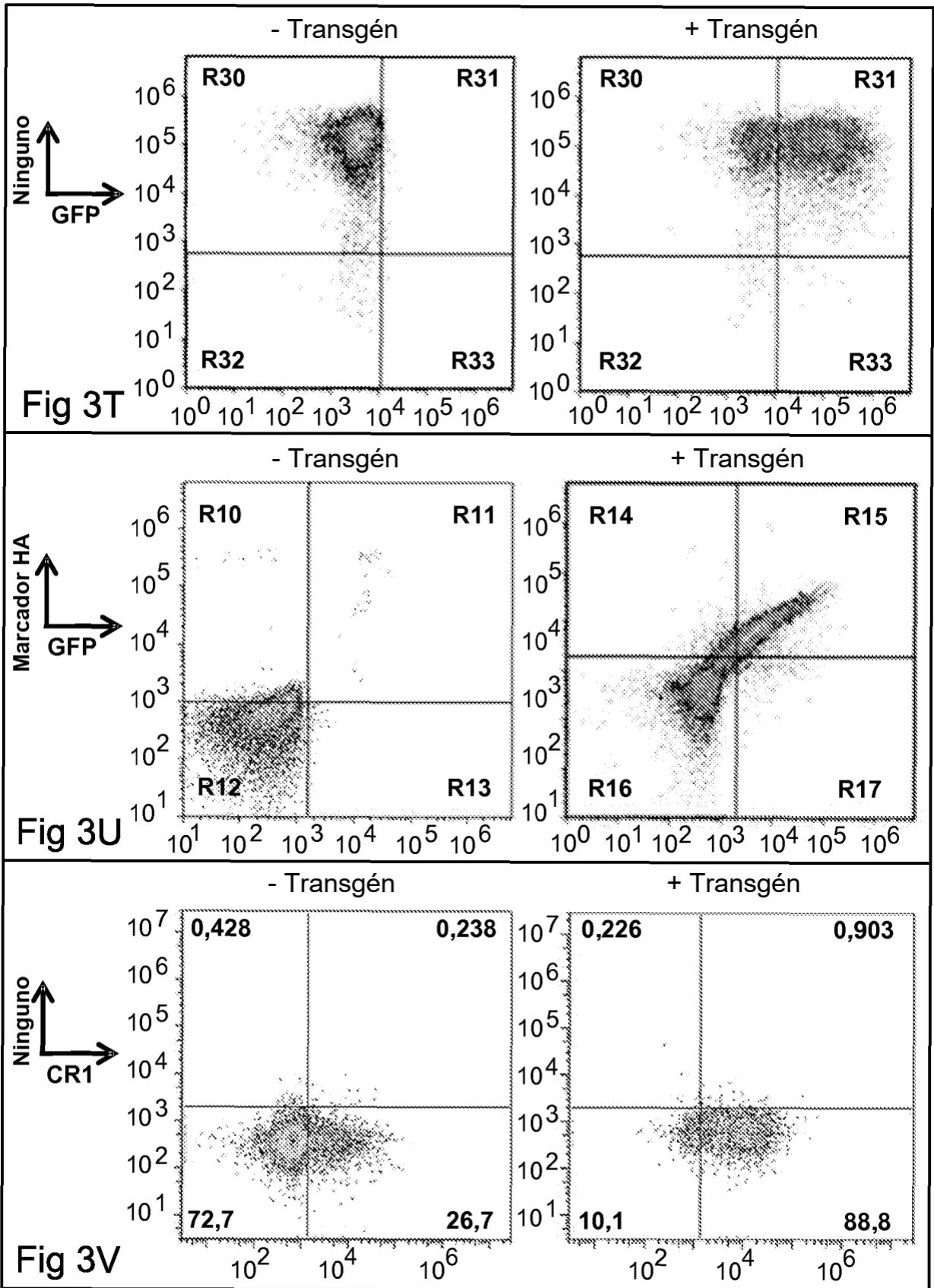


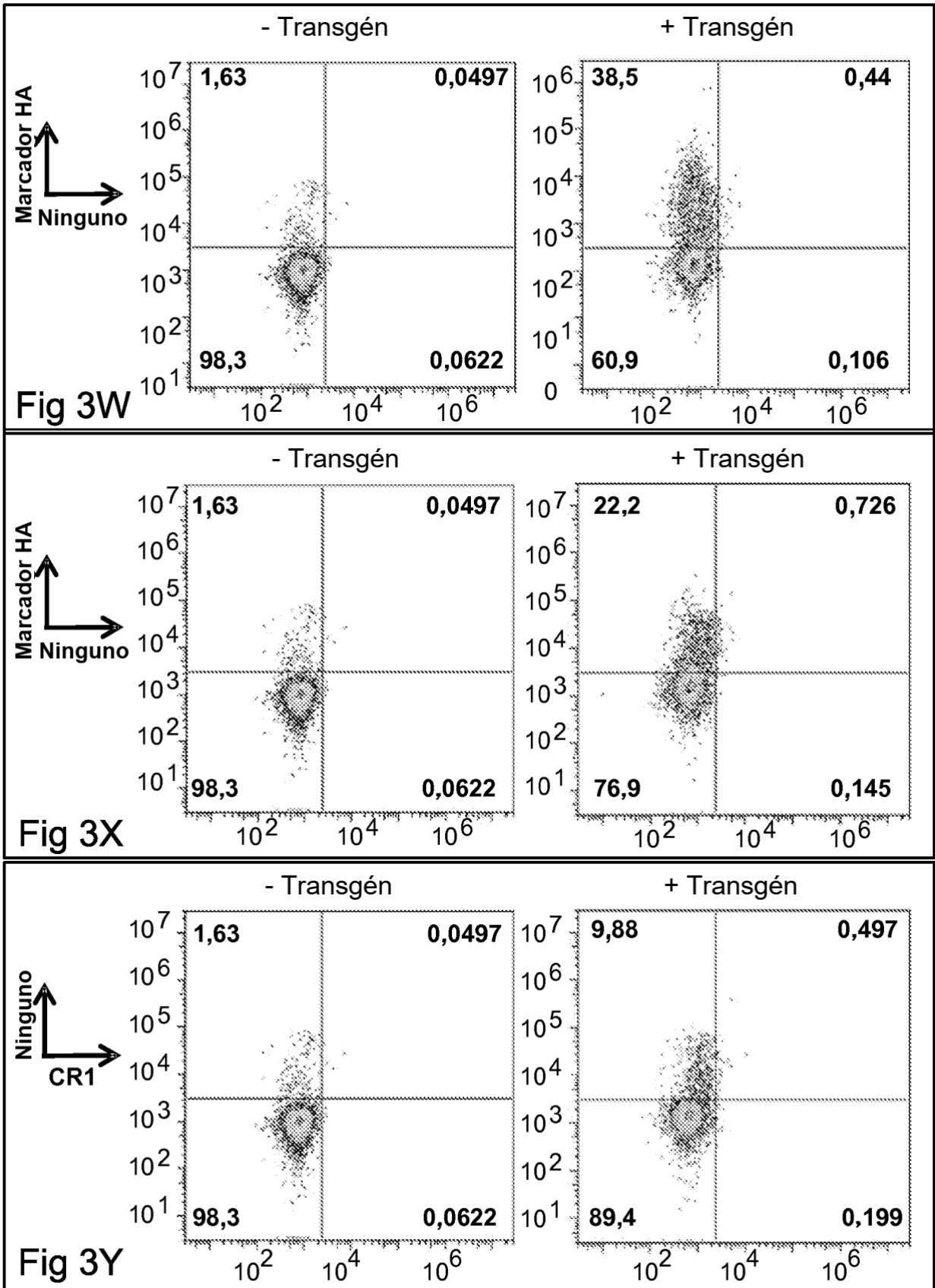


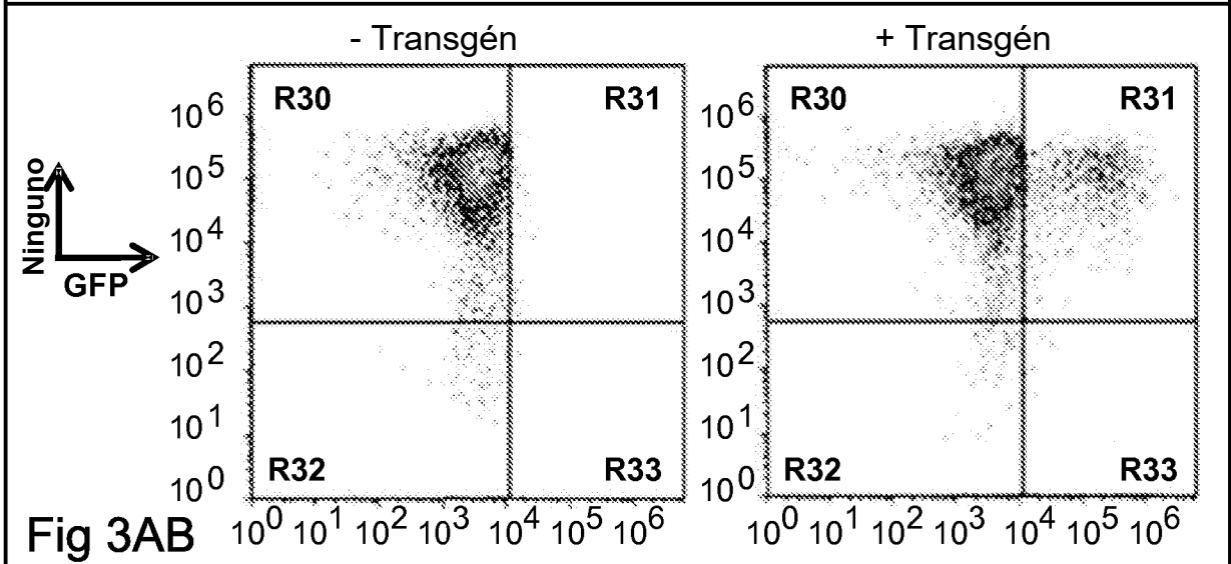
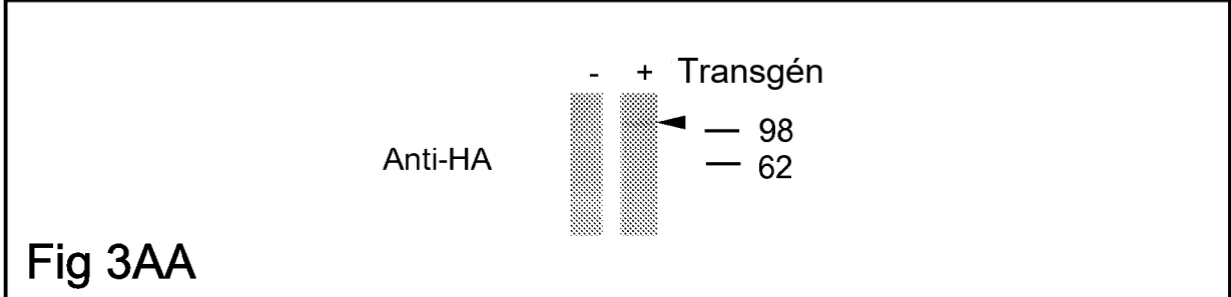
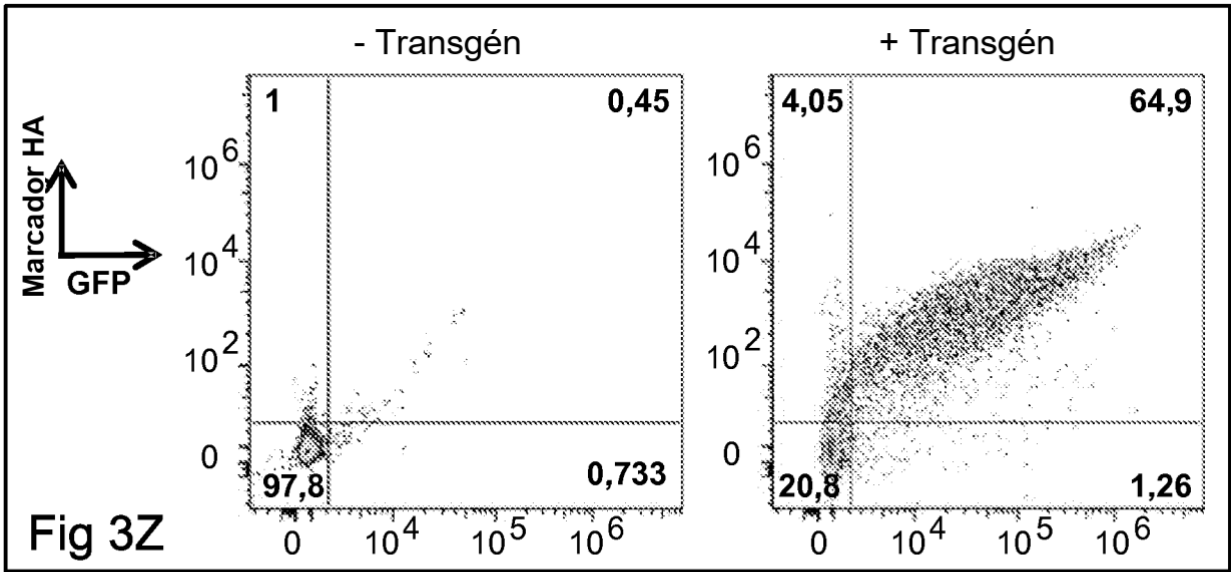


