



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 187**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/113** (2006.01)  
**A61K 31/7105** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02746963 .4**  
96 Fecha de presentación : **10.07.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1414996**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

54 Título: **Procedimientos para la modificación genética de las células progenitoras hematopoyéticas y utilizations de las células modificadas.**

30 Prioridad: **10.07.2001 US 304127 P**  
**10.07.2001 US 304283 P**  
**21.12.2001 US 343484 P**  
**04.06.2002 US 386063 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.05.2011**

73 Titular/es:  
**JOHNSON & JOHNSON RESEARCH Pty. LIMITED**  
**Australian Technology Park Level 4**  
**1 Central Avenue**  
**Eveleigh, NSW 1430, AU**

72 Inventor/es: **Symonds, Geoffery, P.;**  
**Amado, Rafael;**  
**Sun, Lun-Quan;**  
**MacPherson, Janet;**  
**Fanning, Greg y**  
**Gerlach, Wayne**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 358 187 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

5 En la presente solicitud se hace referencia a varias publicaciones entre paréntesis. Las citas completas de estas publicaciones pueden encontrarse ordenadas alfabéticamente a la conclusión de la memoria inmediatamente anterior a las reivindicaciones. La referencia a estas publicaciones en la presente solicitud se proporciona con el fin de describir con mayor detalle el estado de la técnica al que pertenece la presente invención.

### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la terapia génica, particularmente como la aplicada a las células hematopoyéticas progenitoras (HP), a las células transducidas y a los procedimientos para su obtención, y a los procedimientos de utilización.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La terapia génica se refiere a la utilización de secuencias genéticas y su introducción en células para alterar la constitución genética de las células y por lo tanto cambiar las propiedades o funcionamiento de dichas células. La terapia génica puede ser utilizada, por ejemplo, para corregir un defecto genético proporcionando a las células una buena copia de un gen que funcione como se desee, o para proporcionar un gen que codifique para un ARN o proteína que inhiba una actividad celular o patológica indeseable.

15 La terapia génica puede dirigirse a cualquiera de entre una variedad de enfermedades en las cuales exista un aspecto genético. Resultan de interés particular las enfermedades de los sistemas sanguíneo o inmune, puesto que las células hematopoyéticas son relativamente fáciles de recoger en un sujeto, permitiendo que sean usados los procedimientos *ex vivo*. Comprenden hemoglobinopatías, defectos de la producción o función de los leucocitos, deficiencias inmunes, enfermedades de almacenamiento lisosomal y defectos de células troncales como la anemia de Fanconi, enfermedad granulomatosa crónica, enfermedad de Gaucher, eficiencia de G6PD, etc. Muchos de esos trastornos han sido tratados exitosamente mediante trasplantes de células de médula ósea alogénicos (Parkman 1986). Sin embargo, el requerimiento de supresión inmune u ocurrencia de efectos inmunológicos como el rechazo de injertos es una desventaja del trasplante de médula ósea alogénico. La terapia génica de células hematopoyéticas troncales ha sido sugerida como medio alternativo para tratar enfermedades que afecten al sistema hematopoyético en humanos.

20 A pesar del primer éxito prometedor en la terapia génica en humanos, el éxito clínico ha sido muy difícil de lograr a pesar del esfuerzo masivo en la última década (Mountain, 2000). Esto se debe por lo menos en parte a las bajas eficiencias de transferencia de genes, una incapacidad por modificar suficientes células, una incapacidad por dirigir los tipos de células apropiados, y una falta de persistencia del efecto deseado en los sujetos humanos.

25 Se ha demostrado la dificultad de poner en práctica la terapia génica de las células hematopoyéticas troncales humanas (HS) (Kohn et al 1998, Halene y Kohn 2000, Kume et al 1999). En la mayoría de los ensayos en humanos, el nivel de leucocitos en sangre periférica que contienen el gen ha sido bajo y han vivido un corto tiempo, sugiriendo una falla en la transducción de células HS reconstituyentes (Bordignon et al 1995, Kohn 1995, Kohn et al 1998, Dunbar et al 1995, Hoogerbrugge et al 1996). Esto se relaciona en parte con las relativamente pocas HS y células hematopoyéticas progenitoras (HP) en el cuerpo (Bertolini et al 1998, Reis 1999) y el requerimiento de que las células sean activadas cuando se usen algunos de vectores retrovirales murinos para la transducción. Esto se relaciona con el bajo nivel de receptores anfitrión en células HS humanas en reposo (Bodine et al 1998). La mayoría de las células HS humanas están en reposo, responden de manera relativamente lenta a estímulos (Hao et al 1996, Gothot et al 1998) y cuando son inducidas a dividirse, deben perder la capacidad de repoblación a largo plazo (Traycoff et al 1998). Casi todos los intentos de terapia génica en humanos usando células HS hasta ahora han presentado dos problemas básicos: números insuficientes de células HS que sean totipotentes y que puedan haber sido transducidas en un injerto a largo plazo para tener un efecto terapéutico, y en segundo lugar, las células transducidas no han persistido en proporcionar células hematopoyéticas modificadas a largo plazo.

30 El ensayo más prometedor de terapia génica en células HP humanas implicó la transferencia de un gen en un niño con inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X (SCID) que condujo la reconstitución de un sistema inmune con linfocitos T que contenían el gen (Cavazzana-Calvo et al 2000; Hacein-Bey-Abina et al 2002). Ese ensayo usó células CD34<sup>+</sup> de médula ósea de pacientes pediátricos (< 12 meses) y proporcionó más de 10<sup>6</sup> células transducidas por kg. El número de células CD34<sup>+</sup> (por kg de peso) que puede ser aislado de niños, particularmente de bajo peso, es mucho mayor que en los adultos. La timopoyésis es también más activa en niños. Además, este estudio es inusual dado que la quimipoyésis en el contexto SCID-X1 resulta únicamente de células CD34<sup>+</sup> que contienen el gen exógeno (Cavazzana-Calvo et al 2001). De alguna manera, este estudio es análogo a los que presentan la mieloablación dado que las células infundidas pueden llenar el espacio fisiológico que no es ocupado en el paciente SCID. Los primeros estudios con trasplante de médula ósea alogénicos mostraron que el injerto de células HS no se sostuvo en pacientes que no fueron sometidos a mieloablación, principalmente debido a la presencia continua de las células HS en el receptor (Parkman 1986). Por lo tanto, las conclusiones extraídas de los estudios de injerto anteriores usando células HS humanas en el contacto ablativo no pueden ser transferidas simplemente a los sistemas no ablativos.

Otros informes de ensayos clínicos en humanos para la terapia génica de células hematopoyéticas progenitoras son menos positivos. Kohn et al 1999 informaron de resultados de un ensayo clínico usando células CD34<sup>+</sup> derivadas de médula ósea de pacientes pediátricos (8-17 años) transducidas con un gen que codifica para una RRE señuelo (molécula de ARN) contra el VIH. Este ensayo no logró una transducción significativa y el injerto de células progenitoras.

5 En otro ensayo, fueron tratados pacientes con cáncer de mama u ovario con células HP después de la transducción con un gen marcador, después de la mieloablación, pero únicamente se observó la presencia transitoria de células marcadas (Bagnis et al 2002). Un ensayo clínico que incluyó 3 pacientes con la enfermedad de Gaucher mostró la presencia del vector que contenía el gen en sangre periférica y médula ósea hasta 3 meses después de la infusión pero a niveles muy bajos (Dunbar et al 1998). En otro ejemplo, se llevó a cabo un ensayo con cinco pacientes que padecían la enfermedad granulomatosa crónica (CGD) en el que fue introducido el gen p47phox en células CD34<sup>+</sup> de sangre periférica. Aunque se encontraron neutrófilos corregidos en la sangre periférica durante los primeros meses después de la infusión, no fueron detectables a los seis meses después de la infusión (Malech et al 1997). Además, un ensayo para corregir la anemia de Fanconi donde se insertó el gen C del grupo de complementación en células CD34<sup>+</sup> dio como resultado únicamente una detección transitoria del gen en pacientes después de la infusión (Liu et al 1999).

15 Los pobres resultados en esos ensayos pueden reflejar la ausencia de una ventaja de supervivencia de las células corregidas en comparación con las células no corregidas, en contraste con el caso de SCID ligada al cromosoma X. Además, la mayoría de esos ejemplos, las poblaciones de células manipuladas fueron administradas a pacientes con o sin mieloablación parcial, requiriendo que las células transducidas compitieran con las células troncales residentes que se deben injertar.

20 También pueden actuar otros factores. Las células HS pueden ser reducidas en número en pacientes con infección por VIH (Maradin et al 1996), dificultando la obtención de un número suficiente de esas células. Además, las células HS de individuos infectados por VIH están comprometidas en su reproducción y capacidades clonogénicas y muestran una mayor propensión a la apoptosis (Vignoli et al 1998, Zauli et al 1996). La movilización de células HP de sangre periférica usando el factor estimulante de la colonia de los granulocitos (G-CSF) fue demostrada en individuos infectados por VIH (Law et al 1999). La movilización máxima fue lograda después de 4 días de administración de G-CSF. El producto de la leucaferesis contuvo aproximadamente  $3 \times 10^5$  células CD34<sup>+</sup> por kg. Law et al no transdujeron las células CD34<sup>+</sup> aisladas ni demostraron que las células CD34<sup>+</sup> aisladas pudieran ser injertadas en un sujeto a largo plazo. Simplemente especulan sobre la posibilidad de que la terapia génica de las células HP proporcione una cura para la infección por VIH. Exponen asimismo que el debate sobre el número de células troncales requeridas para la terapia génica del SIDA es prematuro debido a la existencia de mucha incertidumbre, incluyendo el potencial de injerto de las células modificadas genéticamente, la necesidad de quimioterapia, la necesidad de mieloablación o no, el requisito que consiste en establecer un nicho para las células infundidas, y la respuesta desconocidas del microambiente en la médula de pacientes con SIDA después de la infusión de las células.

35 El número mínimo de células CD34<sup>+</sup> de sangre periférica requerido para la restauración eficiente del sistema hematopoyético, particularmente la recuperación de las plaquetas, en el contexto de la mieloablación se ha sugerido que es de  $2.0 \times 10^6$  células por kg de peso de un sujeto (Zimmerman 1995). Sin embargo, el número requerido para el injerto eficiente cuando no se efectúa mieloablación era desconocido anteriormente a la presente invención. Se desconocía si se había establecido un "nicho" para las células infundidas, o el efecto de la competencia, de células residentes en la médula. Como se mencionó anteriormente, esto resultó particularmente cierto en el contexto de la infección por VIH.

40 Muchos estudios han utilizado sistemas en animales modelo, particularmente en ratones, para mejorar los procedimientos de transducción e incrementar el injerto. Sin embargo, aunque las células HS murinas pueden ser transducidas eficientemente con vectores retrovirales, los esfuerzos para traducir los hallazgos del sistema murino en aplicaciones para células HS humanas han revelado mayores dificultades (Halene y Kohn 2000; Richter y Karlson 2001).

45 Una dificultad más para la aplicación terapéutica de la terapia génica estriba en los procedimientos de escalamiento para obtener números suficientes de células transducidas (Schilz et al, 2000). Schilz et al midieron la eficiencia de la transducción y un injerto en un modelo de ratón, pero no está claro como pueden aplicarse las conclusiones a sujetos humanos.

Cada uno de esos factores es resuelto o tratado por la presente invención.

### **SUMARIO DE LA INVENCION**

50 La presente invención proporciona una composición para su utilización en el tratamiento de la infección por VIH en un sujeto humano, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y por lo menos  $1.63 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal del sujeto humano a quien va ser administrada, siendo por lo menos  $0.52 \times 10^6$  de esas células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> más transducidas por un constructo viral que expresa un agente anti VIH y en la que las células CD34<sup>+</sup> transducidas pueden ser injertadas, dando lugar a células de progenie durante por lo menos 12 meses, en el sujeto.

55 La presente descripción da asimismo a conocer un procedimiento para insertar en células hematopoyéticas de un sujeto humano un gen de interés, que comprende:

- a) movilizar las células hematopoyéticas progenitoras CD34<sup>+</sup> en la sangre del sujeto humano;
- b) aislar los leucocitos del sujeto por aféresis;
- c) aislar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de los leucocitos aislados por un procedimiento inmunoselectivo;
- 5 d) someter las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de la etapa c) a un proceso de transducción con un gen de interés en presencia de un agente que colocalice las células con un vector de transducción;
- e) determinar el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> después de la etapa d), y si el número total es de por lo menos  $1.63 \times 10^6$  células por kg de peso corporal del sujeto humano, entonces proceder a la etapa f), y si el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> después de la etapa d) es inferior a  $1.63 \times 10^6$  por kg de peso corporal del sujeto humano, entonces efectuar por lo menos las etapas b)-d) y combinar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>; y
- 10 f) proporcionar al sujeto las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>, insertando por lo tanto en las células hematopoyéticas del sujeto un gen de interés.

La presente invención proporciona además la utilización de una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y por lo menos  $1.63 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal del sujeto humano a quien va a ser administrada la composición, siendo por lo menos  $0.52 \times 10^6$  de esas células CD34<sup>+</sup> por kg transducidas por un constructo viral que expresa un agente anti-VIH, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del sujeto humano infectado con VIH, en la que las células CD34<sup>+</sup> transducidas pueden ser injertadas, dando lugar a células de progenie durante por lo menos 12 meses, en el sujeto.

15

La presente descripción da a conocer además un equipo que comprende

- a) una cantidad de un agente que puede movilizar células hematopoyéticas progenitoras en un sujeto humano;
- 20 b) un medio de cultivo que incluye por lo menos una citocina aceptable para cultivar células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>;
- c) un vector retroviral que comprende nucleótidos que tienen una secuencia que en una célula da lugar a una ribozima que tiene la secuencia 5' - UUA GGA UCC UGA UGA GUC CGU GAG GAC GAA ACU GGC UCC - 3' (Rz2); y
- d) recipientes de cultivo tisular recubiertos sobre su interior con un fragmento de fibronectina recombinante. Un paquete que comprende el equipo y las instrucciones para su utilización y proporcionado asimismo por esta invención.
- 25

### **BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS**

#### **Figura 1(A). Ciclo de reproducción de un retrovirus típico.**

- (A) El virus se une a los receptores de la superficie celular sobre la célula diana y el ARN genómico entra a la célula diana después de la fusión y descubrimiento viral.
- (B) Ocurre la transcripción inversa dando como resultado la conversión del ARN viral en ADNc.
- (C) El ADNc entra al núcleo y es convertido a una forma circular.
- (D) El ADNc resulta entonces integrado en el genoma de la célula hospedadora.
- (E) Transcripción del provirus para producir ARN viral y ARNm.
- 35 (F) La traducción produce proteínas virales.
- (G) Se forma el núcleo viral a partir de las proteínas codificadas viralmente y el ARN viral empaquetado.
- (H) El núcleo obtiene una membrana y sale de la célula brotando a través de la membrana celular.