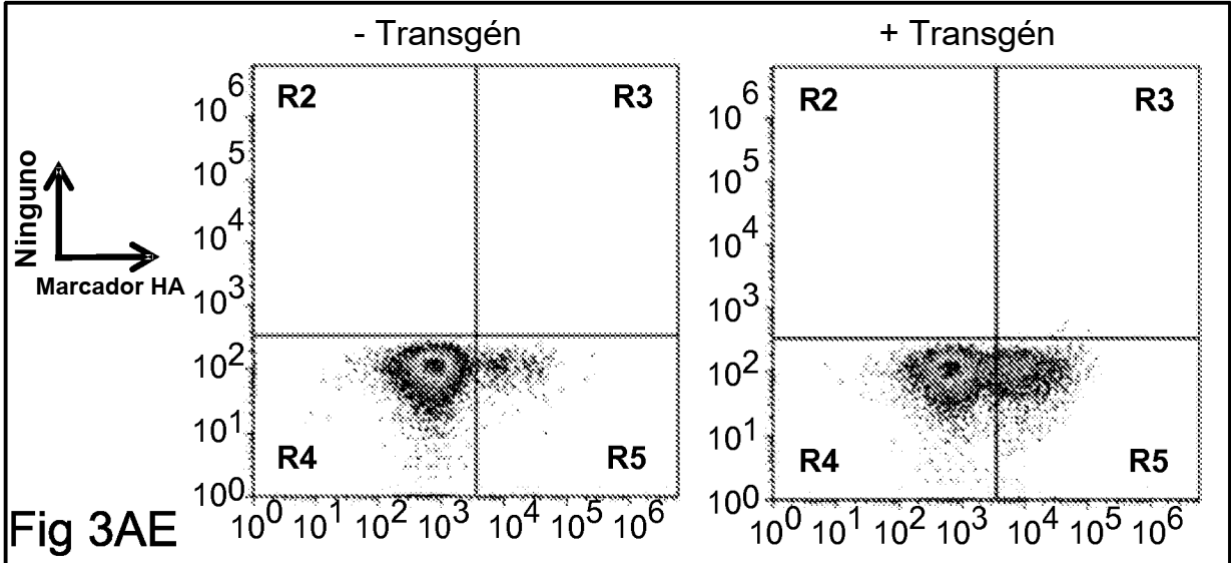
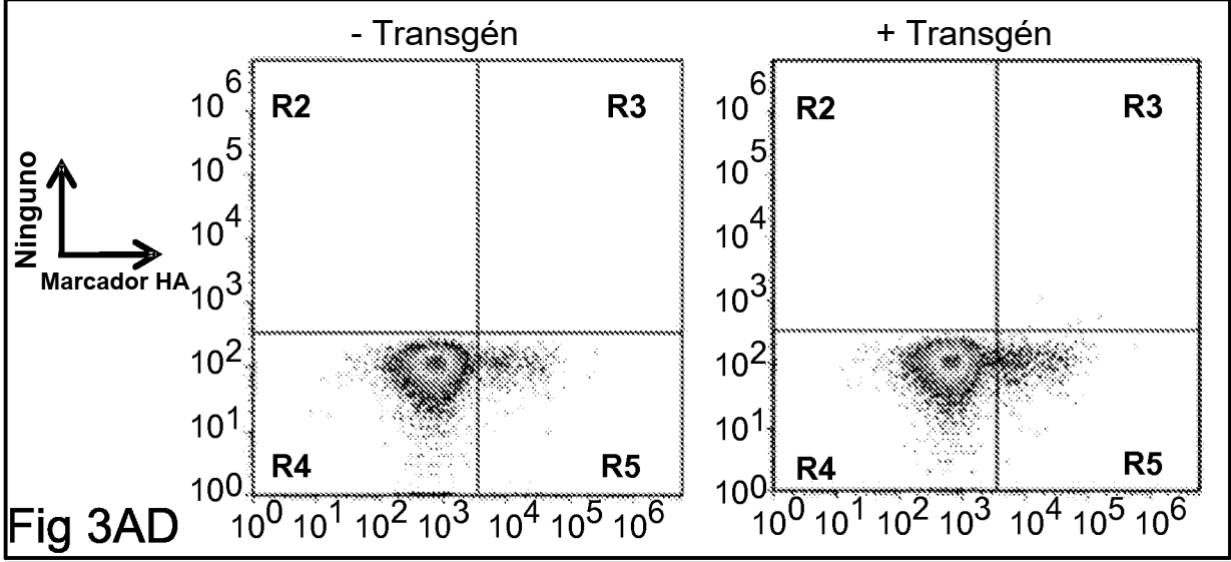
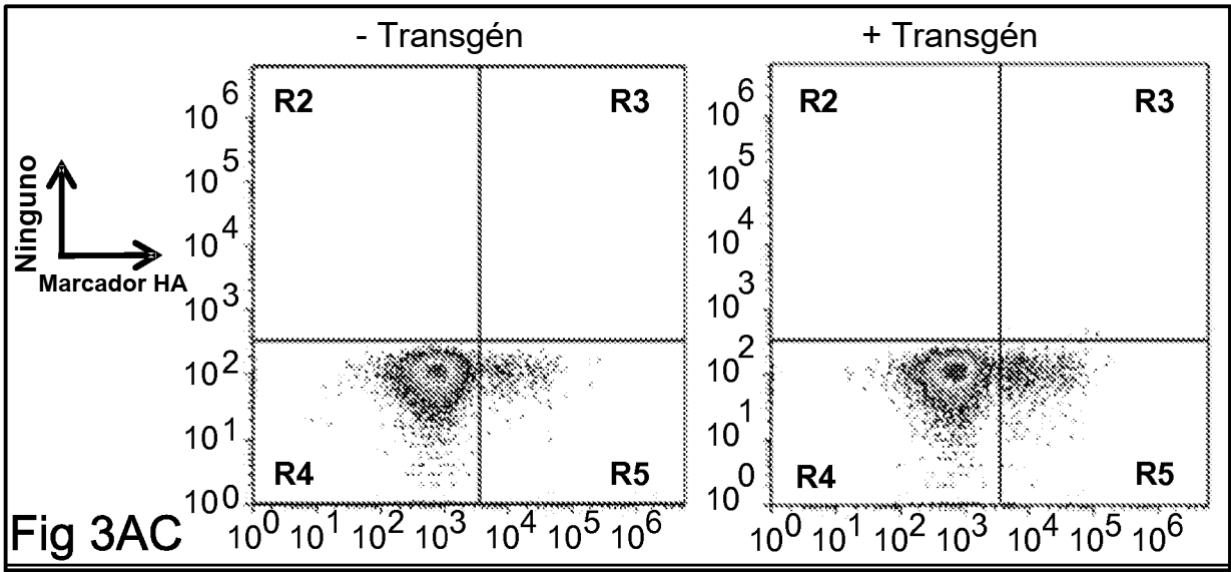


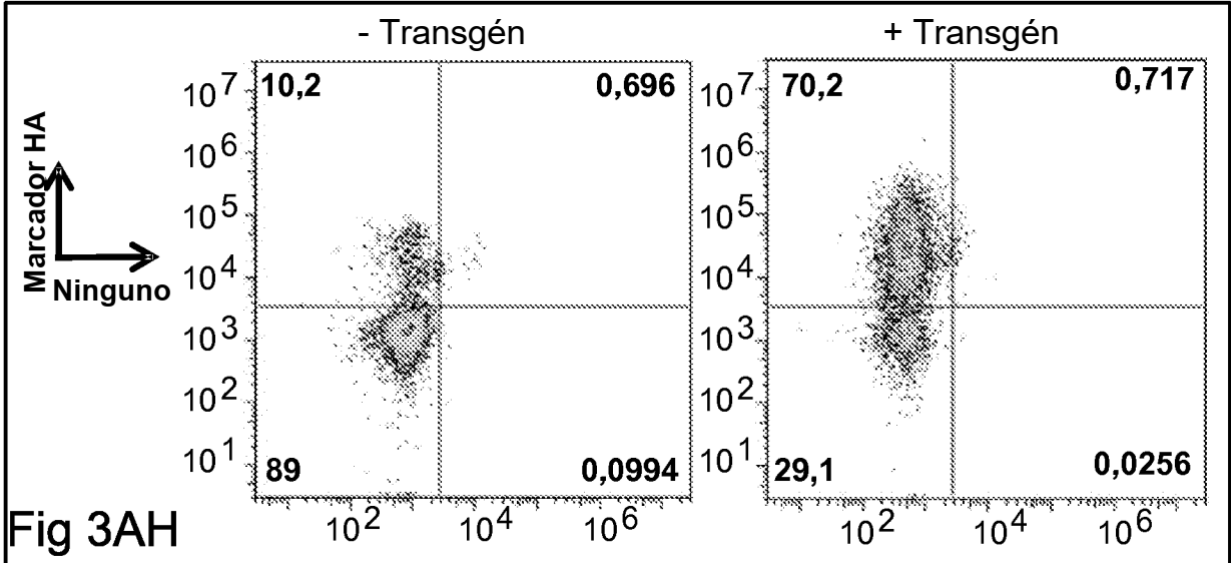
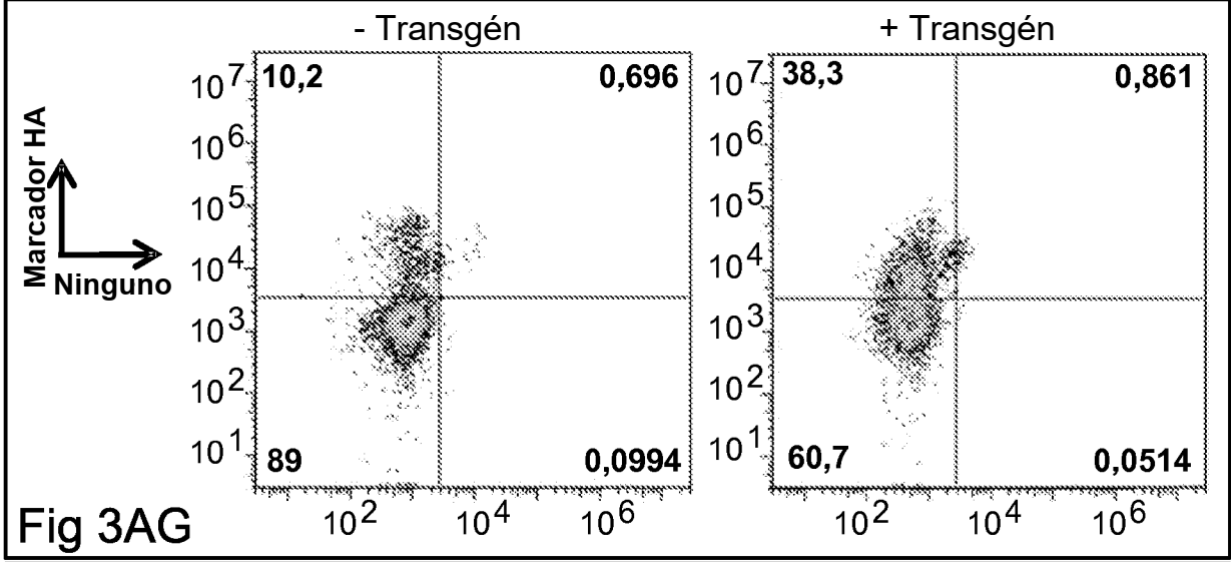
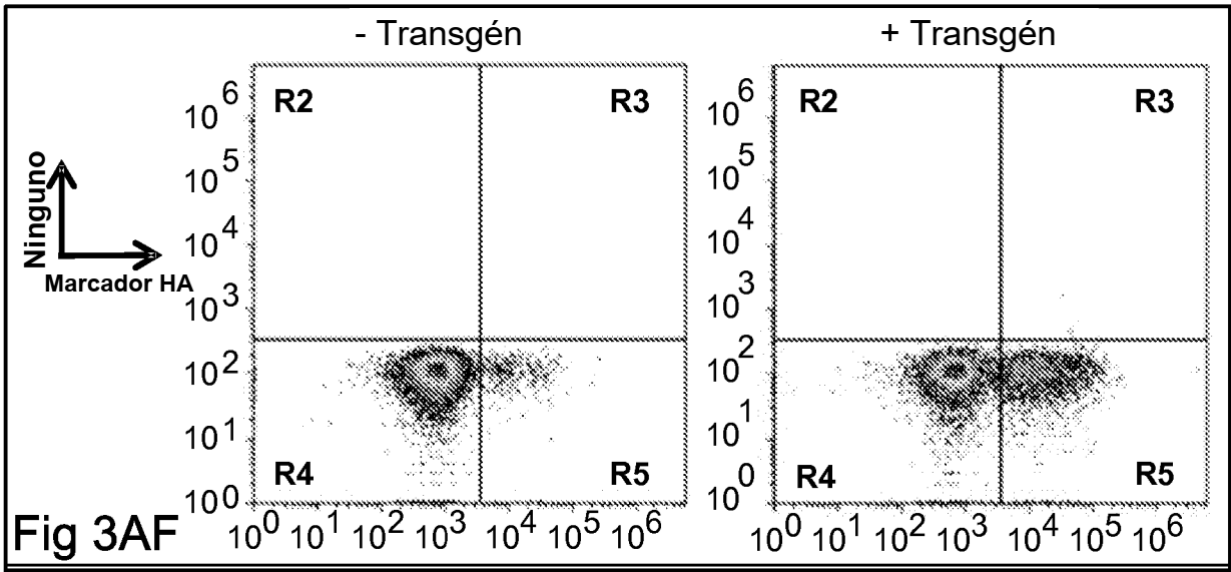


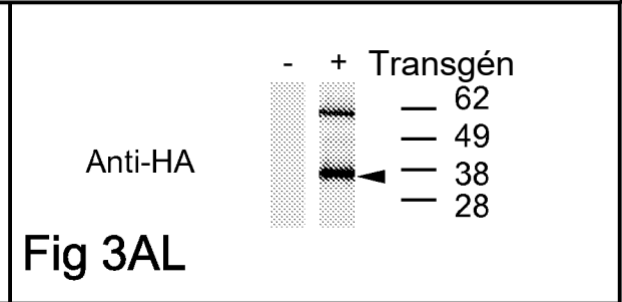
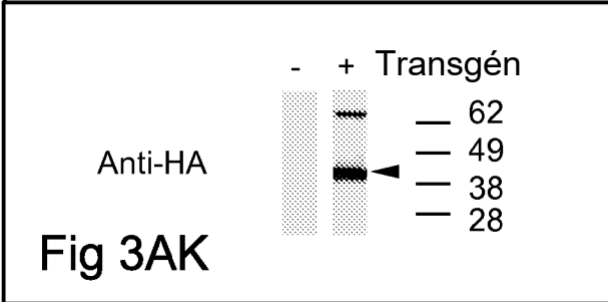
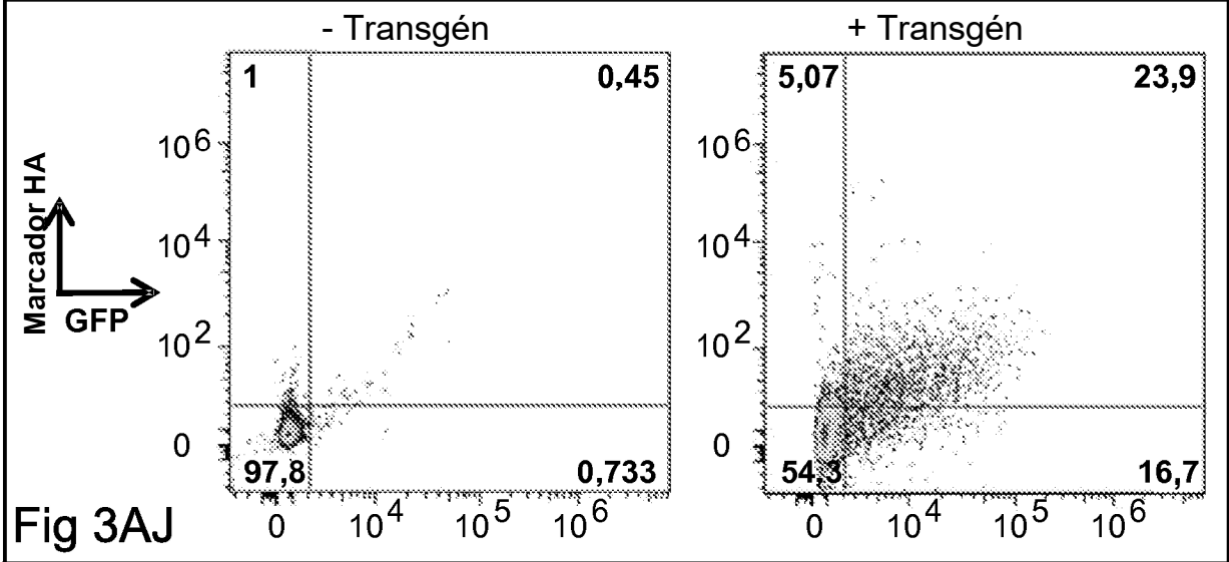
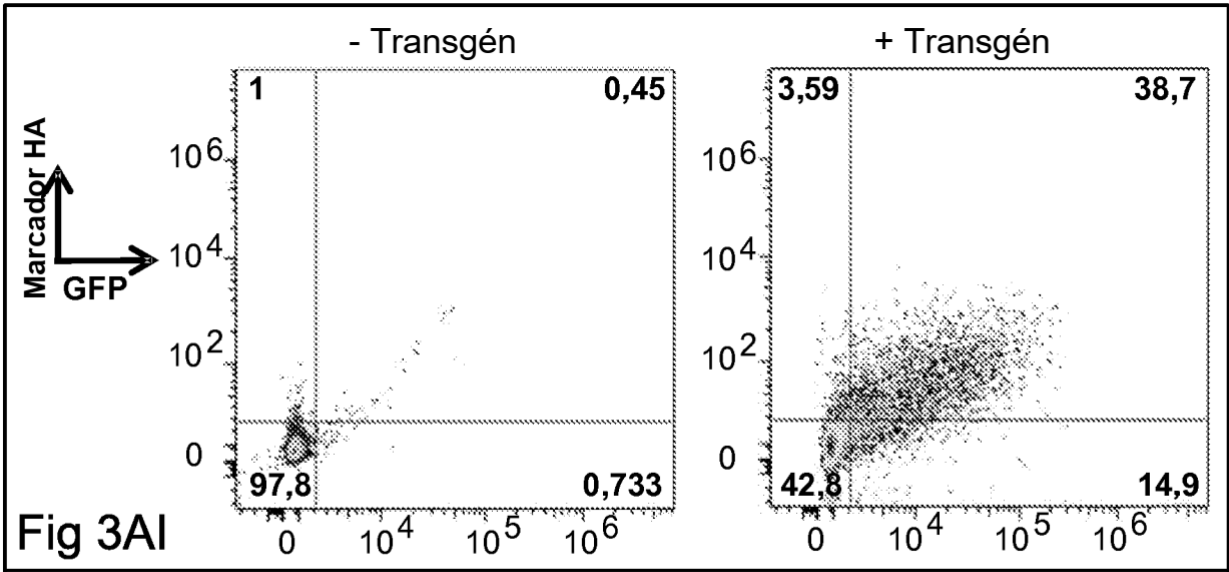