**Figura 1 (B). Modo de acción propuesto por la invención.** La ribozima puede actuar como cualquiera de varios puntos en el ciclo de vida del virus VIH-1. Esta puede escindir el ARN genómico después del descubrimiento y antes de la transcripción inversa, o puede escindir transcritos virales en el núcleo o citoplasma para inhibir la traducción de proteínas virales, o puede escindir al ARN genómico recién formado antes de o durante el montaje.

40

**Figura 2. Racionalización científica para la utilización de la transferencia del gen de ribozima para tratar VIH/SIDA. A.** Las células hematopoyéticas progenitoras CD34<sup>+</sup> normales dan lugar a linfocitos y monocitos/macrófagos que pueden ser infectados por VIH-1 y esas células infectadas generan partículas de VIH-1 antes de secarse. B. Las células hematopoyéticas progenitoras CD34<sup>+</sup> transducidas con el gen de ribozima dan lugar a linfocitos y monocitos/macrófagos que expresan el gen de ribozima. La ribozima terapéutica escinde el ARN del VIH-1 e inhibe la

45

reproducción del VIH-1 en esos dos tipos de células clave.

**Figura 3. Esquema de la hematopoyesis.** Las células hematopoyéticas progenitoras CD34<sup>+</sup> dan lugar a células de mayor madurez a través de células progenitoras intermedias. Las células claves en términos de la infección por VIH/SIDA son linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los monocitos/macrófagos (con asterisco). Todas las células representadas esquemáticamente son células hematopoyéticas.

**Figura 4. Localización del sitio diana Rz2.** A: Esquema del genoma de VIH-1 que representa la localización de los genes reproductores, reguladores y accesorios. B: muestra la secuencia de ribozima junto con la diana complementaria y la secuencia hibridante dentro del gen *tat*. La escisión se produce inmediatamente 3' del triplete GUA. C: representa la localización de la secuencia diana de GUA en los genes que codifican para las proteínas Tat y Vpr.

**Figura 5. Representación esquemática del Ensayo Clínico en Fase I de CD34<sup>+</sup>.** Integrado por diez sujetos con infección por VIH-1. Se introdujeron por separado los vectores LNL6 y RRz2 en células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> autólogas. Ambas poblaciones de células fueron infundidas a los pacientes sin tratamiento por mieloablación.

**Figura 6. Efecto de la retronectina sobre la transducción.** Representa esquemáticamente cómo la retronectina facilita la transducción retroviral disponiendo las células CD34<sup>+</sup> en la proximidad del vector retroviral.

**Figura 7. La presencia y expresión del vector a largo plazo.** Se efectuó un análisis por PCR semicuantitativo en subconjuntos de leucocitos utilizando cebadores dirigidos contra el gen neo<sup>R</sup> que se superpone a la secuencia de Rz2 en el vector RRz2. Los productos de la PCR para el LNL6 y el RRz2 son 174 y 216 pares de bases respectivamente, e incluyen un tracto del término no traducido del gen neo<sup>R</sup>. La figura 7A es una gráfica que representa que las secuencias de los vectores LNL6 y RRz2 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células mononucleares de médula ósea (BMMC), linfocitos T y monocitos en 5 pacientes de dos años después de la infusión de células CD34<sup>+</sup> transducidas. La figura 7B es una gráfica que representa la expresión a corto y largo plazo de LNL6 y RRz2 en PBMC en 3 pacientes representativos, de acuerdo a lo medido por RT-PCR. La expresión fue evaluada en una reacción en cadena de la polimerasa anidada con transcriptasa inversa (RT+) un cebador marcado radioactivamente. Por cada muestra, se incluyó una reacción que no contenía transcriptasa inversa (-RT). La figura 7C es una gráfica de detección de las secuencias de vector en linfocitos T indiferenciados. El gel muestra el análisis por PCR para las secuencias de los vectores LNL6 y RRz2 en linfocitos T de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y en subconjuntos de linfocitos T indiferenciados seleccionados de sangre periférica en 2 años del paciente 7 después de la infusión de células CD34<sup>+</sup> transducidas. Las figuras 7D, 7E y 7F representan la detección de secuencias de vector en linfocitos T indiferenciados. El gel representa los resultados de la PCR para las secuencias de los vectores LNL6 y RRz2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y en subconjuntos de linfocitos T indiferenciados seleccionados de sangre periférica en 3 pacientes. Las secuencias de los vectores fueron detectadas en subconjuntos de células T indiferenciadas tan rápido como a las cuatro semanas de la infusión (panel F), y la detección a largo plazo es mostrada en los paneles E y D, a los 2.5 y 2 años después de la infusión de células CD34<sup>+</sup> transducidas, respectivamente.

**Figura 8. Resumen de la detección del vector por PCR en 10 pacientes.**

Las células fueron examinadas por PCR para la detección del vector LNL6 o RRz2 hasta 36 meses después de la infusión. Los tipos de células fueron células mononucleares de médula ósea, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), granulocitos, linfocitos T y monocitos de acuerdo a lo indicado. Los datos son representados para cada paciente marcados en el eje Y. se observó un marcado del gen a largo plazo después de la utilización del fragmento de fibronectina (CH-296), provocando un incremento en la eficiencia de la transducción (véase la tabla 1). La presencia o ausencia de detección de vectores es indicada por círculos, independientemente del número de copias del vector: negro, ambos vectores detectados; abiertos, ningún vector detectado; círculos con bandas verticales, únicamente detectado del vector de ribozima; círculo con bandas horizontales, únicamente detectado el vector de control LNL6.

**Figura 9. Comparación entre la cinética de declinación del vector en linfocitos T y células mononucleares de médula ósea.** La comparación de la velocidad de declinación de las copias de vector a través de los linfocitos T y células mononucleares de médula ósea (BMMC) muestra mayor persistencia del marcado del RRz2 en linfocitos T en comparación con el LNL6, (A). El marcado del LNL6 es mostrado en (B). Las gráficas muestran que el nivel de marcado del vector representado como por ciento de línea basal, donde la línea basal es definida como el promedio del número de copias del vector a las semanas 4 y 12 para cada tipo de células (diamante y línea roja: linfocitos T, cuadrados abiertos y línea negra: BMMC). (C) y (D) muestran las gráficas que describen la relación lineal entre la dosis de célula CD34<sup>+</sup> transducidas RRz2, y la diferencia entre el número de copias entre LNL6 y RRz2 (índice de protección) en linfocitos T (C) y PBMC (D). (E), (F), (G) y (H) muestran la comparación entre la cinética de declinación del vector en linfocitos T y células mononucleares de médula ósea, y la correlación con la dosis de células CD34<sup>+</sup> transducidas infundida. La protección inducida por la ribozima contra la disminución de células relacionadas con el VIH fue evaluada comparando la declinación del ADN de los vectores RRz2 y LNL6 en células vulnerables y no vulnerables a la infección por VIH. El panel E muestra la detección de los vectores RRz2 y LNL6 por PCR en linfocitos T CD4<sup>+</sup> para el paciente 7 a los puntos temporales indicados. Los volúmenes de radioactividad para cada banda fueron normalizados a estándares conocidos ensayados en la misma reacción de PCR (no representado), y la relación de RRz2 a LNL6 (valores mostrados bajo cada gel) fueron representados gráficamente contra el tiempo (panel F). Como un control negativo para la protección de RRz2, la gráfica de BMMC (que contiene la mayoría de las células invulnerables a

la infección por VIH) se muestra en el panel F (geles de PCR no representados). Las tendencias con el tiempo en la relación de marcado de RRz2 al marcado de LNL6 fueron estimadas por relación lineal, con los valores de P reflejando la diferencia de una velocidad de cambio de 0 (esperado si el marcado de RRz2 y LNL6 decae a velocidades equivalentes). En este paciente, la relación de marcado de RRz2 a LNL6 en BMBC permaneció aproximadamente constante con el tiempo (pendiente= diferencia de -0.0005 de 0, P=.281). En contraste, el marcado de RRz2 se incrementó en relación al marcado de LNL6 con el tiempo en linfocitos T vulnerables al VIH (pendiente=0.0036, diferencia de 0, P = .008). La diferencia entre las líneas de tendencia fue estadísticamente significativa (P < .006). Para determinar si la magnitud de la declinación diferencial en el marcado del gen de LNL6 contra RRz2 para un paciente dado estaba relacionada con el número de células transducidas RRz2 infundidas, se correlacionó la diferencia entre las pendientes de declinación de cada vector (rango de spearman) con el número de células CD34<sup>+</sup> transducidas por RRz2 reintroducidas. Las pendientes de declinación específicas del paciente para el marcado de LNL6 y RRz2 fueron calculadas por regresión lineal, y la diferencia entre esas pendientes (RRz2 - LNL6) fue considerada un indicador de la protección mediada por RRz2. Los paneles G y H representan las gráficas que describen esta relación lineal y los intervalos de confianza (líneas punteadas) entre la dosis de células CD34<sup>+</sup> transducidas por RRz2, y la diferencia entre el número de copias de LNL6 y RRz2 (índice de protección) en los linfocitos T (gráfica H) y PBMC (gráfica G).

**Figura 10. Conteos absolutos de células CD4<sup>+</sup> (A) y cargas virales (B) en los pacientes de estudio.** Los conteos absolutos de célula CD4<sup>+</sup> por mm<sup>3</sup> (A) y cargas virales (B) en copias de ARN de VIH por ml de sangre se muestran para los pacientes Nos. 1-10 a través del estudio. Se observó un incremento inicial en la carga viral al día 1 después de la infusión en algunos pacientes, quienes discontinuaron la terapia antirretroviral durante el periodo de movilización. La discontinuación del fármaco o sustitución de inhibidores de transcriptasa inversa nucleosídica por inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídica o inhibidor de proteasa incluido en el protocolo para evitar la inhibición potencial de la transcriptasa inversa de MMLV durante la transducción. Los aumentos ocasionales de viremia fueron corregidos después de la modificación de la terapia antirretroviral.

**Figura 11. Marcado a largo plazo de población en células hematopoyéticas en el paciente #005 a partir del estudio de CD34<sup>+</sup> autólogas en fase I.** Se muestran en gel las bandas amplificadas de PCR de células marcadas con LNL6 y RRz2 en poblaciones de médula ósea y sangre periférica 2 años después de la infusión.

**Figura 12. Expresión del gen en células mononucleares de sangre periférica en 4 pacientes del estudio de células CD34<sup>+</sup> autólogas en fase I.** La expresión de ambos del LNL6 y el RRz2 es mostrada para 2 pacientes a los 2 años después de la infusión. La expresión fue evaluada en una reacción de PCR anidada con transcriptasa inversa utilizando un cebador marcado radioactivamente. Por cada muestra, se incluyó una reacción que no contenía RT (-RT). Es indicada la presencia o ausencia de RT.

**Figura 13. Marcado a largo plazo de subpoblaciones de linfocitos T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) en el paciente #007.** Los resultados muestran el marcado en linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> indiferenciados y con memoria 1 año después de la infusión de células CD34<sup>+</sup> transducidas con LNL6 o RRz2 autólogas.

**Figura 14. Diseño esquemático de un ARNi con la capacidad de direccionamiento múltiple.** El transcrito de ARN contiene tres unidades de ARNi cada una de las cuales contiene un segmento sentido (1A, 2A, 3A) y antisentido (1B, 2B, 3B) separados por separadores (SP). Las unidades de ARNi están flanqueadas por ribozimas de cabeza de martillo y horquilla de escisión, que escinden en las posiciones indicadas por las flechas.

### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición para su utilización en el tratamiento de la infección por VIH en un sujeto humano que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y por lo menos  $1.63 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal del sujeto humano a quien va a ser administrada la composición, siendo por lo menos  $0.52 \times 10^6$  de esas células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> transducidas con un constructo antiviral que expresa un agente anti-VIH, y en la que las células CD34<sup>+</sup> transducidas pueden ser injertadas, dando lugar a células de progenie durante por lo menos 12 meses, en el sujeto. De manera alternativa, la composición comprende por lo menos aproximadamente  $1.7 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg, siendo por lo menos aproximadamente  $0.5 \times 10^6$  de esas células por kg transducidas con el constructo viral. La composición es adecuada para administrarse a un sujeto humano. El sujeto humano puede ser un adulto.

El constructo viral puede ser un constructo retroviral. La composición también puede estar secuencialmente libre de citocinas, o sustancialmente libre de virus.

La presente invención proporciona asimismo una composición donde por lo menos  $5 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal de un sujeto humano al que va a ser administrada la composición son transducidas; o que comprende por lo menos  $9.37 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal de un sujeto humano, donde por lo menos  $5 \times 10^6$  de esas células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> están transducidas; o que comprende por lo menos aproximadamente  $10 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal donde por lo menos  $5 \times 10^6$  de esas células están transducidas; o donde el agente anti-VIH es una molécula de ARN; o donde el agente anti-VIH es una molécula de ARNi; o donde el agente anti-VIH es una molécula antisentido; o donde el agente anti-VIH es una ribozima. La ribozima puede comprender nucleótidos que presenten la secuencia 5'- UUA GGA UCC

UGA UGA GUC CGU GAG GAC GAA ACU GGC UCC -3' (Rz2).

En la composición, las células CD34<sup>+</sup> transducidas pueden injertarse y dar lugar a células de progenie durante por lo menos 12 meses, de un sujeto. Las células pueden estar en un cultivo celular primario.

5 Se da a conocer asimismo una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y por lo menos  $1.63 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal del sujeto a quien va a ser administrada la composición, siendo por lo menos  $0.52 \times 10^6$  de esas células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> transducidas con un constructo viral que expresa un agente anti-VIH, en la que la composición es producida por un proceso que comprende las etapas que consisten en:

- (a) aislar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> del sujeto;
- 10 (b) cultivar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> con por lo menos una citocina;
- (c) transducir las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> con el constructo viral que expresa el agente anti-VIH en presencia de un agente que mejora la colocalización de las células y el constructo viral;
- (d) lavar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>, y
- 15 (e) mezclar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> con un portador farmacéuticamente aceptable, para tener por lo tanto la composición. La composición es adecuada para administrarse a un sujeto humano.