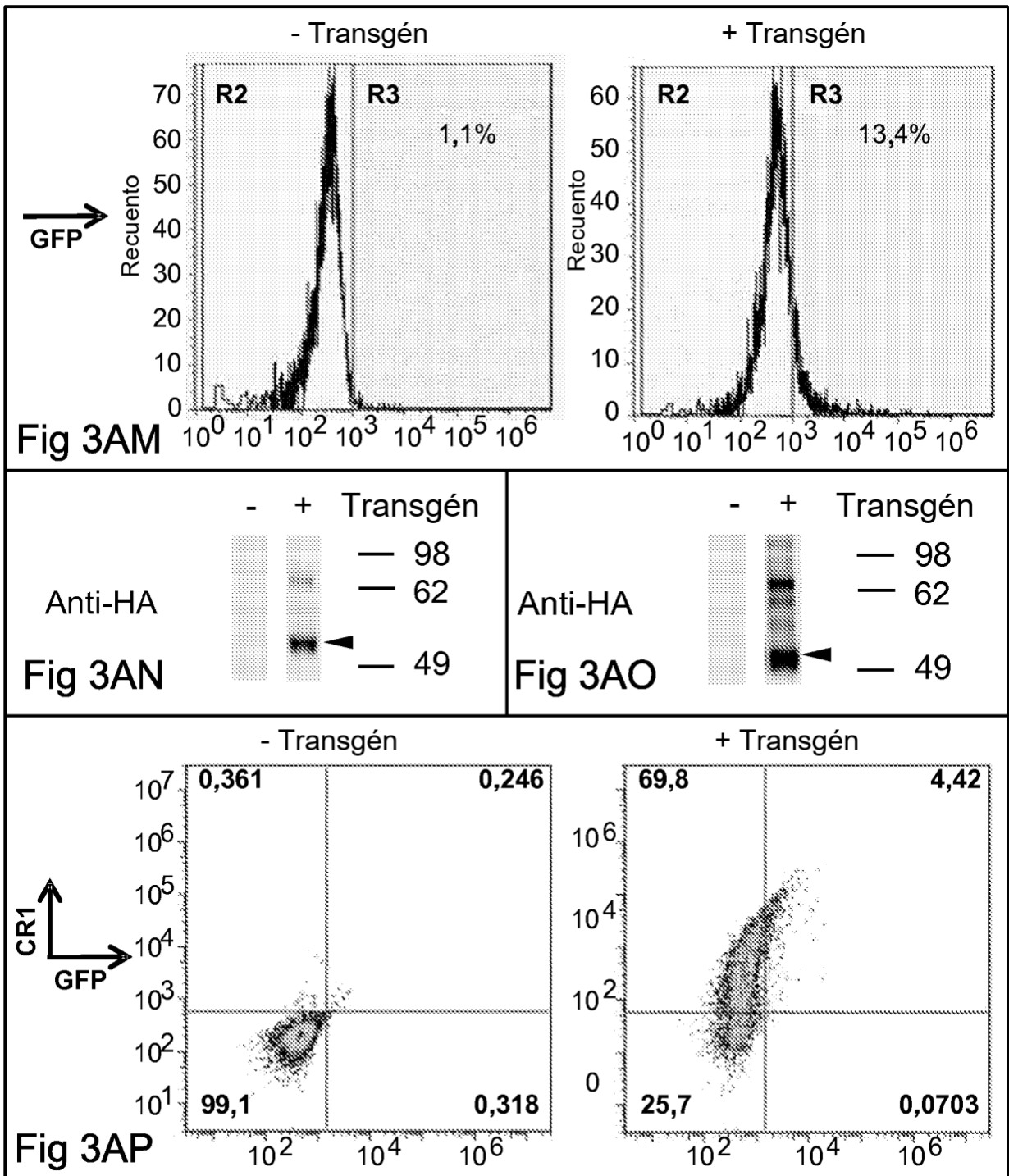


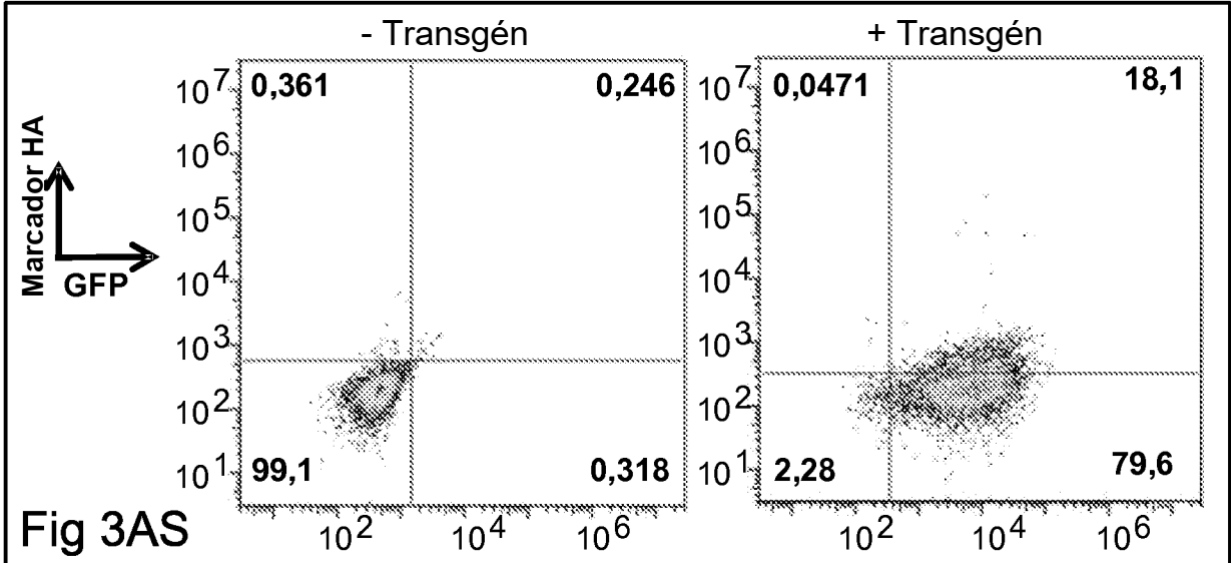
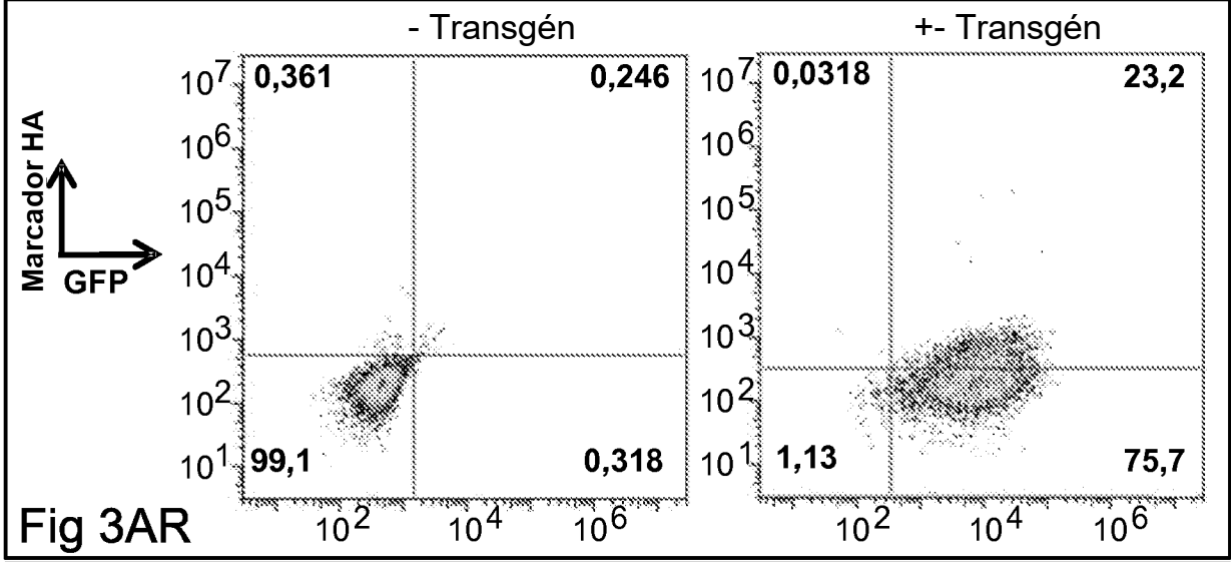
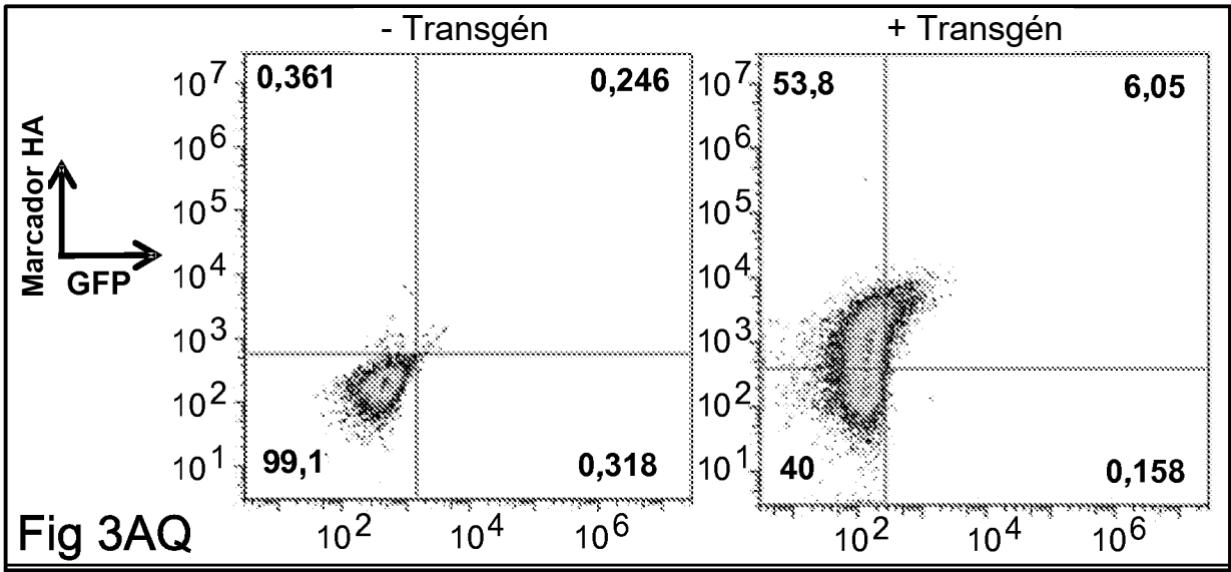


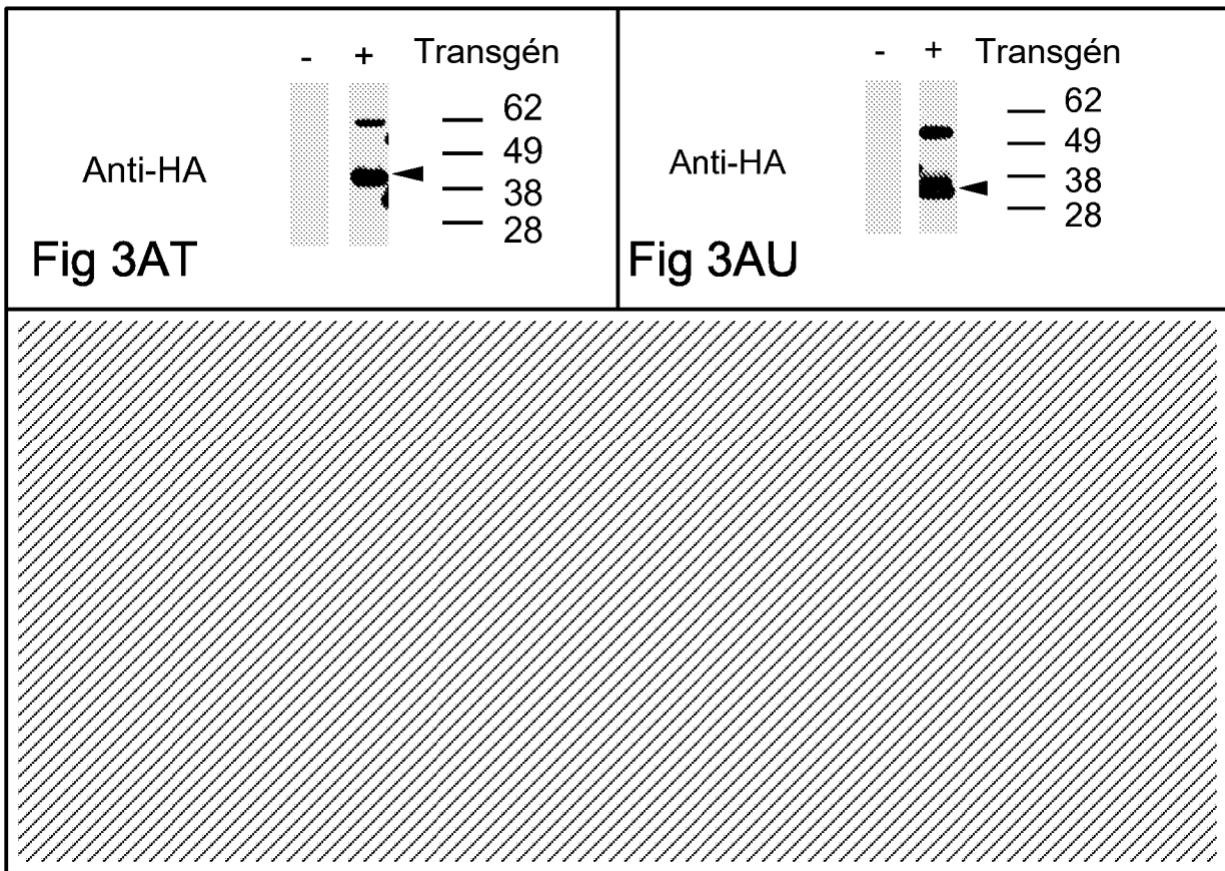












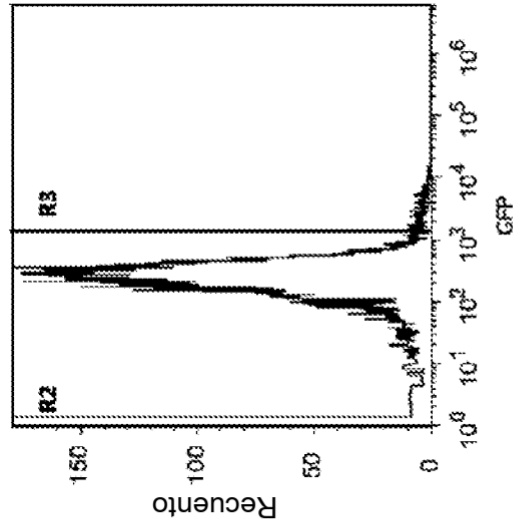


Fig 4C

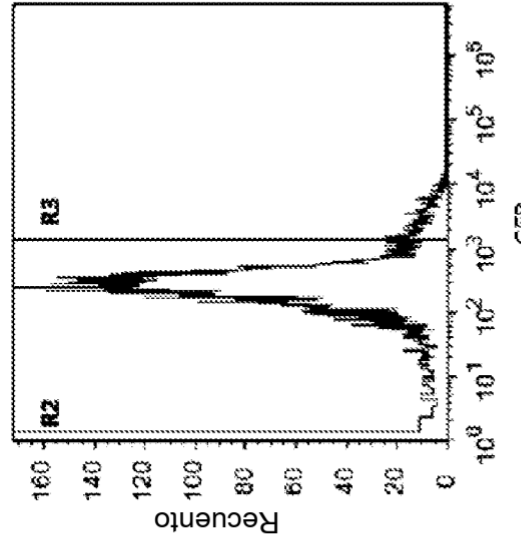


Fig 4B

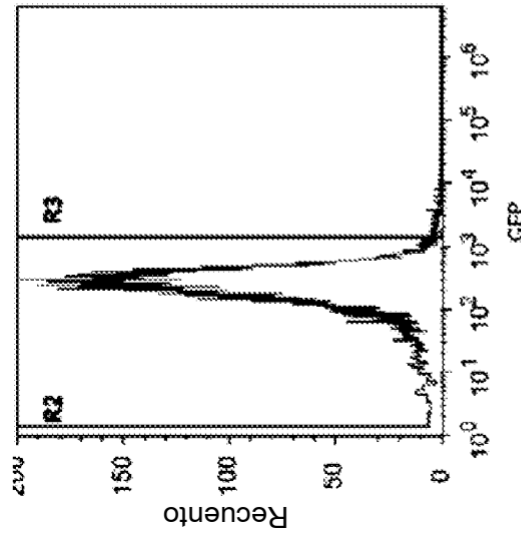
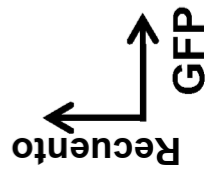