En la composición, el cultivo de la etapa (b) puede ser efectuado en presencia de por lo menos una citocina, por lo menos dos citocinas o únicamente dos citocinas. La etapa (c) puede ser efectuado en presencia de un fragmento de fibronectina recombinante.

20 La presente descripción da asimismo a conocer una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y por lo menos  $1.63 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal del sujeto humano a quien va a ser administrada la composición, por lo menos  $0.52 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de esas células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> siendo transformadas con un gen de interés no encontrado en las células CD34<sup>+</sup> antes de la transformación. La composición es adecuada para su administración a un sujeto humano. En esta composición, los números de células pueden ser como se definieron anteriormente. El sujeto puede ser un adulto. En esta composición, el gen de interés puede expresar un agente de ARN.

25 La presente descripción da todavía asimismo a conocer una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y por lo menos  $1.63 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal del sujeto humano a quien va a ser administrada la composición, siendo por lo menos  $0.52 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> de esas células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> transformadas con un gen de interés no encontrado en las células CD34<sup>+</sup> antes de la transformación,

en la que la composición es producida por un proceso que comprende las etapas que consisten en:

- (a) aislar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> del sujeto;
- (b) cultivar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> con por lo menos una citocina;
- 35 (c) transformar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> con un vector que codifique para un gen de interés en presencia de un gen que mejore la colocalización de las células y el vector;
- (d) lavar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>, y
- (e) mezclar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> con un portador aceptable, para obtener por lo tanto la composición. La composición es adecuada para administrarse a un sujeto humano. En esta composición, los números de células pueden ser como se definieron anteriormente. El sujeto humano puede ser un adulto. En esta composición, el gen de interés puede expresar un agente de ARN.

40 La presente descripción da además a conocer un procedimiento para insertar en células hematopoyéticas de un sujeto humano un gen de interés que comprende:

- (a) movilizar células hematopoyéticas progenitoras CD34<sup>+</sup> en la sangre del sujeto humano;
- (b) aislar los leucocitos de la sangre del sujeto por aféresis;
- 45 (c) aislar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de los leucocitos aislados por un procedimiento inmunoselectivo;
- (d) someter las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de la etapa c) a un proceso de transducción con un gen de interés en presencia de una fuente que colocaliza las células con un vector de transducción;

- e) determinar el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> después de la etapa d), y si el número total es por lo menos  $1.63 \times 10^6$  células por kg de peso corporal de sujeto humano, entonces proceder a la etapa f), y si el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> después de la etapa d) es menor de  $1.63 \times 10^6$  células por kg de peso corporal del sujeto humano, entonces efectuar por lo menos las etapas b)-d) y combinar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>; y
- 5 f) proporcionar al sujeto las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>,  
insertando por lo tanto en las células hematopoyéticas del sujeto humano un gen de interés. El sujeto humano puede ser un adulto.
- 10 En el procedimiento, el agente que colocaliza las células con un vector de transducción puede ser un fragmento de fibronectina.
- En el procedimiento, la etapa f) puede ser efectuada sin mieloablación. La etapa a) de movilización de células hematopoyéticas progenitoras en el sujeto puede ser efectuada administrando al sujeto una cantidad de una citocina suficiente para movilizar las células hematopoyéticas progenitoras. En la etapa de aislamiento de los leucocitos de la sangre del sujeto, la aféresis puede ser efectuada por lo menos dos veces.
- 15 En el procedimiento, la etapa que consiste en someter las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> a un proceso de transducción con un gen de interés es efectuada en presencia de un fragmento de fibronectina recombinante, que puede ser el fragmento de fibronectina recombinante CH-296.
- 20 En el procedimiento, el gen de interés puede codificar para un agente anti-VIH. El agente anti-VIH puede ser una molécula de ARN; o una molécula de ARNi; o una molécula antisentido, o una ribozima. La ribozima puede comprender nucleótidos que tengan la secuencia 5'- UUA GGA UCC UGA UGA GUC CGU GAG GAC GAC GAA ACU GGC UCC -3' (Rz2).
- 25 En una forma de realización del procedimiento, en la etapa e), si el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> después de la etapa d) es menor de  $1.63 \times 10^6$  por kg de peso corporal del sujeto humano, entonces se incluye además una etapa de almacenamiento criogénico de las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de la etapa d), repitiendo las etapas a)-d), y combinando cualesquier células almacenadas criogénicamente con las células de la etapa d). El número específico de células que debe ser obtenido puede incrementarse como se describió anteriormente.
- En el procedimiento, todas o casi todas las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de la etapa e) son proporcionadas al sujeto, por ejemplo en por lo menos 90% del número total.
- 30 El procedimiento puede comprender además una etapa que consiste en cultivar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> aisladas de la etapa c) en presencia de por lo menos dos citocinas o una mezcla de citocinas.
- 35 La mezcla de citocinas puede comprender una o más citocinas seleccionadas de entre el grupo constituido por factor de células troncales (SCF), factor del crecimiento y desarrollo de los megacariocitos (MGDF), ligando Flt-3 (FL, algunas veces abreviado como Flt-3), interleucina 3 (IL-3), factor estimulante de la colonia de los granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y trombopoyetina (TPO). La mezcla de citocinas puede comprender además una o más citocinas seleccionadas de entre el grupo constituido por interleucina 1 (IL-1), interleucina 4, (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 9 (IL-9), interleucina 11 (IL-11), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), factor estimulante de la colonia de los granulocitos (G-CSF), factor estimulante de la colonia de los macrófagos (M-CSF), eritropoyetina (EPO), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor beta del crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), proteína inhibidora de los macrófagos 1 (MIP-1), factor de la necrosis tumoral (TNF) y factor derivado de células estromales 1 (SDF-1).
- 40 En otra forma de realización del procedimiento, la mezcla de citocinas comprende una citocina seleccionada de entre un primer grupo y una citocina seleccionada de entre un segundo grupo, en la que el primer grupo está constituido por SCF, MGDF, FL, IL-3, GM-CSF, TPO, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, G-CSF, M-CSF, EPO, LIF, TGF- $\beta$ , MIP-1, TNF y SDF-1, y donde el segundo grupo está constituido por MGDF, FL, GM-CSF, TPO, IL-1, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, G-CSF, M-CSF, EPO, LIF, TGF- $\beta$ , MIP-1, TNF y SDF-1.
- 45 La presente descripción da a conocer además un procedimiento para insertar en células hematopoyéticas de un sujeto humano un gen de interés, que comprende:
- a) movilizar células hematopoyéticas progenitoras CD34<sup>+</sup> en la sangre del sujeto;
- b) aislar los leucocitos de la sangre del sujeto por aféresis;
- 50 c) aislar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de los leucocitos aislados por un procedimiento inmunoselectivo;
- d) determinar el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> después de la etapa c), y si el número total

es por lo menos de  $1.63 \times 10^6$  células de kg de peso corporal del sujeto humano, entonces proceder a la etapa e), y si el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> después de la etapa c) es menor de  $1.63 \times 10^6$  células por kg de peso corporal del sujeto humano, entonces efectuar las etapas b)-c) y combinar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>;

5 e) someter las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de la etapa c) a un proceso de transducción con un gen de interés en presencia de un agente que localiza las células con un vector de transducción; y

f) proporcionar al sujeto las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>,

insertando por lo tanto las células hematopoyéticas del sujeto humano un gen de interés. Las especificidades relevantes de este procedimiento pueden variar de acuerdo a lo expuesto para los procedimientos anteriores.

10 La descripción da a conocer además un procedimiento para insertar en células hematopoyéticas de un sujeto un gen que expresa una ribozima que comprende nucleótidos que tienen la secuencia 5'- UUA GGA UCC UGA UGA GUC CGU GAG GAC GAA ACU GGC UCC -3' (Rz2) que comprende:

a) movilizar las células hematopoyéticas progenitoras CD34<sup>+</sup> en la sangre del sujeto administrando al sujeto una cantidad de una citocina suficiente para movilizar las células hematopoyéticas progenitoras;

b) aislar los leucocitos de la sangre del sujeto por aféresis, que se efectúa por lo menos dos veces;

15 c) aislar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de los leucocitos aislados por un procedimiento inmunoselectivo;

d) cultivar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> aisladas de la etapa c) durante por lo menos un día en un medio de cultivo en presencia de una citocina;

20 e) someter las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de la etapa d) a un proceso de transducción con un retrovirus que comprende un vector que da lugar a las células a una ribozima que comprende nucleótidos que tienen la secuencia 5'- UUA GGA UCC UGA UGA GUC CGU GAG GAC GAA ACU GGC UCC -3' (Rz2) en presencia de un fragmento de fibronectina recombinante;

25 f) determinar el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> después de la etapa e), y si el número total es por lo menos  $1.63 \times 10^6$  células por kg de peso corporal del sujeto humano, entonces proceder a la etapa g), y si el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> después de la etapa e) es menor de  $1.63 \times 10^6$  células por kg de peso corporal del sujeto humano, entonces efectuar nuevamente las etapas b)-e) y combinar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>; y

30 g) proporcionar al sujeto, sin mieloablación, las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>, insertando por lo tanto en las células hematopoyéticas del sujeto humano un gen que exprese la ribozima. Las especificidades relevantes de este procedimiento pueden variar de acuerdo a lo expuesto para los procedimientos anteriores.

También se proporciona un procedimiento para preparar las composiciones descritas anteriormente, que comprende:

35 a) aislar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por un procedimiento inmunoselectivo de los leucocitos aislados que pueden obtenerse a partir de un sujeto humano que ha experimentado la movilización de las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> en la sangre y el aislamiento de los leucocitos por aféresis;

b) someter las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de la etapa a) a un proceso de transducción con un gen de interés que codifica un agente anti-VIH en presencia de un agente que colocaliza las células con un vector de transducción; y

40 c) determinar el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> después de la etapa b), y si el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> después de la etapa b) es menor de  $1.63 \times 10^6$  células por kg de peso corporal del sujeto humano, entonces se efectúan nuevamente las etapas a)-b) y combinar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>.

45 Se proporciona asimismo la utilización de una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y por lo menos  $1.63 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal de un sujeto humano a quien ya se ha administrado la composición, siendo por lo menos  $0.52 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> de esas células por kg transducidas con un constructo viral que expresa un agente anti-VIH y en el que las células CD34<sup>+</sup> transducidas pueden ser injertadas, dando lugar a células de progenie durante por lo menos 12 meses, en el sujeto, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del sujeto humano infectado por VIH.

Se da asimismo a conocer un equipo que comprende elementos destinados a su utilización para realizar los procedimientos descritos. Una forma de realización específica de un equipo comprende:

50 a) una cantidad de un agente que puede movilizar células hematopoyéticas progenitor en un sujeto humano;

b) un medio de cultivo que incluye por lo menos una citocina aceptable para cultivar células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>;

c) un vector retroviral que comprende nucleótidos que tienen una secuencia que en una célula da lugar a una ribozima que tiene la secuencia 5'- UUA GGA UCC UGA UGA GUC CGU GAG GAC GAA ACU GGC UCC -3' (Rz2); y

5 d) recipientes de cultivo tisular recubiertos sobre su interior con un fragmento de fibronectina recombinante.

Se da a conocer además un paquete que comprende los equipos descritos e instrucciones para la utilización de los equipos.

10 En otra forma de realización del procedimiento descrito, el tiempo combinado total tomado por las etapas que consisten en cultivar y transducir las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> no es mayor de aproximadamente 3 días, es decir, que el tiempo durante el que las células están en un medio de cultivo a 37°C en presencia de citocinas agregadas (a niveles normales) no es mayor de aproximadamente 3 días. De manera alternativa, el tiempo durante el que las células están en medios de cultivo en presencia de más de una citocina no es de más de tres días. La transducción de las células puede ser efectuada en presencia de un fragmento de fibronectina recombinante como, CH-296, o un agente equivalente.

15 Las composiciones y procedimientos de la presente invención pueden ser usados para tratar una infección por SIDA/VIH.

20 La presente invención se refiere a la terapia génica, particularmente como la aplicada a las células hematopoyética progenitoras (HP), células transducidas y procedimientos para obtenerlas, y con procedimientos para usarlas para proporcionar injerto prolongado de células hematopoyética modificadas en sujetos humanos. La invención se refiere, de manera particular, a la terapia génica *ex vivo* de células HP para el tratamiento de la infección por VIH.

La invención proporciona composiciones de células HP transducidas que comprenden números suficientes de células totipotentes capaces de proporcionar beneficio terapéutico. En una forma de realización, la presente invención proporciona composiciones de células HP humanas transducidas y procedimientos de terapia génica contra el VIH para dar lugar, en sujetos humanos, a linfocitos T protegidos.

25 En el contexto de la infección por VIH, es proporcionado un beneficio terapéutico significativo por la invención a través del incremento de la supervivencia a largo plazo de linfocitos T modificados en el sujeto humano y por lo tanto números incrementados de linfocitos T y función inmune mejorada, conduciendo a una menor reproducción viral y carga viral.

30 Las células HP humanas transducidas de la composición o sistemas pueden injertarse a largo plazo cuando son infundidas en un paciente, dando lugar a células hematopoyéticas diferenciadas durante por lo menos 12 meses después de la infusión, preferentemente por lo menos 24 meses y todavía más preferentemente por lo menos 30 meses después de la infusión. En otra forma de realización, las células HP humanas transducidas pueden ser injertadas a largo plazo cuando son infundidas en un sujeto autónomo. En otra forma de realización, las HP humanas transducidas pueden ser injertadas a largo plazo cuando son infundidas en un sujeto sin mieloablación.

35 Otra exposición proporciona una composición o sistema que comprende células HP humanas transducidas en números suficientes de modo, que cuando son proporcionadas en un sujeto humano, proporcionan injerto a largo plazo a un nivel tal de por lo menos 0.01% células modificadas genéticamente de por lo menos un tipo de célula que puede ser detectado en la sangre o médula ósea por ejemplo por biopsia. Resulta preferido que el tipo de célula sea linfocitos T o macrófagos/monocitos. Preferentemente, el nivel de células modificadas genéticamente es de por lo menos el 0.1%, más preferentemente por lo menos 1%, y todavía más preferentemente, por lo menos 10%. Resulta preferido que las células transducidas sean proporcionadas a un sujeto autólogo. Resulta preferido que las células transducidas sean proporcionadas en ausencia de mieloablación. El injerto a largo plazo ocurre durante por lo menos 12 meses, preferentemente por lo menos 24 meses, más preferentemente, por lo menos 30 meses. El gen transducido está destinado al tratamiento de la infección por VIH.

45 Las células HP para la transducción fueron obtenidas preferentemente de un sujeto. La pureza de CD34<sup>+</sup> de las células HP humanas transducidas (% de CD34<sup>+</sup>) deberá ser de por lo menos el 65%, preferentemente por lo menos el 90%, y más preferentemente, por lo menos el 95%. El porcentaje de transducción deberá ser por lo menos aproximadamente 10%, preferentemente por lo menos aproximadamente 30% y, todavía más preferentemente por lo menos aproximadamente 50%.

50 En otra forma de realización, las células HP humanas transducidas son derivadas de células CD34<sup>+</sup> aisladas de la sangre de un sujeto humano después de la movilización de las células HP en la sangre periférica. La movilización puede ser lograda mediante la utilización de citocinas, preferentemente una o más de entre el grupo constituido por factor estimulador de la colonia de los granulocitos (G-CSF), G-CSF conjugado, G-CSF pegilado y factor estimulador de la colonia de los granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Las citocinas pueden comprender además factor de células troncales (CSF), interleucina 3 (IL-3), o factor 1 derivado de células estromales (SDF-1, Lataillade et al 2000) o citocinas que actúan de manera similar. La movilización puede ser ayudada por la utilización de una quimioterapia de utilización

55

corta con agentes como la ciclofosfamida. Más preferentemente, la movilización se lleva a cabo usando G-CSF o G-CSF pegilado. Las citocinas pueden ser administradas diariamente en una cantidad de por lo menos aproximadamente 10 µg por kg de peso del sujeto y, más preferentemente aproximadamente 30 µg por kg. Las células CD34<sup>+</sup> pueden ser recogidas por aféresis los días 3, 4, 5, 6 o más tarde después de comenzar el tratamiento con citocina.

5 Preferentemente, la aféresis se lleva a cabo por lo menos dos veces. Las células CD34<sup>+</sup> pueden ser seleccionadas por cualquier dispositivo de grado clínico conocido en la técnica como sistema de selección de células Isolex 300i o el sistema de concentración de células troncales CEPRATE SC.

10 En otra forma de realización, las células CD34<sup>+</sup> son tratadas antes de la transducción con una mezcla de citocinas que comprenden preferentemente MGDF y SCF, o esencialmente MGDF y SCF, para inducir la entrada al ciclo celular, preferentemente a concentraciones de aproximadamente 100 ng/ml y 50 ng/ml, respectivamente. Resulta preferido que la inducción del ciclo celular ocurra en ausencia de citocinas agregadas, IL-3, IL-6 o SCF, o la combinación de tres de esas.

15 Las células HP humanas transducidas contienen un gen introducido que puede codificar para una o más proteínas o moléculas de ARN, por ejemplo moléculas antisentido, moléculas de ARNi, señuelos de ARN o ARN de ribozima (es decir, agentes de ARN). El gen introducido puede ser cualquier gen introducido siempre que la proteína o ARN o ambos codificadora alteren las propiedades de las células HP humanas transducidas en una forma deseada en comparación con las células HP no transducidas. El gen introducido, cuando se expresa, proporciona resistencia a las células HP transducidas o a la progenie diferenciada de esas células contra la infección por VIH. Más preferentemente, el gen introducido codifica para ARN antisentido o de ribozima de ARN que puede inhibir la reproducción del VIH-1 en las células.

20

Los tipos de ribozimas que pueden ser dirigidas contra la infección por VIH-1 incluyen la cabeza de martillo, horquilla, ARNasa P, virus delta de la hepatitis (HDV), ribozimas de secuencia interviniente del tipo de grupo I o el grupo II, motivos catalíticos seleccionados por procedimientos de selección *in vitro*. Las ribozimas son preferentemente ribozimas de cabeza de martillo u horquilla, más preferentemente ribozimas de cabeza de martillo. Esas ribozimas son capaces de escindir moléculas de ARN asociadas con la enfermedad.

25

La invención incluye la utilización de ribozimas múltiples, (por ejemplo Ramezani et al 2002), por ejemplo una ribozima con dominios catalíticos múltiples, o una combinación de tipos de ribozimas. Esa deberá reducir la probabilidad de resistencia viral en el caso de tratamiento de la infección viral. Resulta asimismo preferido que el sitio de escisión de la ribozima este altamente conservado en el ARN diana viral, como es el caso para el sitio de escisión Rz2. También es posible cualquier combinación de lo anterior, proporcionando más de un mecanismo de efecto.

30

Las células HP humanas transducidas de la composición o sistema son transducidas por ADN o un plásmido o vector de transferencia viral. Es deseable que el gen introducido sea integrado en el genoma de la célula, después de la transcripción inversa si es apropiado. Preferentemente, las células transducidas con un vector retroviral, por ejemplo un vector retroviral murino o un vector lentiviral. Preferentemente, el vector retroviral es derivado del LNL6 (Bender et al. 1987) u otro vector oncorretroviral. En una forma de realización particular, las células son transducidas con RRz2.

35

El gen introducido es expresado en las células HP humanas transducidas o células de progenie de un promotor. El promotor puede ser expresado de manera constitutiva o inducible, por ejemplo siendo expresado preferentemente bajo condiciones o circunstancias favorables. El gen puede ser transcrito por ARN polimerasa II (promotores ARN pol II) o por ARN polimerasa III.

40 En otra forma de realización de la invención, la composición es formulada para ser proporcionada a un sujeto humano. La gran mayoría de células deberán ser viables, por ejemplo más del 95% y, preferentemente, más del 98%. El volumen de la composición, es preferentemente, de aproximadamente 10 ml hasta aproximadamente 1000 ml, más preferentemente, de aproximadamente 100 ml hasta aproximadamente 500 ml. La composición comprende un portador farmacéuticamente aceptable que es preferentemente una solución de sales amortiguada que comprende un agente proteico como una albúmina o gelatina y/o un azúcar como la glucosa, agentes los cuales pueden actuar para estabilizar las células. El portador puede contener agentes anticoagulantes como el citrato de sodio. El portador puede comprender un expansor de plasma, bien conocido en la técnica. En aspectos adicionales, la composición es estéril (bacterial, fungal, micoplasma), detectablemente libre de bacterias, endotoxinas, micoplasmas, antígeno p24 del VIH o retrovirus competente de reproducción, sustancialmente libre de vector de transducción, libre, o cualquier combinación de esos.

45

50 En un aspecto más, la composición está sustancialmente libre de citocinas agregadas. La composición es administrada al sujeto por medios parenterales, preferentemente por infusión o inyección en una o más ocasiones.

La invención da asimismo a conocer procedimientos para la terapia génica de células hematopoyética, particularmente células hematopoyética progenitoras, usando las composiciones descritas en la presente memoria. La invención da asimismo a conocer procedimientos de tratamiento o prevención de enfermedades genéticas o infecciosas, por ejemplo, infección por VIH. Los procedimientos pueden comprender la utilización del fragmento CH-296 de la fibronectina humana (RetroNectin<sup>MR</sup>) o equivalente, o uno o más etapas de citorreducción (debulking) para extraer las células indeseables, o una o más etapas de lavado.

55

La terapia génica puede ser llevada a cabo *ex vivo* o *in vivo*. Los procedimientos descritos en la presente memoria se aplican preferentemente al procedimiento *ex vivo* pero también podrían ser aplicados a procedimientos *in vivo* (por ejemplo, Newbound et al., 2001). La invención es efectuada en sujetos que ya presenten la enfermedad.

5 Las células HP para usarse en los procedimientos de la invención pueden ser obtenidas de sangre periférica, médula ósea, sangre del cordón umbilical, o de células troncales que den lugar a células hematopoyética. Son obtenidas preferentemente de sangre periférica después de la movilización. Las células HP pueden ser movilizadas en la sangre periférica administrando una o más citocinas, con o sin administración de un agente quimioterapéutico. Las citocinas pueden ser seleccionadas de entre el grupo constituido por G-CSF, G-CSF pegilado, G-CSF conjugado, GM-CSF y cualquier combinación de las anteriores. Las citocinas pueden comprender además uno o más seleccionado de entre el grupo constituido por SCF, FL e IL-3.

10 Los procedimientos de la invención pueden proporcionar por lo menos 0.01% de células hematopoyética modificadas genéticamente a largo plazo en el paciente en ausencia de mieloablación.

15 Los parámetros y características de cada una de las formas de realización descritas anteriormente son intercambiables cuando son aplicables entre sí, y por lo tanto no se repiten. De este modo, por ejemplo, cualquier parámetro o característica de la primera forma de realización puede ser utilizado en otras formas de realización de la invención.

**DEFINICIONES**

- 5 Células hematopoyéticas como se utiliza en la presente memoria se refiere a las células normalmente encontradas en la sangre así como las células que dan lugar a células normalmente presentes en la sangre, como las células presentes en la médula ósea. En este contexto, “normalmente” incluye la situación en la que una persona es tratada para alterar el número o calidad de las células en la sangre o médula ósea.
- 10 El vector viral se usa en la presente memoria haciendo referencia a un vector que comprende todo o parte de un genoma viral que puede ser introducido en células y expresado. Esos vectores virales pueden incluir virus nativos, mutantes o recombinantes. Esos virus pueden tener un genoma de ARN o ADN. Los ejemplos de vectores virales adecuados incluyen vectores retrovirales (incluyendo vectores lentivirales), vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados y vectores híbridos).
- 15 Un vector retroviral es un vector viral donde el virus es de la familia *retroviridae*.
- Un “constructo” se utiliza haciendo referencia al ácido nucleico recombinante que puede ser una molécula de ADN o ARN recombinante, que ha sido generada para el propósito de la expresión de una secuencia nucleotídica específica, o va a ser usada en la construcción de otros ácidos nucleicos recombinantes. En general, “constructo” se usa en la presente memoria haciendo referencia a una molécula de ADN o ARN aislada, recombinante.
- 20 Un “agente anti-VIH”, como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier agente que puede ser expresado por una célula de mamífero y que inhibe la reproducción del VIH o la entrada del VIH en la célula de mamífero. Esos agentes pueden ser ácidos nucleicos o polipéptidos.
- El término “que puede ser injertada” se utiliza en la presente memoria para referirse a la capacidad de una célula hematopoyética para implantarse en la médula ósea durante un periodo de tiempo prolongado, es decir de por lo menos un año. La implantación puede ser detectada directamente (por ejemplo por biopsia) o por la producción de células de progenie en la sangre.
- 25 Los términos “movilizar” y “movilizada” se utilizan en la presente memoria para referirse a células hematopoyéticas que se están desplazando de los reservorios tisulares en la médula ósea hacia la sangre periférica.
- El término “citocina” se utiliza para referirse a cualquier número de proteínas de bajo peso molecular, como hormonas, secretadas por varios tipos de células o recombinantes, que regulan la intensidad y duración del crecimiento o función celular, por ejemplo comunicación célula a célula. Las citocinas están implicadas, por ejemplo, en la mediación de la inmunidad, alergias, y la regulación de la maduración y crecimiento de las células.
- 30 Un “adulto” se utiliza en la presente memoria para referirse a un sujeto humano completamente crecido y físicamente maduro. La edad generalmente aceptada de un “adulto” humano es de 18 años o más.
- La transducción se utiliza para referirse a la introducción de material genético en una célula usando un vector viral.
- 35 Como se utiliza en la presente memoria una célula transducida resulta de un proceso de transducción y contiene material genético que no contenía antes del proceso de transducción, si es integrado establemente o no. Como se utiliza en algunas técnicas anteriores, pero no como se utiliza en la presente memoria, “células transducidas” puede referirse a una población de células que ha resultado de un proceso de transducción y población que incluye células que contienen el material genético y células que no contienen el material genético integrado de manera estable o no.
- 40 La transfección se refiere a la introducción de material genético en una célula sin usar un vector viral. Los ejemplos de transfección incluyen la inserción de ADN “desnudo” o ADN en liposomas, es decir sin un recubrimiento o envoltura viral.
- La mieloablación se refiere al tratamiento, generalmente químico o radiológico, que da como resultado la destrucción de por lo menos una parte significativa del compartimento mieloide (que incluye células progenitoras hematopoyéticas) en un paciente. La mieloablación no incluye tratamientos acondicionadores que puedan causar únicamente una destrucción menor o no sustancial de células de compartimento mieloide.
- 45 La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” se utiliza para referirse a cualquiera de los portadores farmacéuticamente aceptables estándar. Los ejemplos comprenden de manera no limitativa solución salina amortiguada como fosfato, solución salina fisiológica y agua.
- 50 “Fragmento de fibronectina recombinante” se utiliza para hacer referencia a un agente que funcione para colocalizar las células con el vector durante el proceso de transducción y se basa en la actividad de la fibronectina. Por ejemplo, la RetroNectin<sup>ME</sup>, TaKaRa Shuzo Co. Ltd., es un fragmento de fibronectina recombinante que contiene tres dominios, un dominio de unión celular central que se une a la integrina VLA-5, un dominio de unión de heparina de alta afinidad que se une a los proteoglicanos, y un sitio CS-1 dentro de la región IIICS de empalme alternativamente que se une a la integrina VLA-4 (Williams 1999). Las retronectinas equivalentes contienen tres dominios que son

funcionalmente equivalentes a la RetroNectin<sup>MR</sup>, mientras que los agentes de colocación que son similares a la RetroNectin<sup>MR</sup> contienen por lo menos dos dominios que son funcionalmente equivalentes.

5 “Secuencia de ácido nucleico” como se utiliza en la presente memoria hace referencia a un oligonucleótido, o polinucleótido, y fragmentos o porciones de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser de una sola o doble hebra, y representa la hebra sentido o antisentido. De manera similar, “secuencia de aminoácidos” como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligopéptido, péptido, polipéptido, o secuencia de proteína y fragmentos o porciones de la misma, y con moléculas naturales o sintéticas.