Fig 4A



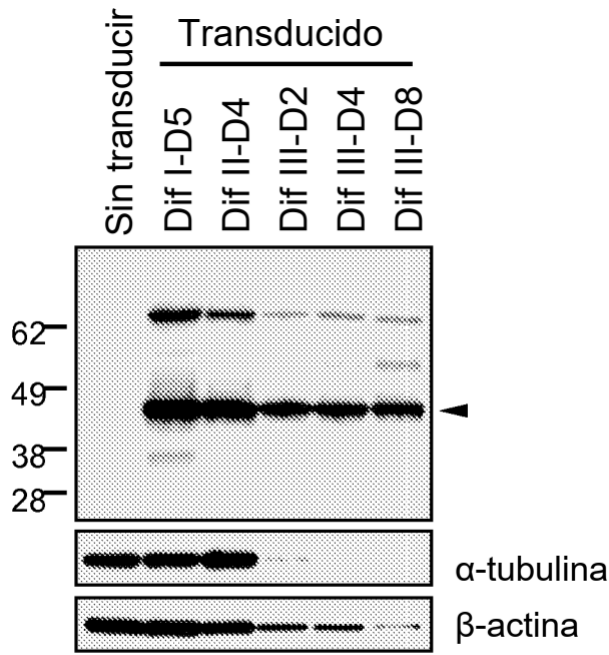


Fig 5A

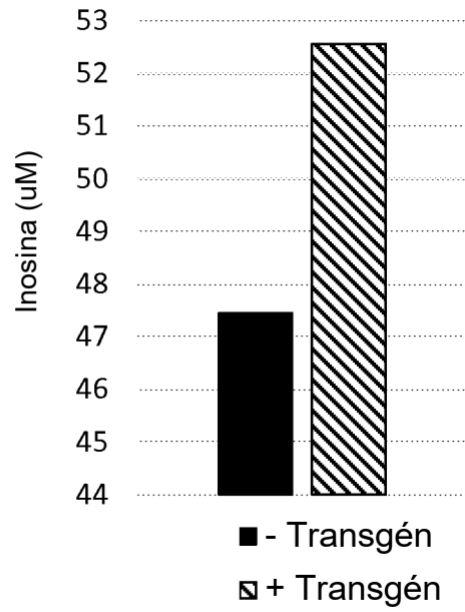


Fig 5B

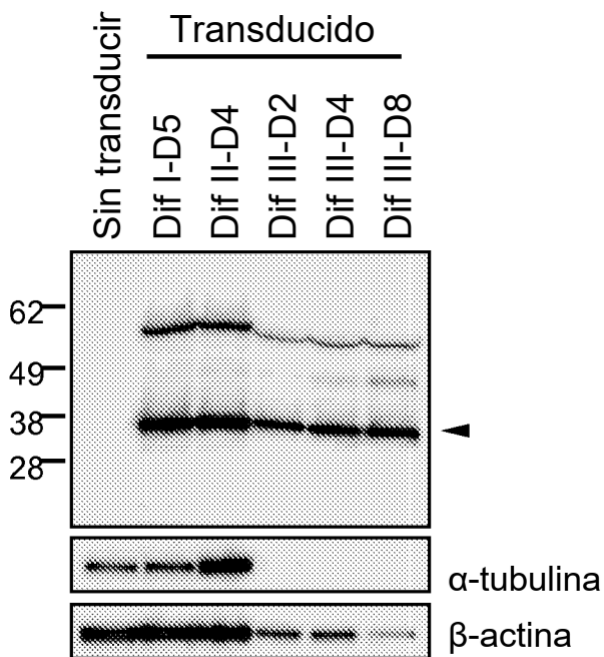


Fig 5C

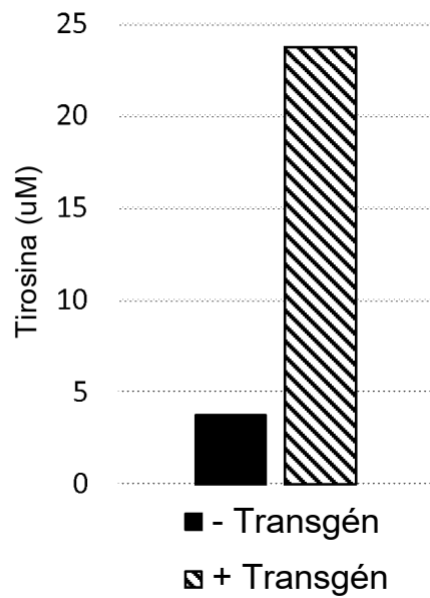


Fig 5D

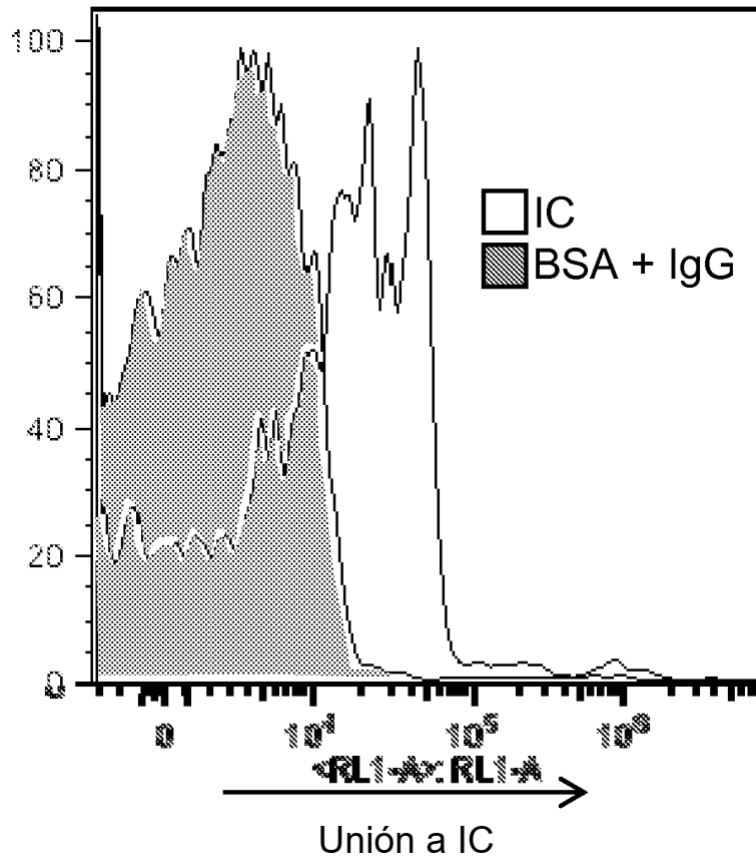


Fig 6A

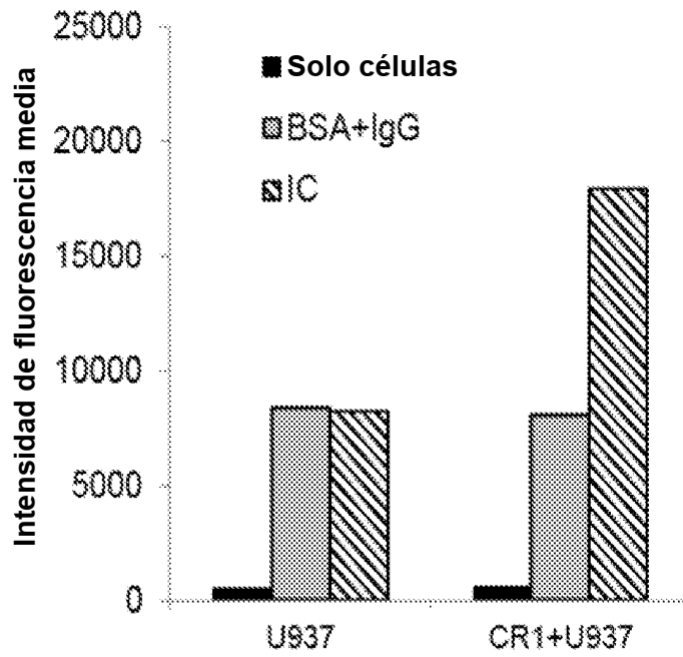


Fig 6B

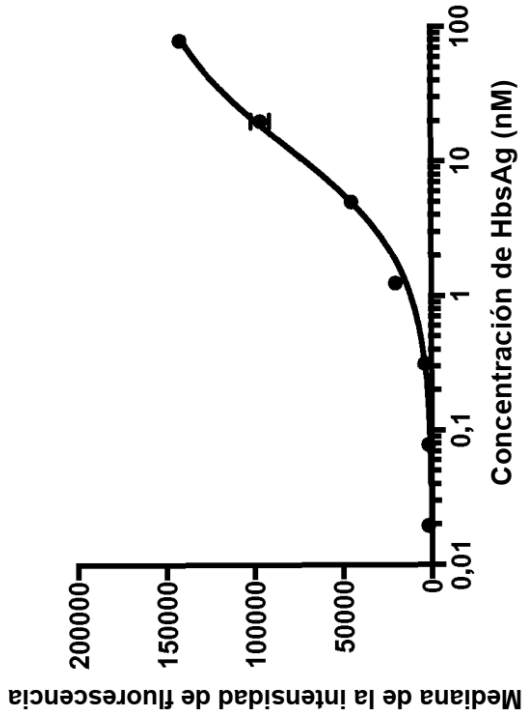


Fig 7B

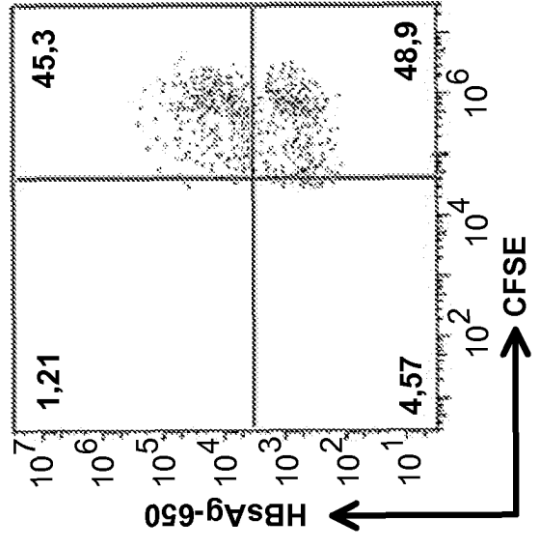


Fig 7D