10 El término “antisentido”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a secuencias nucleotídicas que son complementarias a una secuencia de ADN o ARN específica. El término “hebra antisentido” se utiliza haciendo referencia a una hebra de ácido nucleico que es complementaria a la hebra “sentido”. Las moléculas antisentido pueden ser producidas por cualquier método, incluyendo la síntesis mediante la ligación de los genes de interés en una orientación invertida a un promotor, permitiendo la síntesis de una hebra complementaria. Una vez introducida en una célula, esta hebra transcrita se combina con las secuencias naturales producidas por la célula para formar dúplex. Esos dúplex bloquean entonces la transcripción o translación adicional. De esta manera, pueden ser generados fenotipos mutantes. La designación “negativa” se utiliza ocasionalmente haciendo referencia a la hebra antisentido, y “positiva” se utiliza ocasionalmente haciendo referencia a la hebra sentido.

15 En el contexto de la presente memoria, debe apreciarse que la palabra “comprende” o variaciones como “comprenden” o “que comprende”, implican la inclusión de un elemento establecido, completo o gradual, o un grupo de elementos, completos o graduales, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, completo o gradual, o un grupo de elementos, completos o graduales.

#### **Modelo que demuestra los principios de la invención**

20 El modelo seleccionado para demostrar los principios de la invención es un humano infectado con VIH. Un tratamiento o erradicación o prevención efectiva, a largo plazo y práctica de la infección por VIH en un sujeto humano ha sido una meta evasiva. De este modo, las ventajas de la invención son ejemplificadas en el contexto de un problema muy complejo, es decir la terapia contra la infección por VIH en un sujeto humano.

#### **Terapia génica para el VIH-1**

25 El grupo del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) incluye tipos VIH-1 y VIH-2. La reproducción del VIH-1 resulta actualmente bien conocida. El tratamiento estándar actual utiliza una combinación de fármacos antirretrovirales, con frecuencia tres o más, y pueden proporcionar control de la reproducción del VIH a corto plazo, pero con frecuencia está asociada con aspectos negativos como la toxicidad del fármaco, resistencia viral, regímenes de dosificación difíciles o desagradables, y el coste del tratamiento.

30 Utilizando células hematopoyéticas progenitoras diana de la transducción, el objetivo de la terapia génica para el VIH/SIDA consiste en reemplazar una fracción del conjunto celular infectado por VIH con células concebidas para inhibir la reproducción del virus. Esta estrategia puede contribuir potencialmente a la erradicación del virus protegiendo las células CD4<sup>+</sup> y permitiendo el establecimiento de una respuesta antiviral mediada por elementos inmunes protegidos. Para que esas estrategias tengan impacto positivo sobre el curso de la infección por VIH, es esencial que i) tenga lugar un grado de reconstitución inmune en el establecimiento de la infección por VIH, ii) el sistema inmune reconstituido sea protegido contra el agotamiento inducido por el VIH, permitiendo que reconozca el antígeno y proteja al hospedador contra patógenos. Es deseable que esta estrategia tenga impacto sobre la carga viral. Con respecto al potencial para la reconstitución inmune en la infección por VIH, varios informes han tratado los efectos de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART) sobre el sistema inmune (Ho et al 1995; Zhang et al 1998). En esencia, la HAART está asociada con incrementos en los conteos de células CD4<sup>+</sup>, principalmente debido a la expansión de células de memoria durante los primeros cuatro meses de la HAART. Esto es seguido por un incremento en las células CD4<sup>+</sup> indiferenciadas, asociado con una disminución en los marcadores de activación de CD4 y un incremento en las respuestas proliferativas a los antígenos reenumerados (Autran et al 1997; Pakker et al 1998).

35 Aunque estudios *in vitro* han demostrado que el timo no infectado de un adulto mantiene la capacidad de soportar linfopoyesis T (Jamieson et al 1999; Poulin 1999), no se ha demostrado anteriormente que la terapia génica con células hematopoyéticas progenitoras pueda dar como resultado la restauración prolongada del sistema inmune con células diseñadas para inhibir la reproducción del VIH-1. Con respecto a la ausencia de terapia génica, aunque la emergencia de emigrantes tímicos recientes en la periferia ha sido descrita en pacientes que fueron previamente indiferenciados a la HAART, ésta se sostuvo únicamente en tanto la viremia se mantuvo en verificación (Douek et 1998; Zhang et al 1999). Se desconoce si ocurriría una respuesta similar en paciente con infección por VIH más avanzada en el contexto de la resistencia a fármacos y viremia no controlada. Además, la fuente de progenitores que da lugar a esos emigrantes tímicos recientes no ha sido determinada; se desconoce si los precursores hematopoyéticos responsables del grado de timopoyesis observada después de la HAART en adultos migran de la médula ósea al timo como respuesta al agotamiento de las células T, o si el desarrollo linfóide T después de la HAART se deriva de progenitores linfoides T que colonizan el timo al inicio de la vida. En realidad, la capacidad de las células progenitoras de sangre periférica para experimentar desarrollo de linfocitos T en el timo adulto no ha sido determinada previamente en el escenario de la

reproducción de VIH activa, puesto que la emergencia de los linfocitos T después del trasplante autólogo de paciente con VIH podría ser adscrita al desarrollo de los linfocitos T que surge de precursores de linfocitos T residuales endógenos (Gabarre et al 2000). Además, los pacientes adultos no infectados que reciben trasplantes de células hematopoyéticas progenitoras alogeneicas usando células CD34<sup>+</sup> seleccionadas presentan un retraso marcado y una recuperación de linfocitos T subóptima, indicando actividad tímica subnormal después de la supresión intensiva de la médula ósea (Behringer et al 1999; Martínez et al 1999). También deberá considerarse que factores potenciales inherentes a los procedimientos empleados en la manipulación genética de los progenitores hematopoyéticos pueden afectar su capacidad para experimentar desarrollo linfoide T. Esos factores identificados anteriormente incluyen la inducción de progenitores en el ciclo celular en la preparación para la transducción con retrovirus murinos (Roe et al 1993), que daría como resultado un compromiso de linaje mielóide, y la presencia de un gen externo expresado constitutivamente que puede interferir con los procesos requeridos de la migración, alojamiento y diferenciación de células progenitoras. Por lo tanto, se buscó determinar si los linfocitos T protegidos genéticamente, incluyendo los linfocitos T indiferenciados, podrían ser producidos en el contexto de la infección por VIH adulta.

La interferencia con la multiplicación del VIH-1 puede ocurrir en cualquier etapa de su ciclo de reproducción. La infección retroviral de una célula es iniciada por la interacción de glicoproteínas virales con receptores celulares (A) (véase la Figura 1). Después de la adsorción y descubrimiento, el ARN viral entra a la célula diana y es convertido en ADNc por la acción de la transcriptasa inversa, una enzima transportada dentro del virión (B). El ADNc adopta una forma circular (C) es convertido al ADNc de doble hebra y entonces se integra al ADN genómico de la célula hospedadora mediante la acción de la integrasa (D). Una vez integrado, el ADNc proviral es transcrito del promotor dentro del 5' LTR (E). El ARN transcrito, incluyendo los ARNm para gag, pol y env y los factores reguladores tat, rev y vpr son traducidos para producir las proteínas virales (F) o es dejado como ARN viral incipiente o naciente. Este ARN viral contiene una secuencia de empaquetamiento Psi que es esencial para su empaquetamiento en viriones (G). Una vez que el producido el virión, este es liberado de la célula por un brote de la membrana plasmática (H). En general, los retrovirus no causan la lisis de la célula hospedadora; el VIH es una excepción a esto. El ADNc proviral permanece integrado establemente en el genoma hospedador y se reproduce con el ADN del hospedador, de modo que las células de progenie también heredan el provirus. Los agentes antivirales potenciales pueden ser dirigidos a cualquiera de esos puntos de control reproductivo. Por ejemplo, la desregulación del receptor CCR5 puede inhibir la reproducción del VIH-1 (Bai et al 2000).

Pueden ser usados diferentes tipos de procedimientos con la presente invención para la terapia génica contra el VIH-1, incluyendo la expresión extracelular de proteínas transdominantes (por ejemplo Smythe et al. 1994), anticuerpos intracelulares (por ejemplo Marasco et al. 1998, Shaheen et al 1996), ácido ribonucleico (ARN) antisentido (por ejemplo, Sczakiel y Pawlita 1991), señuelos virales (por ejemplo Kohn et al. 1999), ribozimas catalíticas (por ejemplo Sarver et al. 1990; Sun et al. 1996) y ARNi (por ejemplo Novina et al 2002).

Las proteínas (mutantes) transdominantes, particularmente las proteínas Rev o Tat mutantes, actúan uniéndose al ARN del VIH o factores requeridos para la reproducción del VIH. Tienen una función alterada en comparación con la proteína no mutante, dado que interfieren con la función de la proteína no mutante. Pueden ser una proteína de fusión, que combine dos o más actividades. En una forma de realización particular, la proteína transdominante es la proteína RevM10 (Ranga et al 1998), que ha demostrado inhibir la reproducción del VIH-1 en células T primarias. Las células CD34<sup>+</sup> transducidas con RevM10 aisladas de sangre de cordón umbilical humano o sangre periférica dan lugar a timocitos maduros en un modelo de ratón y células T protegidas contra el VIH-1 (Bonyhadi et al 1997). Además, la liberación retroviral RevM10 a células CD4<sup>+</sup> protege esas células en individuos infectados con VIH (Ranga et al 1998).

Los anticuerpos intracelulares, generalmente del tipo de una sola cadena, como los que son producidos a partir del constructo retroviral pSLXCMV (Shaheen et al 1996), pueden inhibir el ciclo de vida del VIH uniéndose a o secuestrando proteínas virales específicas. En una forma de realización particular, fragmentos de anticuerpo anti-transcriptasa inversa (RT) inhibieron la infección por VIH *in vitro* (Maciejewski et al 1995).

El ARN antisentido puede unirse al ARN viral, ya sea a productos genómicos o de transcripción, y desestabilizar al ARN o inhibir procesos como la traducción o exportación del núcleo. La unión al ARN viral incipiente o naciente también puede actuar para inhibir el empaquetamiento productivo del ARN en viriones. Como resulta conocido en la técnica, la región complementaria para una molécula antisentido puede ser tan corta como de 15 nucleótidos, más preferentemente, de más de 30 nucleótidos, y todavía más preferentemente, de entre 100 y 500 nucleótidos de longitud. La inhibición de la reproducción del VIH-1 ha sido demostrada para ARN antisentido dirigidos contra varios genes reguladores y estructurales virales, incluyendo al *pol*, *gag*, *env*, *tat*, *vif*, y *psi* (véase Veres et al 1998). La reproducción del virus de inmunodeficiencia de los simios (VIS) relacionado fue limitada y el progreso de la enfermedad fue reducido en monos después del tratamiento con linfocitos que contenían *tat/rev* antisentido (Donahue et al 1998) demostrando que la expresión antisentido puede inhibir la reproducción de lentivirus *in vivo*. En una forma de realización particular, el vector retroviral HGTV43 codifica para una molécula antisentido que dirige a *tar* y dos sitios separados de la región *tat/rev* en el genoma del VIH-1. Esta molécula ha demostrado proporcionar protección contra la infección por VIH *in vitro*.

Los señuelos de ARN como los señuelos RRE y señuelos TAR también han sido utilizados para proteger células contra el VIH (Lee et al 1994, Lisziewicz et al 1993) y son usados preferentemente en una forma polimérica para incrementar la capacidad para unir proteínas relacionadas con el VIH-1 y secuestrarlas.

Las ribozimas pueden actuar uniendo no solo ARN virales sino también escindiéndolas e inactivándolas y de este modo son atractivas para usarse con la presente invención. Están constituidas por una o más (usualmente dos) regiones de complementariedad al ARN diana y una región catalítica que proporciona actividad enzimática. Las ribozimas, particularmente las que presentan brazos hibridantes más largos, también pueden actuar a través de mecanismos similares a los utilizados por las moléculas antisentido. Los motivos de ribozima más ampliamente usados son los tipos de cabeza de martillo y horquilla los cuales son descritos en la patente US nº 6.127.114 y la patente US nº 6.221.661, respectivamente. En una forma de realización particular, el vector retroviral pTCAG codifica para una ribozima de horquilla que dirige una región U5 (posición +111/112 del sitio con la tapa) de LTR de VIH-1 fusionado con parte de una secuencia de RRE y una ribozima que dirige la región codificadora de rev/env (posición 8629-8644 de HXB2 aislado), expresada de un promotor tARNval (Gervaix et al 1997).

Las moléculas de ARNi son las que presentan regiones de ARN de doble hebra que disparan los mecanismos de degradación de ARN de células hospedadoras en una forma específica de la secuencia. Pueden por lo tanto ser usadas para inactivar ARN endógenos o ARN patógenos como el ARN del VIH-1. Cada región de doble hebra puede ser relativamente corta, por ejemplo de 21-25 pares de bases de longitud, preferentemente de menos de aproximadamente 30 pares de bases de longitud, y más preferentemente con una región de doble hebra de 19 a 25 pares de bases. Resulta preferido que exista no más de un mal apareamiento (los malos apareamientos son definidos como aquellos pares que no incluyen G:U) en cada región de doble hebra, más preferentemente no malos apareamientos, y todavía más preferentemente que las regiones de doble hebra estén perfectamente apareadas. Cuando la molécula diana es variable (por ejemplo, ARN de VIH-1), las regiones muy conservadas serán direccionadas. Una familia de variantes pueden ser el blanco o diana siempre que no presenten más de un mal apareamiento con una u otra de las hebras de la región de doble hebra de la molécula de ARNi. Para moléculas de ARNi más largas, pueden ser unidos varios dúplex más cortos, permitiendo el direccionamiento de genes múltiples, resultando preferido para dianas con mayor variabilidad. Los dúplex de ARNi también pueden ser producidos a partir de transcritos de ARNm más largos empalmados o por medio de autoescisión, por ejemplo incorporando ribozimas de autoescisión entre o flanqueando las regiones dúplex. Las moléculas de ARNi son formadas fácilmente a partir de moléculas de ADN que tengan una estructura repetida invertida. De manera alternativa, los dúplex de ARNi pueden ser formados a partir de dos moléculas de ARN con regiones complementarias. Las moléculas de ARNi con regiones de doble hebra de más de 30 pares de bases pueden ser usadas si se localiza nuclearmente, por ejemplo, si son producidas sin señales para la exportación citoplásmica, como secuencias poliadeniladas. Hasta recientemente, no se había demostrado que el ARNi funciona en células humanas. Recientemente, sin embargo, se ha demostrado que el ARNi (también llamado ARNi, ARNi corto, o ARN de horquilla) inhibe la reproducción del VIH-1 en linfocitos T (Novina et al 2002). Las moléculas de ARNi dirigidas al LTR viral, o los genes *vif* y *nef* accesorios inhibieron las etapas inicial y final de la reproducción del VIH en líneas celulares y linfocitos principalmente (Jacque et al 2002). El ARNi también ha sido dirigido exitosamente a otros virus (por ejemplo Gtitlin et al 2002) y puede ser dirigido contra genes endógenos.