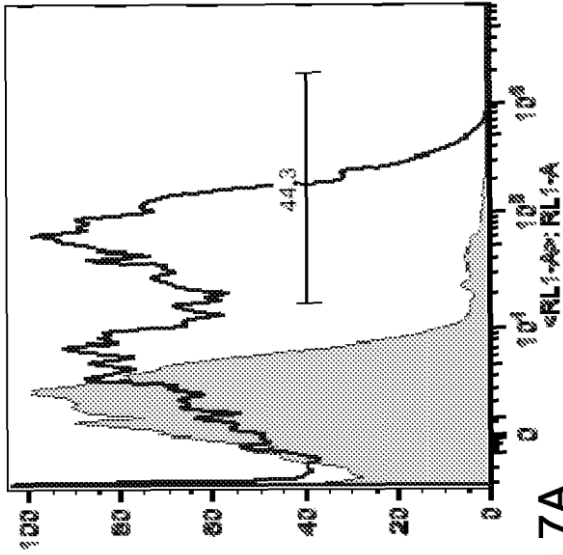


Fig 7A

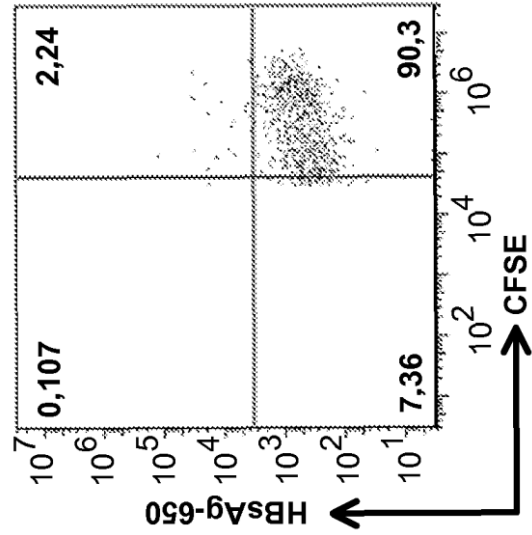


Fig 7C

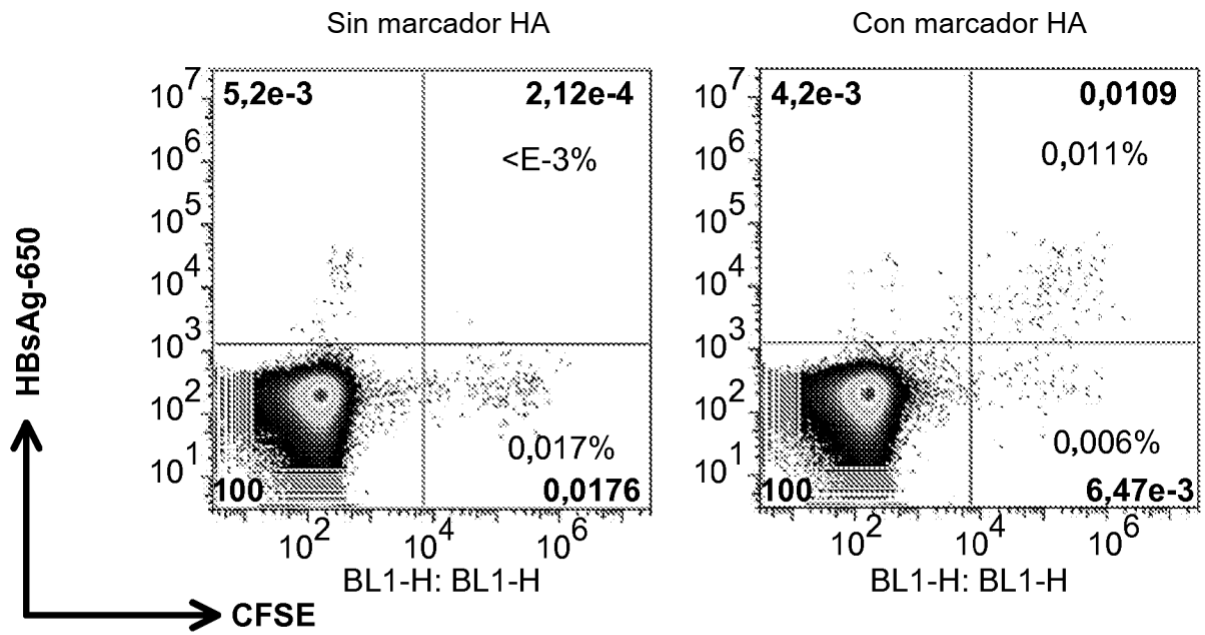


Fig 8A

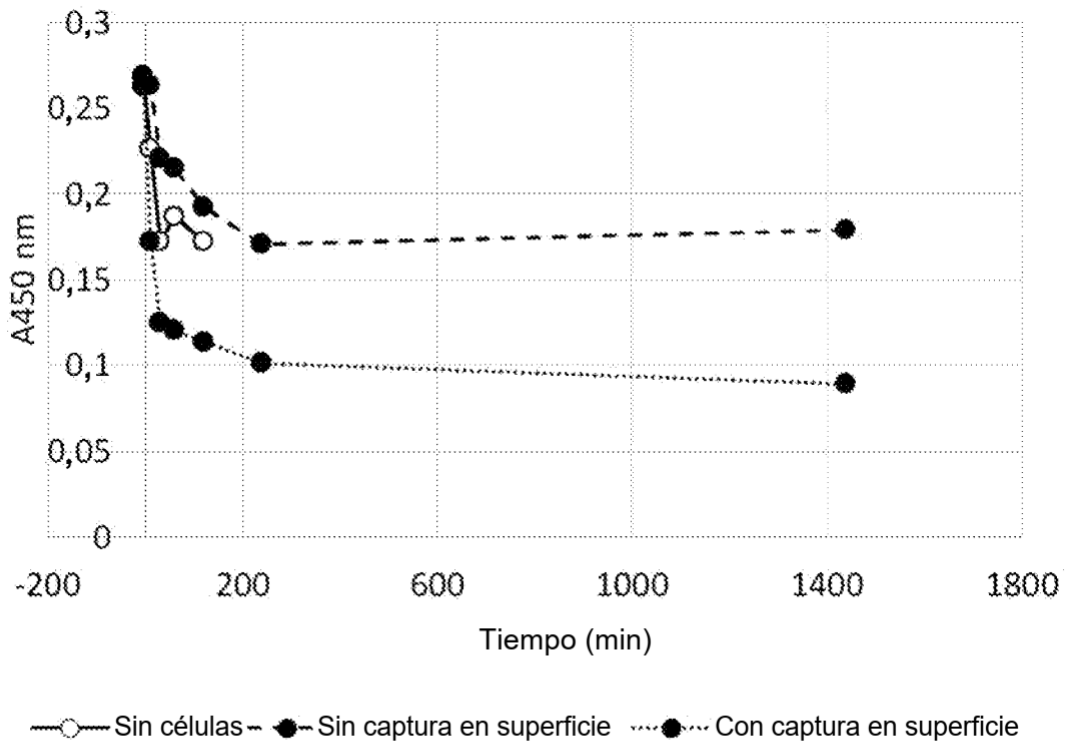


Fig 8B

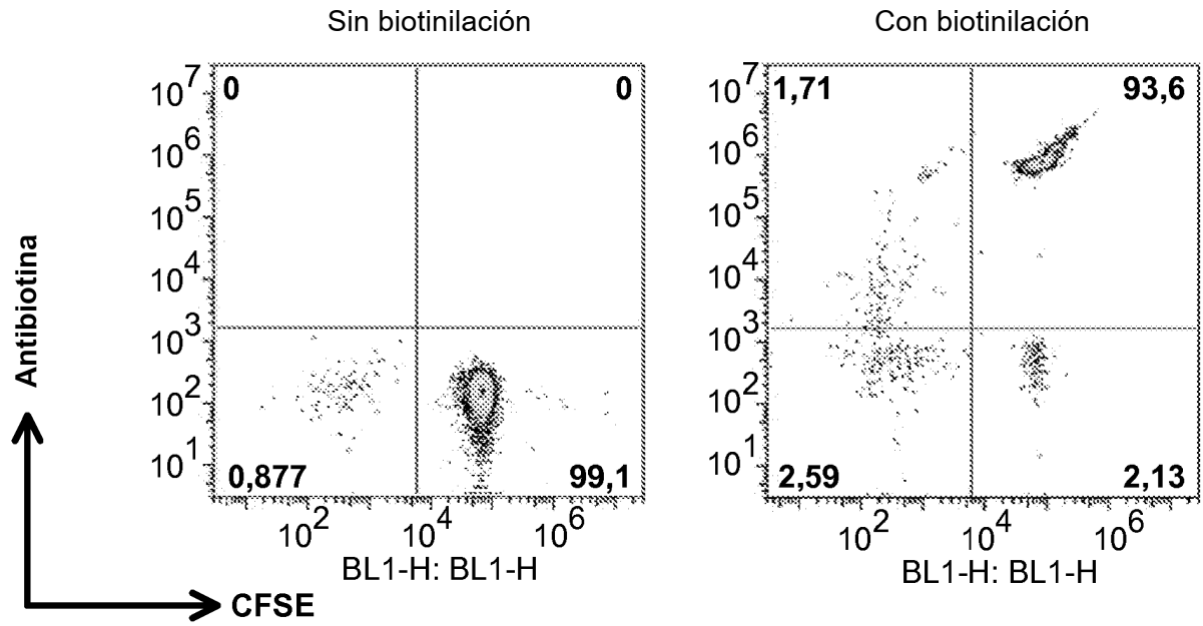


Fig 8C

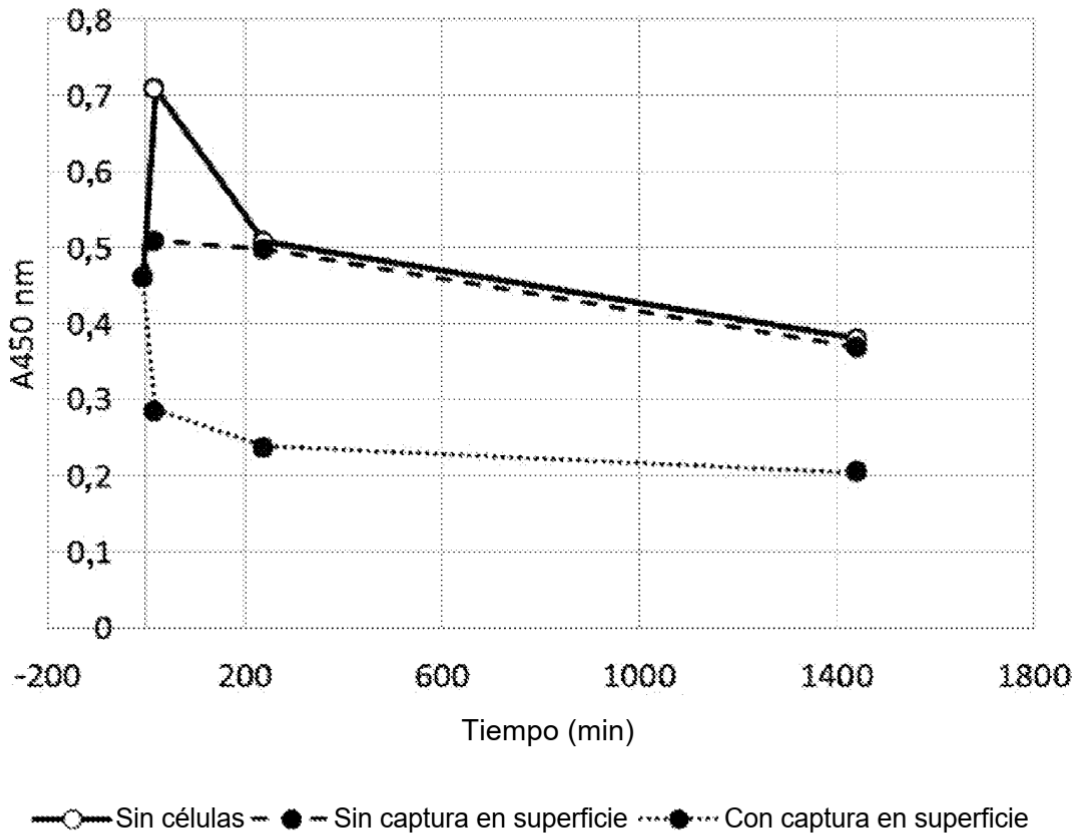


Fig 8D

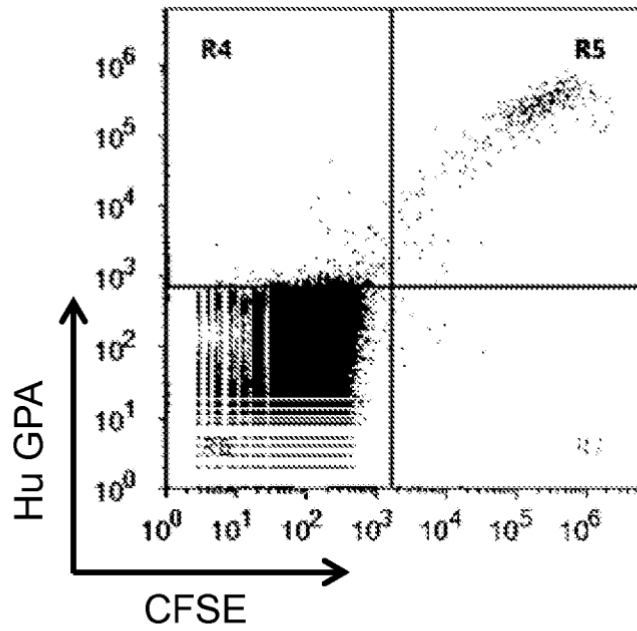


Fig 9A

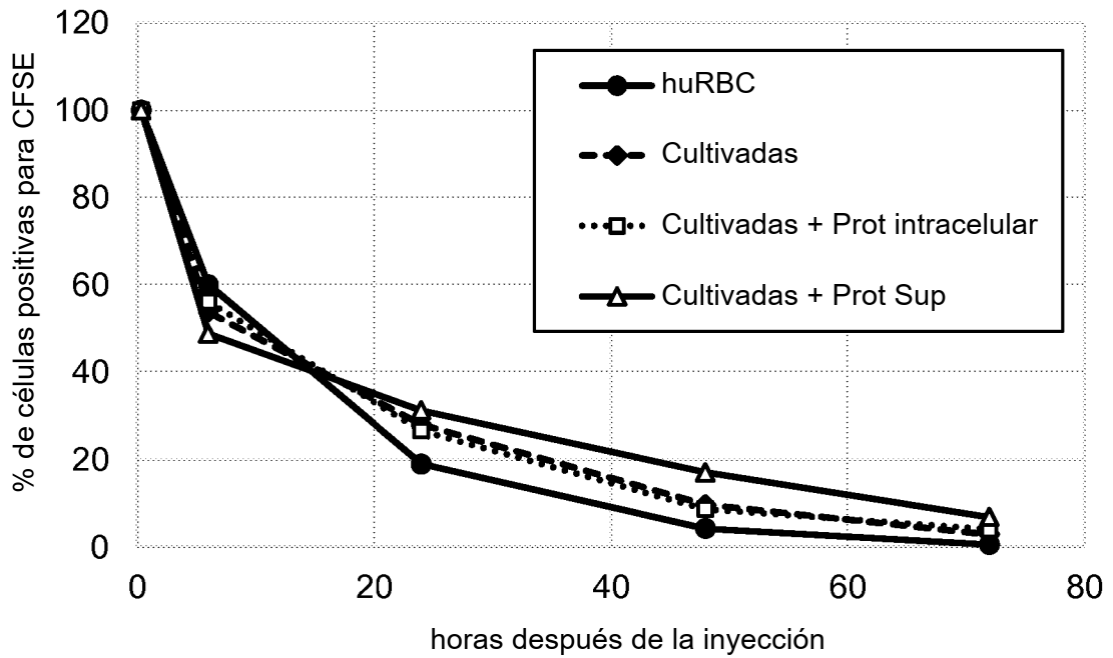


Fig 9B

Fibrinopéptido A

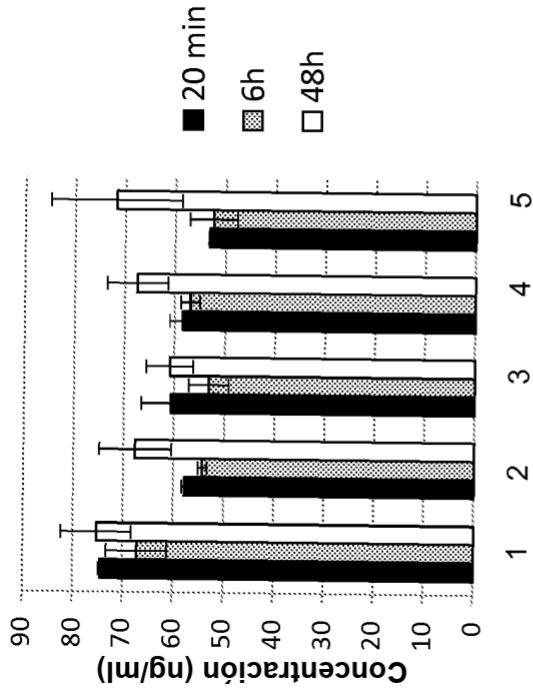