Los agentes de ARN dados a conocer en la presente memoria para usarse en la invención pueden ser expresados de promotores virales (por ejemplo, LTR retroviral, citomegalovirus) u otros promotores que utilicen ARN polimerasa II para la expresión de alto nivel. El agente de ARN puede ser incorporado en transcritos más largos, por ejemplo, en la región no traducida 3' de un gen marcador. El transcrito puede ser modificado para la autoescisión para la liberación del agente. El agente de ARN también puede ser expresado de promotores de ARN polimerasa III usando constructos genéticos derivados de genes de ARNt, adenovirus VA1, U1 y U6 u otros genes de ARN nucleares pequeños. Además, el agente de ARN puede ser provisto con señales que ayuden a la colocalización del agente con la molécula diana (por ejemplo, véase Michienzi et al 2000).

La racionalización científica para la utilización de una ribozima u otros genes para tratar el VIH u otras infecciones se muestra esquemáticamente en la Figura 2.

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un beneficio terapéutico permitiendo la emergencia a largo plazo de linfocitos T protegidos del timo, con mayor supervivencia de las células CD4<sup>+</sup>, y el establecimiento de un incremento en la respuesta inmune por elementos inmunes protegidos.

### **Hematopoyesis**

Las células hematopoyéticas incluyen células normalmente encontradas en la sangre así como células que dan lugar a células normalmente encontradas en la sangre, como las células encontradas en la médula ósea. En este contexto "normalmente" incluye la situación en la que una persona es tratada para alterar el número o calidad de las células en la sangre o médula ósea. El proceso de diferenciación de las células hematopoyéticas se representa esquemáticamente en la figura 3. La hematopoyesis es el proceso a través del cual se mantiene el sistema que forma la sangre. Este proceso implica un equilibrio entre la muerte celular y la regeneración y diferenciación de nuevas células.

La producción de células linfoides maduras requiere que las precursoras abandonen la médula ósea, pasen a través de los mecanismos de selección dentro del timo y sean exportadas como células indiferenciadas a la sangre periférica. La eficiencia de este proceso está relacionada con la edad puesto que el timo evoluciona con la edad y su tasa de exportación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> decae en consecuencia. La supervivencia y expansión de linfocitos T para dar lugar a células T activadas y con memoria depende de mecanismos homeostáticos naturales.

5 La hematopoyesis es mantenida por un conjunto de células troncales hematopoyéticas (HS) pluripotentes las cuales tienen la capacidad a largo plazo de autorrenovarse, así como de dar lugar a una progenie que prolifera y se diferencia en células sanguíneas efectoras maduras de los grupos mieloide y linfoide (Ogawa et al 1993, Orlic y Bodine 1994). Los números de células progenitoras (HS) son mantenidos por división celular, de modo que esas células son efectivamente inmortales. por lo menos en teoría, el sistema hematopoyético completo podría ser regenerado a partir de una sola célula HS. Muchas de esas células HS están en reposo en el cuerpo (Hodgson y Bradley 1979, Jones et al 1990).

10 Las células hematopoyéticas progenitoras (HP) se caracterizan por la presencia del antígeno de la superficie celular CD34 y su capacidad para dar lugar a una progenie multilinaje de los tipos mieloide y linfoide. Algunas células hematopoyéticas progenitoras CD34<sup>+</sup> tienen la capacidad de autorrenovarse y pueden ser consideradas células troncales verdaderas, mientras que otras células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> pueden no tener la capacidad de autorrenovarse o únicamente una capacidad limitada. El antígeno CD34<sup>+</sup> está ausente sobre la mayoría de las células hematopoyéticas maduras.

15 Las células CD34<sup>+</sup> son por sí mismas heterogéneas (Bertolini et al 1998) y pueden ser fraccionadas en subpoblaciones sobre la base de la expresión de otros marcadores, por ejemplo CD38 (Hogan et al 2002). Las células CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> humanas, que representan aproximadamente el 5% de la población de células CD34<sup>+</sup>, demostraron tener una mejor capacidad de reconstitución a largo plazo en el modelo de ratón SCID que las células CD38<sup>+</sup> (Hogan et al 2002). De este modo, 2.5 x 10<sup>4</sup> CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> (CD34<sup>+</sup>/CD38baja) pueden ser equivalentes a 5 X 10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup>. Otros marcadores que pueden ser usados para enriquecer la población de células para células con capacidad de reconstitución a largo plazo incluyen Thy-1<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>, KDR<sub>+</sub> humano (receptor VEGF), C1QR<sub>p</sub><sup>+</sup> humano, HLA-DR<sup>-</sup>, y retención de tintes vitales de bajo nivel como la Rodamina 123 o el Hoechst 33342.

20 Informaciones recientes indican que pueden existir células HS que carezcan del antígeno CD34 durante por lo menos algún tiempo (Halene and Kohn 2000, Dao y Naolta 2000). Ha sido demostrada la expresión reversible del marcador CD34 sobre células HS murinas, sugiriendo que el CD34 actúa como un marcador de activación (Sato et al 1999). Las células CD34<sup>-</sup> han demostrado ser capaces de producir un injerto multilinaje y dar lugar a células CD34<sup>+</sup> (Zanjani et al 1998).

25 La capacidad de las células HP, las cuales van a ser alteradas por la terapia génica de acuerdo a esta invención, para injertarse y dar lugar a una progenie diferenciada multilinaje a largo plazo es una característica crítica de la presente invención. Esta proporciona la persistencia de células hematopoyéticas modificadas genéticamente en el sujeto humano. Esta capacidad puede ser ensayada por la capacidad para repoblar los sistemas hematopoyéticos de animales sometidos a mieloablación (Harrison 1980, Harrison 1988) o preferentemente humanos sometidos a mieloablación, o más preferentemente humanos no sometidos a mieloablación. Todavía más preferentemente, esta capacidad es ensayada en el contexto de infecciones virales, como la infección por VIH-1.

### **Células HP y su aislamiento**

35 El aislamiento y purificación de células HP humanas ha sido revisado recientemente (To et al 1997, Huss 2000, Thomas et al 1999, Sadelain et al 2000).

Las células HP para usarse en la terapia génica de acuerdo a la invención pueden ser aisladas de sangre periférica después de la movilización, médula ósea, o sangre del cordón umbilical. Las células HP también pueden ser obtenidas de células troncales que den lugar a células hematopoyéticas.

40 Las células HP son obtenidas preferentemente de sangre periférica después de la movilización (Huss 2000). Existen algunas ventajas en el aislamiento de células HP de sangre periférica movilizada. Puede recogerse un número absoluto mayor de células CD34<sup>+</sup> de la sangre periférica después de la movilización en comparación con la médula ósea o la sangre del cordón umbilical, debido a la cantidad relativamente grande de sangre que puede ser procesada. El procedimiento no requiere anestesia general y está asociado con costes de hospitalización reducidos. Como resulta conocido en la técnica (por ejemplo, Fu y Liesveld 2000) la movilización puede ser efectuada por tratamiento con una o más citocinas, opcionalmente agregando un curso corto de quimioterapia con agentes como la ciclofosfamida (Campos et al 1993). Las células HP pueden ser movilizadas hacia la sangre periférica usando G-CSF (Ho 1993, Lane et al 1995), G-CSF pegilado, G-CSF conjugado, GM-CSF (Siena et al 1989), o cualquier combinación de los mismos. La movilización puede ser mejorada combinando una o más de esas citocinas con otras como el factor de las células troncales (SCF), ligando Flt-3 (Ho et al 1996 abreviada como Flt3), o interleucina 3 (IL-3; Huhn et al 1996). La movilización puede ser mejorada contrarrestando al factor 1 derivado de células estromales (SDF-1; Benboubker et al 2001) u otros factores que actúan negativamente para restringir la movilización. La movilización de las células HP de sangre periférica usando G-CSF en individuos infectado con VIH ha sido demostrada por Law et al en 1999. La movilización máxima fue lograda después de 4 días de administración de G-CSF. Las células HP pueden ser obtenidas por aféresis los días 4, 5, 6 o posteriores. Los niveles de células CD34<sup>+</sup> en la sangre pueden ser verificados desde aproximadamente el día 3 en adelante, por ejemplo pueden ser efectuados conteos de sangre completos (CBC), conteo diferencial y de plaquetas diariamente durante la administración de citocina para evaluar el grado de leucocitosis. El conteo de células CD34<sup>+</sup> es preferentemente mayor de 20 células/mm<sup>3</sup> antes del inicio de la aféresis.

La aféresis puede ser llevada a cabo con el Cobe Spectra (Gambra), Hemonetics (Domediac), Amicus (Baxter) o equipo equivalente. La aféresis da como resultado una población de leucocitos altamente rica en células mononucleares y pobre en granulocitos, que resulta deseable. Si se obtienen suficientes células CD34<sup>+</sup> de una primera serie de movilización/aféresis, el procedimiento puede ser repetido con el mismo régimen de movilización o modificado.

5 Alternativamente, la aféresis puede ser repetida. Las células CD34<sup>+</sup> del primer procedimiento pueden ser criopreservadas y combinadas con las de procedimientos posteriores.

Se ha demostrado que las células HP primitivas están reducidas o ausentes en pacientes con infección por VIH (Marandin et al 1996); siendo más difícil obtener números suficientes de células en el contexto de la infección por VIH.

10 Las células HP también pueden ser aisladas de médula ósea aspirada aislando células mononucleares (MNC) y purificando células CD34<sup>+</sup>. Las células HP también pueden ser aisladas de sangre de cordón umbilical (Gluckman 2000). Pueden obtenerse hasta 200 ml de sangre de cordón al nacimiento. Esas células pueden ser criopreservadas y usadas para la transducción y el trasplante exitosos posteriores (Huss 2000). Existe evidencia de que las células HP de sangre de cordón umbilical son transducidas más fácilmente y tienen mayor potencial de autorrenovación que las de la sangre periférica (Moore y MacKenzie 1999).

15 Han sido desarrollados dispositivos que permiten el enriquecimiento de las células CD34<sup>+</sup> para uso clínico, incluyendo el Isolex 300i o equivalente. Eso se basa en el reconocimiento del antígeno de la superficie celular CD34<sup>+</sup>, que es una sialomucina transmembranal que es expresada sobre células HP y sobre células endoteliales vasculares. Los procedimientos incluyen procedimientos inmunoselectivos usando anticuerpos con especificidad para el antígeno CD34, anticuerpos que pueden ser marcados con marcas magnéticas o fluorescentes o de otro tipo que permitan la selección.  
20 Las células pueden expresar la proteína CD34 internamente pero no permitirían la inmunoselección. Únicamente las células que expresan el antígeno CD34 sobre la superficie celular al mismo tiempo, que permiten el acceso al anticuerpo, son consideradas CD34<sup>+</sup>.

25 Las poblaciones de células hematopoyéticas que están altamente enriquecidas en células CD34<sup>+</sup> pueden asimismo ser obtenidas de la fuente mencionada anteriormente por estrategias de agotamiento de antígeno, por ejemplo, para agotar selectivamente la población de células que expresan marcadores específicos del linaje como glicoproteína A CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, o CD66b. Este tipo de estrategia permite el aislamiento de poblaciones de células ricas en células HS CD34<sup>-</sup> así como células CD34<sup>+</sup>. El conjunto enriquecido de CD34<sup>+</sup> o las células empobrecidas en linaje preferentemente comprenden por lo menos 40%, más preferentemente por lo menos 60%, y todavía más preferentemente por lo menos 80% de células de este tipo. Puede existir un equilibrio entre la pureza y la recuperación de las células deseadas.  
30

La proporción de células CD34<sup>+</sup> en las muestras puede ser determinada por el procedimiento de citometría de flujo, por ejemplo como el efectuado por Bender et al 1991, o procedimientos inmunológicos. El número y proporción absolutas de las células CD34<sup>+</sup> pueden ser determinados por procedimientos estandarizados (Barnett et al 1998, Sandhaus et al 1998). Los conteos absolutos de células nucleadas pueden ser determinados por analizadores hematológicos, o más preferentemente, en ensayos de una sola plataforma, donde los conteos absolutos de CD34<sup>+</sup> son producidos directamente a partir de un solo análisis de citometría de flujo. La enumeración de las células CD34<sup>+</sup> y algunos de los equipos que pueden ser usados han sido revisadas recientemente (Reis 1999).  
35

Una vez aisladas, las células CD34<sup>+</sup> pueden ser cultivadas en cualquier medio adecuado, bien conocido en la técnica, en recipientes como frascos o bolsas, por ejemplos las bolsas de polipropileno permeables a gases (Giarratana et al 1998).  
40

Existen cada vez más evidencias de que la mayoría de las células CD34<sup>+</sup> están implicadas en la reconstitución a corto plazo pero no a largo plazo, y que únicamente una pequeña fracción de todas las células CD34<sup>+</sup> tiene potencial de injerto multilinjaje a largo plazo (véase Bertolini et al 1998). Esto da lugar a problemas sobre la enumeración de los números de CD34<sup>+</sup> en los primeros informes y potencial de injerto (Ducos et al 2000). Se ha demostrado en la presente memoria que las células CD34<sup>+</sup> humanas transducidas y el procedimiento de la invención son capaces de proporcionar injerto multilinjaje a largo plazo.  
45

#### **Tratamiento de las células HP para la transducción con vectores oncorretrovirales murinos.**

La transducción eficiente de células HP humanas con vectores oncorretrovirales murinos (por ejemplo, aquellos basados en MMLV) y algunos otros vectores retrovirales requiere la inducción del ciclo celular, por ejemplo, con una o más citocinas (factor del crecimiento) (Dao y Nolta 1999) o inhibidores del control del ciclo celular. La combinación de trombopoietina (TPO), ligando Flt-3 (FL) y ligado de Kit (KL, también conocido como SCF) ha sido usada *in vitro* (Murray et al 1999, Ng et al 2002). La combinación de MGDF, SCF y FL fue usada en ensayos de repoblación en primates (Wu et al 2000). Amado et al ha demostrado que el tratamiento de células con MGDF y SCF soporta mejor la supervivencia de células precursoras de los timocitos que otras combinaciones de factores en un modelo de ratón (Amado et al 1998).  
50 La IL-3, IL-6, el SCF o el TPO o combinaciones de los mismos han demostrado tener efectos benéficos sobre la transducción de células HP (Nolta et al 1992, Hennemann et al 1999). Las combinaciones FL/SCF/IL-3/IL-6, SCF/G-CSF, FL/SCF/TPO/IL-6, FL/SCF/G-CSF, FL/SCF/TPO y FL/SCF/GM-CSF también han sido usadas en modelos con  
55

animales grandes (Richter y Karlson 2001). Existe evidencia, sin embargo, que la combinación de la IL-3, la IL-6 y el SCF pueden mejorar el injerto (Peters et al 1996). Otros procedimientos para inducir el ciclo de las células HP incluyen la utilización de inhibidores (por ejemplo moléculas antisentido o anticuerpo) de p27 (kip1) (Dao et al 1998, Cheng et al 2000) o factor beta-1 de crecimiento transformador (Ducos et al 2000, Imbert et al 1998) para incrementar los números de células. Sin embargo, la capacidad de las células estimuladas en cualquiera de esas formas y a continuación transducidas para conferir injerto a largo plazo en humanos era desconocida antes hasta esta invención.