Fig 10A

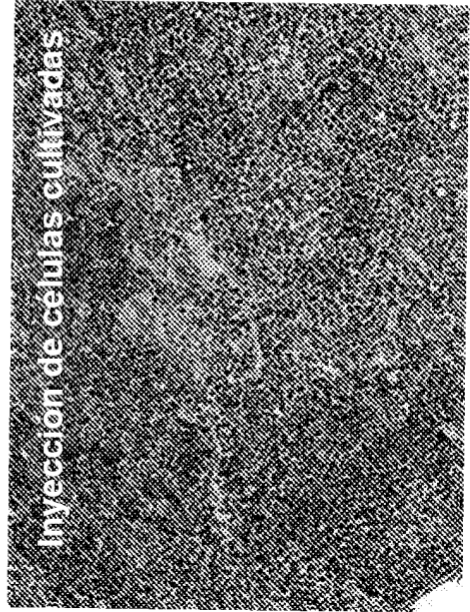


Fig 10C

Fibrinopéptido B

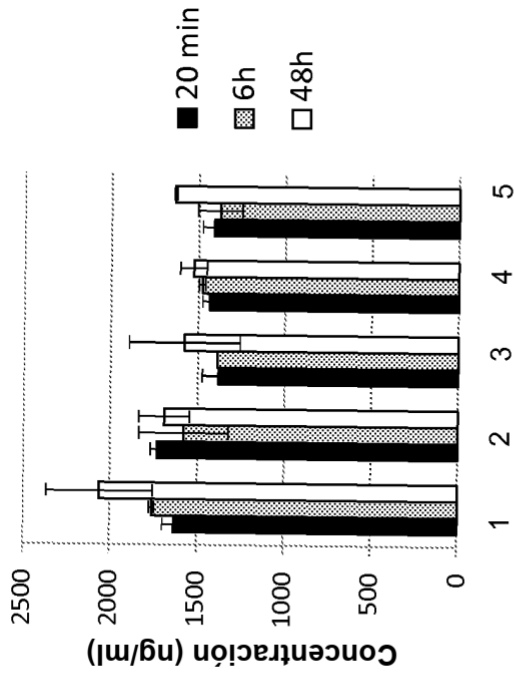


Fig 10B

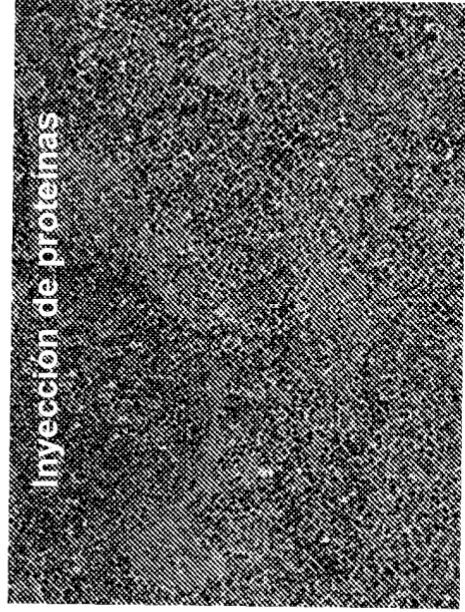


Fig 10D

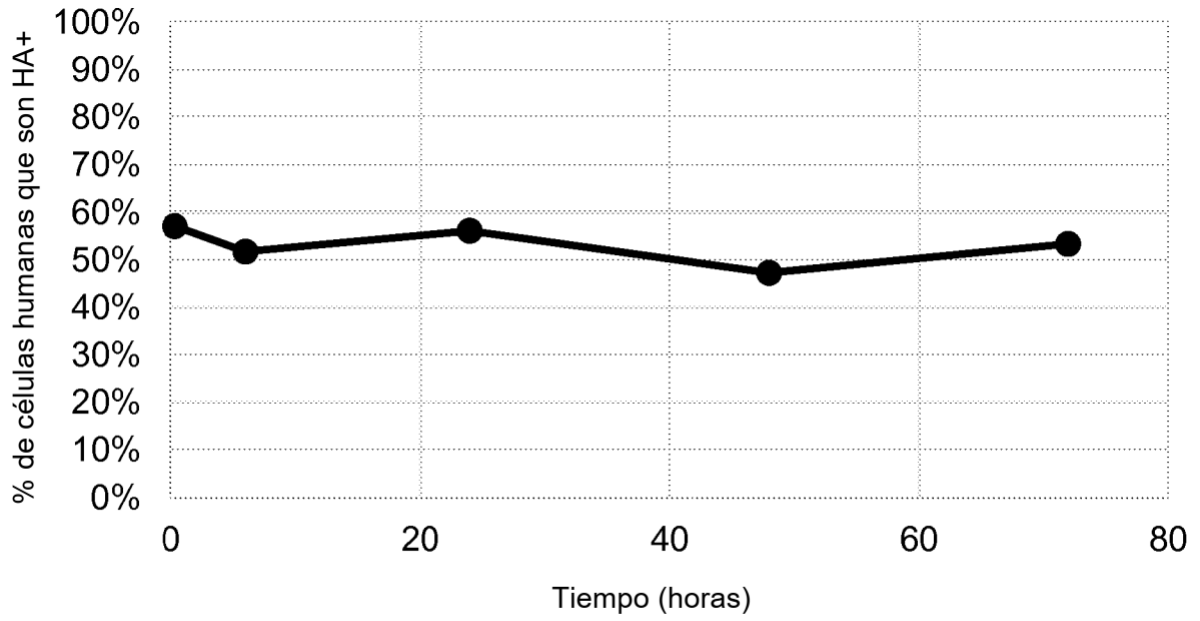


Fig 11A

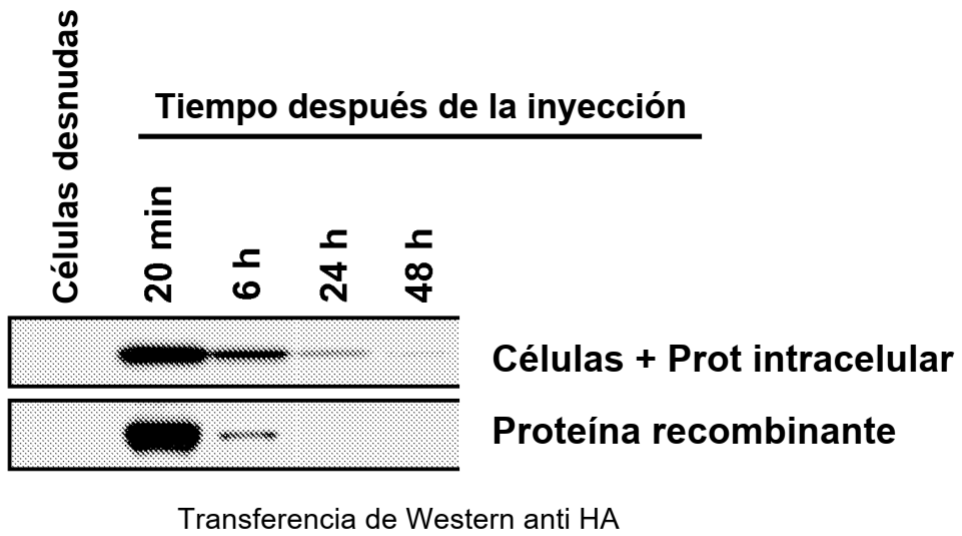


Fig 11B

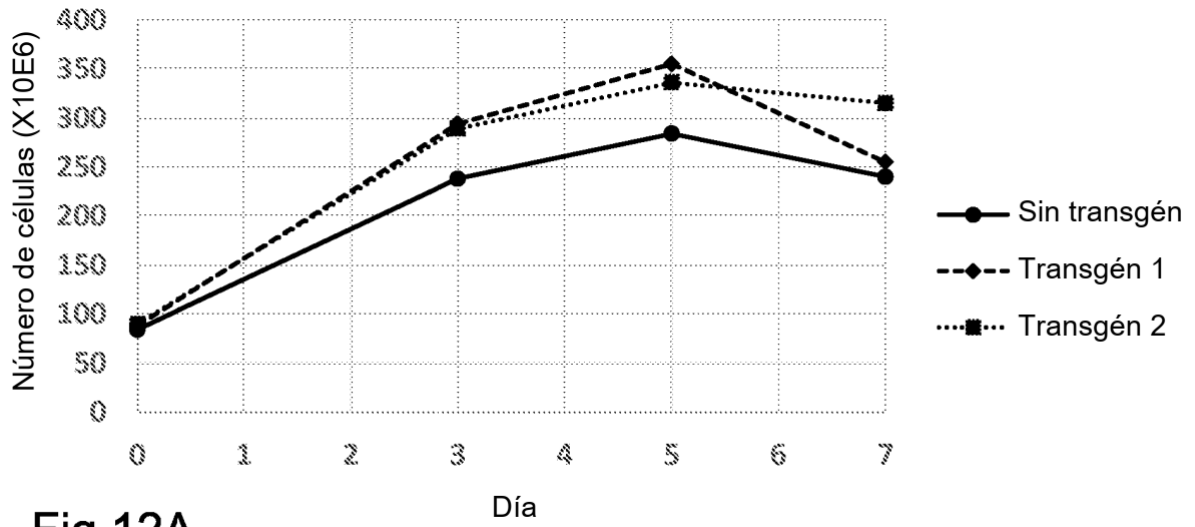


Fig 12A

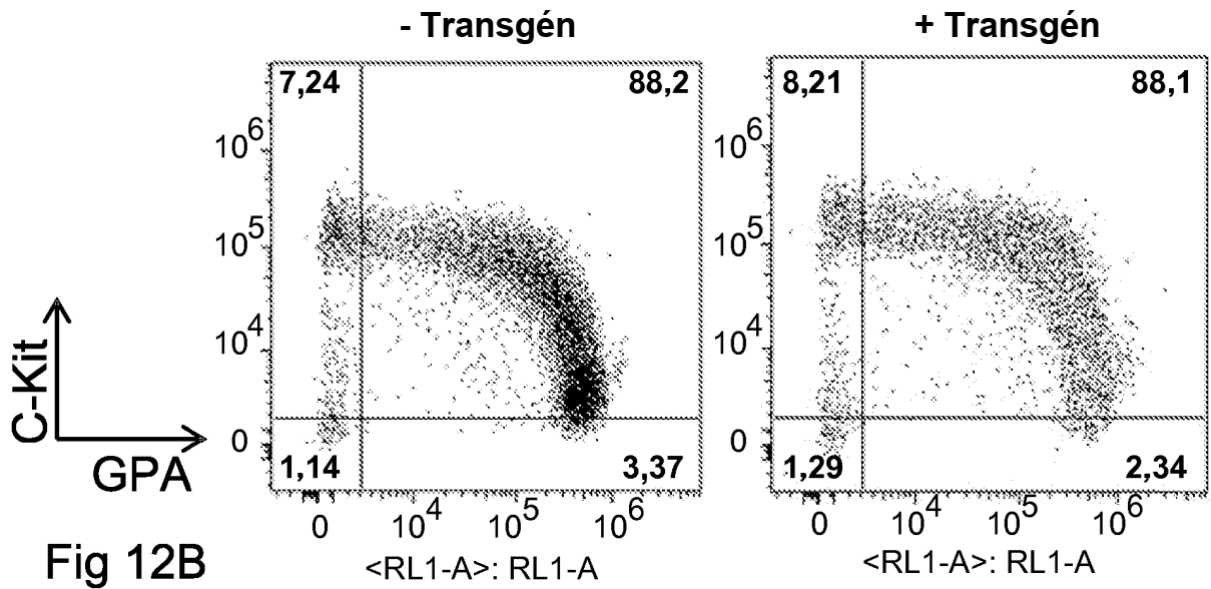


Fig 12B

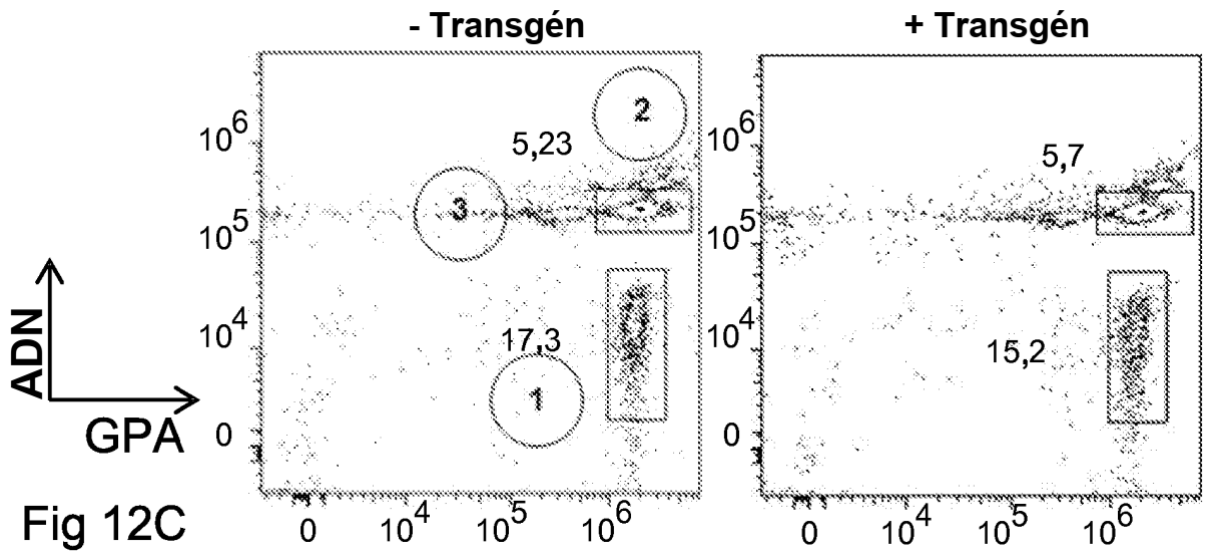


Fig 12C

Procedimientos de expresión de antígeno exógeno

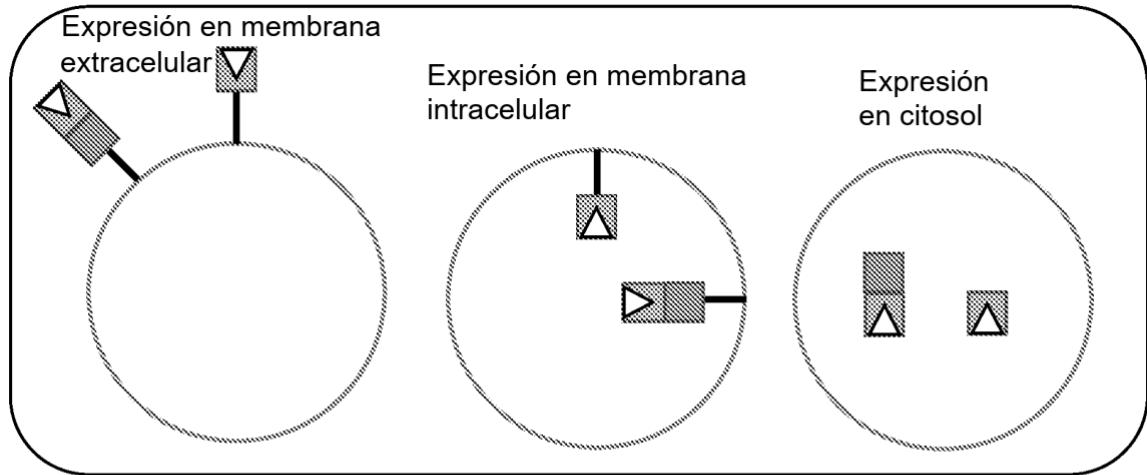


Fig 13A

Procedimientos de eliminación de la circulación

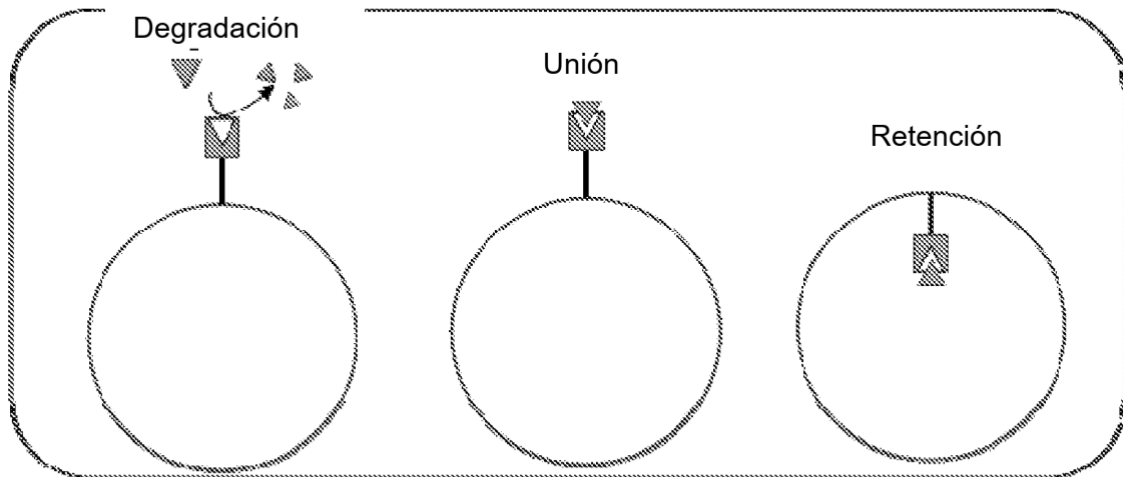


Fig 13B

Ejemplo de fusión autocatalítica

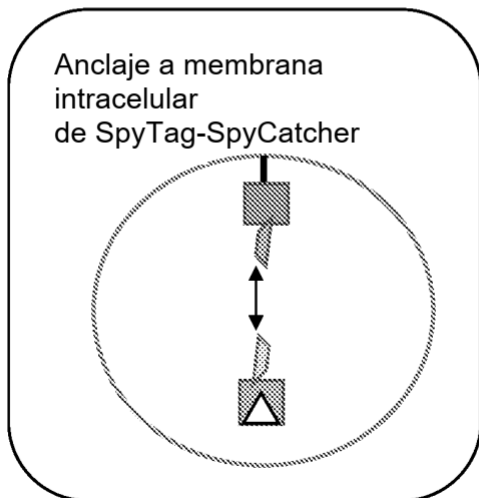


Fig 13C

Leyenda

- Diana
- Antígeno exógeno
- Anclaje polipeptídico endógeno
- SpyTag
- SpyCatcher
- Célula hematopoyética desnucleada