El SCF (ligando c-kit) es una citocina producida principalmente por células estromales de la molécula y tiene un papel importante en la supervivencia y la autorrenovación de la HSC (Lyman y Jacobsen 1998). También actúa como comitógeno en el movimiento de las células HS fuera del conjunto de células troncales hacia la progenie. El ligando Flt-3 (FL) es una citocina que se une a una tirosina cinasa del receptor de la clase III que se expresa sobre células hematopoyéticas primitivas (Lyman y Jacobsen 1998). El FL tiene un efecto sinérgico con el SCF sobre la supervivencia y proliferación de las células HP (Dao et al 1997). La trombopoyetina (TPO) es un ligando para el receptor c-Mp1 y es un factor del crecimiento implicado en la hematopoyesis inicial así como la formación de megacariocitos y plaquetas (Solar et al 1998). El MGDF es una forma pegilada y truncada de la TPO y actúa en una forma similar a la TPO; este puede considerarse como equivalente funcional de la TPO. Cualquiera de esas citocinas puede ser modificada, formulada de manera diferencial o conjugada proporcionando aún un efecto equivalente.

### **Ribozimas**

Las ribozimas son ARN enzimáticos que pueden escindir específicamente el ARN (por ejemplo, Haseloff y Gerlach, 1988). Siendo catalíticas, presentan un recambio y por lo tanto pueden escindir moléculas diana o blanco múltiples. Los ribozimas se emparejan con el ARN diana específico en virtud de la secuencia de complementariedad e inducen la escisión en sitios específicos a lo largo del esqueleto fosfodiéster del ARN (Haseloff y Gerlach, 1988; Rossi et al., 1992; Hampel et al 1990; Ojwang et al 1992). La ribozima cabeza de martillo es pequeña, simple y tiene la capacidad de mantener la escisión específica del sitio cuando se incorpora en una variedad de motivos de secuencia flanqueantes (Haseloff y Gerlach, 1988; Rossi et al., 1992). Los requerimientos para la escisión por una ribozima son una región de ARN accesible y, en el caso de la ribozima cabeza de martillo, un motivo diana NUH (donde N es cualquier ribonucleótido y H es los ribonucleótidos A, C o U). La escisión ocurre inmediatamente a 3' del motivo diana NUH. Esas características lo hacen particularmente muy adecuado para la supresión genética. Otros tipos de ribozimas incluyen la llamada ribozima de horquilla, la ribozima del virus delta de la hepatitis (HDV), ARNasa P, secuencia interviniente del Grupo I (IVS), IVS del Grupo II, y motivos identificables por el procedimiento de selección *in vitro*. Los tipos de cabeza de martillo y horquilla se encuentran entre los más pequeños y más ampliamente utilizados.

### **Descripción de Rz2**

Un número de estudios han demostrado la actividad de escisión de la ribozima en reacciones en tubo de prueba, y efectos protectores en sistemas de cultivo tisular contra aislados de VIH-1 de laboratorio y clínicos (Sarver et al. 1990; Sun et al. 1995; Wang et al 1998). Una ribozima cabeza de martillo particular denominada Rz2 es dirigida contra la región muy conservada del gen tat (Figura 4). El gen tat es esencial para la reproducción del VIH-1; este codifica y produce la proteína Tat que es un activador transcripcional del provirus VIH-1 integrado. Sun et al (1995) usó Rz2 para proteger linfocitos T contra el VIH-1 *in vitro* pero no describió los resultados en pacientes. No describieron que debe ser usado un número mínimo de células HP transducidas para el injerto prolongado, o que número debe ser. Amado et al (1999) describen en términos generales el protocolo usado en un ensayo clínico en fase 1 para determinar la factibilidad y seguridad de la transducción de células CD34<sup>+</sup> en individuos infectados con VIH-1 con un vector retroviral basado en MoMLV. No describen los resultados del ensayo o qué número mínimo de células HP transducidas deberá ser usado por el injerto a largo plazo. Los objetivos del ensayo incluyeron determinar la eficiencia de la transducción y la seguridad y para probar si la ribozima conferiría una ventaja de supervivencia (o desventaja) a las células de progenie *in vivo*.

La Figura 4 representa la estructura de Rz2 y su secuencia diana en la posición 5833 a 5849 dentro del VIH-1 cepa HXB2 (secuencia del Genbank K03455), donde la escisión se produce después del triplete GUA en la posición 5842. Las secuencias diana comprenden los nucleótidos 5833-5849 (GGAGCCA GUA GAUCCUA) de la cepa de referencia VIH-HXB2 (número de acceso del Genbank K03455) o los nucleótidos 5865 a 5882 (GGAGCCA GUA GAUCCUA) del VIH IIIB (número de acceso del Genbank X01762) o la región correspondiente de otras cepas de VIH. Los nucleótidos de ADN con la secuencia 5'-TTA GGA TCC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACT GGC TC-3' correspondientes a la ribozima Rz2 fueron insertados en el sitio Sall en la región 3' no traducida del gen *neo<sup>R</sup>* dentro del plásmido pLNL6, que contiene el vector retroviral incompetente para la reproducción LNL6 (número de acceso del Genbank M63653) para generar un nuevo virus, RRz2. La secuencia de la ribozima fue expresada como el transcrito de fusión *neo<sup>R</sup>*-ribozima de la repetición terminal larga (LTR) del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) en RRz2.

Resulta preferido que la secuencia nucleotídica inmediatamente alrededor del sitio de escisión de la ribozima esté muy conservada en el ARN diana viral. Esto puede ser determinado fácilmente mediante la comparación de secuencias disponibles en bases de datos de secuencia, o demostrado experimentalmente por ensayos de pasajes múltiples (Wang et al 1998). El sitio objetivo/escisión de Rz2 en el VIH-1 está conservado en casi todos los aislados infecciosos naturales. En el ensayo clínico en Fase I, se observaron dos variantes de la secuencia en las posiciones -4 y

-1 con relación al triplete GUA en el sitio de la escisión. Sin embargo, esas variantes pueden representar pseudotipos menos ajustados.

5 Puesto que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, los monocitos y los macrófagos son los más susceptibles a la infección por VIH, la modificación genética de esas células de modo que expresen Rz2 conduce a la inhibición de la infección por VIH. Preferentemente, la modificación genética es efectuada durante la etapa inicial de la hematopoyesis.

### **Vectores**

10 Pueden ser usados diferentes tipos de vectores para la transducción o transformación de las células HP. Incluyen plásmidos o vectores virales. Los vectores retrovirales han sido ampliamente usados en la terapia génica (Chu et al 1998), particularmente los basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), un miembro de los oncoretrovirus murinos. Otros vectores retrovirales murinos que pueden ser usados incluyen los basados en virus de células troncales embrionarias murinas (MESV) y virus de células troncales murinas (MSCV). Los vectores basados en oncoretrovirus murinos pueden ser usados para la transducción altamente eficiente de células, sin embargo, requieren que las células estén activas en división celular. Después de la entrada al citoplasma celular y la transcripción inversa, el transporte del complejo preintegración al núcleo requiere el rompimiento de la membrana nuclear durante la mitosis. La transducción de las células HP con vectores basados en retrovirus murinos requiere por lo tanto la activación de las células.

20 Los vectores lentivirales (Amado y Chen 1999), una subclase de los vectores retrovirales, también pueden ser usados para la transducción altamente eficiente (Haas et al 2000, Miyoshi et al 1999, Case et al 1999) y pueden transducir células que no estén dividiéndose (Uchida et al 1998, Sutton et al 1998). El complejo de preintegración puede entrar al núcleo sin mitosis, y por lo tanto la transducción lentiviral no requiere la inducción de células HP en el ciclo celular. Esto incrementa la probabilidad de que las células permanezcan pluripotentes. La utilización de vectores lentivirales en la terapia génica contra el VIH-1 ha sido revisado (Mautino y Morgan 2002).

Otros grupos de retrovirus como los espumavirus, por ejemplo, los virus espumosos (Vassilopoulos et al 2001) pueden asimismo transducir eficientemente células que no estén dividiéndose.

25 Otros tipos de vectores virales que pueden ser usados en la invención incluyen vectores adenovirales (Fan et al 2000, Knaan-Shanzer et al 2001, Marini et al 2000), vectores virales adenoasociados (AAV) (Fisher-Adams et al 1996), vectores basados en SV40 (Strayer et al 2000), o formas de vectores híbridos (por ejemplo Feng et al, 1997 o Lieber et al 1999). Los vectores adenovirales pueden ser producidos fácilmente en altos títulos, dado que pueden ser fácilmente concentrados ( $10^{12}$  ufc/ml), y pueden transducir células que no estén dividiéndose. Pueden ser alojados insertados en ADN grandes (7-8 kb). Las reacciones inmunes contra adenovirus *in vivo* pueden ser aliviadas extrayendo genes que codifiquen para ciertas proteínas.

35 Los vectores AAV no son patógenos, transducen células proliferantes y no proliferantes, incluyendo células CD34<sup>+</sup>, y se integran de manera estable en el genoma celular (Grimm y Kleinschmidt 1999). Además, no inducen una respuesta inmune del hospedador y pueden ser producidos en sistemas libres de auxiliares en altos títulos de aproximadamente  $10^{10}$  ufc por ml. El AAV es un virus no envuelto con un genoma de ADN de una sola hebra. Los vectores AAV pueden incorporar fácilmente hasta aproximadamente 4 kilobases de ADN nuevo, aunque estudios recientes han ampliado esto. Los vectores AAV pueden transducir efectivamente células CD34<sup>+</sup> en cultivos a largo plazo (Chatterjee et al 1999).

40 Los vectores que dan como resultado la integración del gen introducido en el genoma de las células, son los preferidos para obtener un efecto largamente duradero después del retorno de las células al paciente, por ejemplo, los vectores retrovirales, incluyendo los vectores lentivirales, y vectores AAV. Los vectores virales integrantes son definidos en la presente memoria como los que dan como resultado la integración de todo o parte de su material genético en el genoma celular. Incluyen vectores retrovirales y vectores AAV. Incluyen asimismo también vectores híbridos, vectores adenovirales/retrovirales (por ejemplo, Feng et al 1997) y vectores adenovirales/AAV (por ejemplo, Lieber et al 1999). Sin embargo, también pueden ser usados vectores que se reproduzcan de manera estable como episomas. También es deseable que el vector pueda ser producido en líneas celulares hasta un título alto, de bajo coste, y que tenga el mínimo riesgo para los pacientes, por ejemplo que no de lugar a virus que compitan con la reproducción.

### **Producción del vector**

50 Los procedimientos para construir y producir vectores retrovirales son examinados en Gambotto et al (2000). Los vectores son empaquetados en líneas de células empaquetadoras como las líneas celulares PA317 o AM-12 las cuales contienen vectores auxiliares defectuosos en el empaquetamiento. Han sido descritas varias variaciones en los procedimientos para producir sobrenadantes retrovirales con altos títulos (Schilz et al 2001), incluyendo variaciones en el medio, células empaquetadoras, la temperatura de cosecha y procedimientos de concentración por centrifugación o complejación (Le Doux et al 2001). Cualquiera de esos procedimientos pueden ser usados con la presente invención.

55 Los retrovirus empaquetados en envolturas anfotrópicas murinas pueden no transducir células HP primitivas eficientemente debido a los bajos niveles del receptor anfotrópico (Bodine et al 1998). Sin embargo, la inducción del ciclo celular ha demostrado conducir a un incremento en la expresión del receptor anfotrópico con un incremento

concordante en la transferencia del gen (Orlic et al 1999). Un procedimiento alternativo es el de los vectores retrovirales pseudotipo con envolturas como la envoltura del virus de la leucemia del simio gibbon (GALV) (Kiem et al 1997, Eglitis y Schneiderman 1997, Relander et al 2002), virus de la estomatitis vesicular (proteína VSV-G) (Naldini et al 1996, von Laer et al 1998) o virus endógeno felino (Kelly et al 2002). Los vectores de pseudotipificación pueden permitir la concentración, por ejemplo por centrifugación.

Los vectores AAV pueden ser producidos en líneas de células empaquetadoras o en células que expresen los genes rep y cap AAV ya sea de manera constitutiva o transitoria. La producción de vectores AAV ha sido examinada (Grimm y Kleinschmidt 1999), incluyendo el desarrollo de procedimientos de empaquetamiento libres de auxiliares y el establecimiento de líneas productoras de vectores. Los vectores adenovirales pueden ser producidos y purificados de acuerdo a procedimientos estándar (por ejemplo véase Fan et al 2000).

El título biológico de los patrones virales puede ser determinado fácilmente (por ejemplo Tavoloni et al 1997).

### **Expresión del gen en vectores**

El gen introducido es expresado en las células HP humanas transducidas de la presente invención o las células de progenie de un promotor. El promotor puede ser expresado de manera constitutiva o inducible, por ejemplo, siendo expresado preferentemente bajo condiciones o circunstancias favorables (por ejemplo Chang y Roninson 1996, Saylor et al 1999). Los promotores/mejoradores de los vectores virales como el promotor LTR retroviral de MoMLV puede ser modificado para mejorar la expresión (Robbins et al 1998, Halene et al 1999) o modificado mediante la inserción de elementos como aislantes (Rivella et al 2000) o regiones de unión por andamiaje (SAR) (Murray 2000). Los promotores y elementos reguladores adicionales preferidos, como las señales de poliadenilación, son los que deberán producir una expresión máxima en el tipo de célula (por ejemplo linfocitos T) en el que el agente de la terapia génica va a ser expresado. De este modo, por ejemplo, el VIH-1, VIH-2, HTLV-1 y HTLV-2 infectan en su totalidad a las células linfoides, y para expresar eficientemente el agente de la terapia génica contra esos virus, se selecciona una unidad de control transcripcional (promotor y señal de poliadenilación), los cuales proporcionan la expresión eficiente en células (o tejidos) hematopoyéticos, particularmente linfoides. Los promotores preferidos son el promotor inicial inmediato de citomegalovirus (CMV), usado opcionalmente en conjunto con la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento, y el promotor LTR de MuLV de Moloney. Una característica deseable de un promotor LTR es que presenta el mismo tropismo tisular que los retrovirus de su origen. El promotor CMV es expresado en linfocitos. Otros promotores incluyen a los promotores de VA1 y ARNt los cuales dependen de la ARN polimerasa III. El promotor de metalotioneína tiene la ventaja de inducibilidad. El promotor inicial de SV 40 exhibe un alto nivel de expresión *in vitro* en células de médula ósea. Pueden ser usados promotores específicos de células hematopoyéticas en lugar de promotores virales (por ejemplo Malik et al 1995).

La expresión de varios genes anti-VIH de vectores basados en MoMLV fue mantenida a largo plazo (Austin et al 2000, Su et al 1997). Los vectores basados en retrovirus diferentes al MoMLV han mostrado una expresión prolongada, por ejemplo para vectores de virus de células troncales de ratón (MSCV) (Cherry et al 2000) o FrMLV (Cohen-Haguenauer et al 1998). La expresión de vectores lentivirales también parece ser mantenida en células transducidas (Case et al 1999). La pérdida de expresión del gen de vectores retrovirales ha sido observada varias veces después de la transducción de células hematopoyéticas murinas (Challita y Kohn 1994, Lange y Blankenstein 1997) pero ha sido raramente observada en células HP humanas transducidas en humanos.

### **Procedimientos de transducción**

En el caso de la transducción con algunos vectores retrovirales murinos, puede ser necesario que las células HP humanas sean tratadas con factores de crecimiento para inducir el ciclo celular (véase anteriormente). Este puede no ser el caso con otros vectores retrovirales después de cualquier tratamiento, las células necesitan ser puestas en contacto con un vector transductor.

En el procedimiento de transducción de esta invención, resulta preferido usar la fibronectina de la proteína de la matriz extracelular (o fragmentos quimiotrópicos de la fibronectina) que mejora la colocación de las células y partículas virales e incrementa las frecuencias de transducción (Hanenberg et al 1996, Hanenberg et al 1997, Kramer et al 1999, Williams et al 1999), o más preferentemente, el fragmento de fibronectina recombinante CH-296. Los fragmentos equivalentes que contienen el dominio de unión de heparina y también puede ser usada la región del segmento de conexión del tipo 3 alternativamente empalmado (Kiem et al 1998). la utilización de CH-296 también puede ayudar al mantenimiento del potencial regenerativo de las células HP como se muestra en un modelo del injerto de ratón (Dao et al 1998). Se utilizaron las combinaciones de CH-296 y factor del crecimiento en un modelo canino (Goerner et al 1999) pero se desconoce cómo se aplicaría esto a humanos. También pueden ser usados otros agentes de colocación como el polibreno y sulfato de protamina. Esos agentes actúan incrementando el título aparente de partículas virales.

La colocación física de las células y vectores también puede conseguirse sobre filtros membranales (Hutchings et al 1998) o por centrifugación en tubos recubiertos con fibronectina (Sanyal y Schuening 1999).

El cocultivo de células HP sobre monocapas de fibroblastos murinos productores de vector conduce a una

transducción eficiente del gen pero no es clínicamente útil puesto que expondría a los pacientes a grandes números de células murinas infundidas (Halene y Kohn 2000). En contraste, las células troncales mesenquimales humanas pueden proporcionar soporte estromal para la transducción eficiente de CD34<sup>+</sup> (Reese et al 1999).

5 Pueden ser usados procedimientos libres de suero para preparar vectores retrovirales para la transducción de células HP humanas (por ejemplo Glimm et al 1998, Schilz et al 1998). La frecuencia de transducción puede ser incrementada, particularmente para células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>bajas, en presencia del fragmento de fibronectina reduciendo la concentración del medio que contiene el vector o precargando el vector solo sobre el fragmento de fibronectina (Relander et al 2001). También puede lograrse un incremento en la frecuencia de la transducción enriqueciendo las preparaciones de virus, por ejemplo con polímeros catiónicos y aniónicos (LeDoux et al 2001).

10 La transfección de células por medios no virales puede ser lograda mediante la utilización de liposomas catiónicos, o complejos de ADN-proteína como complejos de poli-lisina-ADN, y otros medios conocidos en la técnica.

Varios autores han examinado las condiciones para la transferencia genética en células hematopoyéticas humanas (Moore y MacKenzie 1999, Sadelain et al 2000).

### **Frecuencia de la transducción**

15 La frecuencia de la transferencia de genes en células HP humanas puede ser determinada por procedimientos estándar, por ejemplo PCR o detección fluorescente (Gerard et al 1996). Han sido obtenidas frecuencias de transducción de hasta el 70-100% con vectores retrovirales, pero ésta fue para muestras de células relativamente pequeñas (Halene et al 1999). El escalamiento a niveles clínicamente relevantes de material generalmente da como resultado frecuencias de transducción más bajas, particularmente para las células HP más primitivas que son necesarias para la reconstitución a largo plazo (por ejemplo en el intervalo de 1-5% sin agentes de colocalización).

20 Se ha sugerido que pueden obtenerse números mayores de células HP transducidas por expansión *in vitro*. Sin embargo, esto puede conducir a pérdidas de totipotencia de las células y daño a las células troncales (Bunting et al 1999, Briones et al 1999, Takatoku et al 2001). Resulta preferido que la expansión *in vitro* sea mantenida en un mínimo, aunque algunas condiciones de cultivo permiten alguna expansión de las células HP sin pérdida de repoblación potencial (Kobari et al 2000, Lewis y Verfaillie 2000, Rosler et al 2000). Por ejemplo, puede ser usada la combinación de citocinas Flt3-ligando, SCF y trombopoyetina (TPO) (Ng et al 2002). La adición adicional de IL-3 e IL-6 no fue preferida (Herrera et al 2001). De manera alternativa o adicional, el cultivo de las células después de la transducción con SCF únicamente durante dos días puede mejorar el potencial del injerto (Dunbar et al 2001). El tratamiento para desactivar las células de la postransducción puede mejorar el potencial del injerto.

30 La frecuencia de transducción de células HP humanas aisladas de sangre de cordón umbilical con vectores retrovirales se incrementó cuando la sangre del cordón fue criopreservada primero (Orlic et al 1999).

Las células HP humanas transducidas también pueden ser enriquecidas introduciendo genes marcadores como los que codifican para reporteros de la superficie celular (por ejemplo véase Fehse et al 1997), sin embargo este puede no ser deseable en un escenario clínico.

35 Las frecuencias de transducción pueden ser medidas por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo por PCR, crecimiento de colonias en presencia de agentes selectivos como G418 cuando es incluido un marcador seleccionable en el constructo, o clasificación activada por fluorescencia. Resulta preferido que la frecuencia de transducción sea medida sobre una muestra verdaderamente representativa de células de la población total, por ejemplo por medios de PCR cuantitativos (por ejemplo PCR en tiempo real) sobre el ADN total de una muestra de la población de células. El análisis de las frecuencias de transducción sobre colonias individuales producidas de células en la población no es el preferido, pero no se excluye.

Se ha descubierto en la presente invención que debe ser usado un número mínimo de células HP humanas transducidas para el injerto prolongado. Además, las células HP transducidas pueden ser capaces de experimentar timopoyesis para dar un aumento en los leucocitos multilineaje diferenciados.

### **Tipos de genes introducidos**

45 Puede ser introducido cualquier gen por transducción en células HP humanas por la presente invención. Si existe el potencial de efectos dañinos de expresión del gen sobre la función de células HP donde esto no sea deseable, la expresión del gen puede ser controlada por promotores regulables, bien comprendidos en la técnica.

50 Deberá considerarse que la presencia de un gen externo expresado consecutivamente en células HP transducidas puede interferir con los procesos de migración, alojamiento y diferenciación de las células no diferenciadas. Una respuesta inmune dirigida a una proteína apropiada también puede conducir a la eliminación de células que contengan el gen. Esto ha sido observado después de la liberación del gen mediada por adenovirus pero normalmente no ocurre después de la liberación del gen mediada por retrovirus o la introducción de genes en células CD34<sup>+</sup>. Generalmente no son observadas reacciones inmunológicas al producto del neo gen. Se ha descubierto en la presente invención que la introducción de un gen externo expresado constitutivamente en dos vectores retrovirales diferentes no

55

interfirió con los procesos de migración, alojamiento y diferenciación de las células no diferenciadas. Además, se espera que la utilización de células HP humanas diana para la corrección de enfermedades genéticas sea ventajoso dado que el desarrollo de tolerancia inmunológica al producto transgénico puede ser inducido en esas células (Halene y Kohn 2000).

5 Además, se espera que productos de ARN del transgen como las ribozimas tengan inmunogenicidad despreciable. El gen RevM10 que codifica para una proteína anti-VIH no inhibió la diferenciación de células CD34<sup>+</sup> humanas transducidas en ratones SCID (Su et al 1997, también Yu et al 1995). Proteínas como INFalfa han sido expresadas en células CD34<sup>+</sup> sin afectar el injerto y diferenciación en ratones NOD/SCID (Quan et al 1999).

10 Además, las células HP humanas pueden ser modificadas para proporcionarles una ventaja selectiva *in vivo* en ciertas circunstancias (por ejemplo Kirby et al 2000) o en presencia de agentes selectivos (Omori et al 1999, Ragg et al 2000).

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Reactivos

Todas las etapas se efectuaron asépticamente en una cabina de seguridad biológica clase II.

15 1.1. Solución de ADNasa (10 mg/ml).

Se usó una solución de ADNasa patrón en la preparación del medio de criopreservación de CD34<sup>+</sup>. Se agregaron 1.4 ml de solución salina estéril (solución salina estéril para inhalación USP (0.9% de NaCl), Dey Corp. NDC# 49502 830) para la ADNasa (ADNasa I Tipo IIS, Sigma Cat# D-4513) en un tubo de eppendorf tapado con rosca, estéril, de 1.5 ml (Sarstedt, Cat# 72692005) y se disolvió por agitación suave. Se almacenó a -20°C. Se usó 1 ml de ADNasa patrón por cada 50 ml de medio de criopreservación.

20 1.2 Medio de criopreservación de PBMC (90% de FBS + 10% de DMSO)

Se usó medio de criopreservación de PBMC para la criopreservación de células PBMC para propósitos de archivo y de prueba de seguridad. El medio se constituyó para proporcionar la recuperación viable máxima de células PBMC tras descongelamiento. Este contenía 90% de suero bovino fetal (StemCell Technologies, Cat# HCC-6450) y 10% de DMSO (Sigma Cat# D-2650), se filtró en forma estéril y se almacenó en alícuotas de 4 ml. Una vez abierto, se reservó una alícuota para la utilización exclusiva de un paciente.

25 1.3 Medio de criopreservación de CD34<sup>+</sup>

Se utilizó para la criopreservación de células CD34<sup>+</sup> para propósitos de pruebas de archivo y seguridad. El medio se constituyó para proporcionar la recuperación viable máxima de las células CD34<sup>+</sup> tras el descongelamiento. Este procedimiento fue usado para la preparación de 50 ml de medio de criopreservación:

Los siguientes fueron pipeteados en un tubo estéril de 50 ml, en este orden:

31 ml de IMDM (Medio de Dulbecco Modificado por Iscove, Gibco BRL, Cat 12440-046).

10 ml de DMSO (Dimetil Sulfoxido; Sigma, Cat# D-2650)

8 ml de Albuminarc25<sup>MR</sup> (Albúmina de Suero Humano al 25% (HSA); American Red Cross, Cat# 451-0513)

35 15 µl de solución de Heparina (10,000 U Heparina/ml; Elkins- Sinn Inc.)

1 ml de solución patrón ADNasa (100 mg/ml). Véase 1. Anteriormente.

Los componentes fueron mezclados perfectamente por agitación. Para filtrar de manera estabilizada, una muestra fue filtrada por un sistema de filtración con Corning de 150 ml (Corning Cat# 25932-200). Se almacenaron alícuotas de 4 ml de tubos de Nunc estériles de 5 ml a -20°C.

40 Se usó un tubo por paciente (4 ml) para las muestras de archivo y las muestras de cocultivo. El medio de criopreservación fue descongelado y mantenido a 4°C hasta estar preparado para su utilización (El DMSO es tóxico a las células a temperaturas superiores).

1.4 MGDF (Factor del crecimiento y desarrollo megacariocítico pegilado humano recombinante 100 µg/ml)

45 El factor de crecimiento y desarrollo megacariocítico pegilado humano recombinante fue usado para cultivar células no diferencias para promover el crecimiento celular y la transducción retroviral. Este fue preparado y formado en alícuotas como una solución patrón de trabajo de 100 mg/ml y agregado al medio de cultivo de células troncales a una concentración final de 100 ng/ml.

El contenido de un frasco de MGDF (Amgen Inc., MGDF pegilado humano recombinante 500 mg/ml en 1 ml de

5 acetato de sodio 10 mM con un contenido de sorbitol al 5%, pH 5) y algo de medio de cultivo IMDM (Medio de Dulbecco Modificado Iscove; Gibco BRL Cat#12440-046) donde se calentó a temperatura ambiente. Usando una técnica aséptica, se retiró 1 ml de solución de MGDF del frasco y se transfirió a un tubo estéril de 15 ml (tubo cónico de polipropileno; Corning Cat #25319-15 o Falcon Cat# 352097). El MGDF fue diluido a un volumen final de 5 ml con 4 ml de IMDM para crear una solución patrón de trabajo de 100 mg/ml. Fueron transferidas alícuotas (1 ml) de solución patrón de trabajo a tubería microcentrífuga de tapa roscada estériles (Sarstedt Cat# 72692005).

10 Una vez preparada, la solución patrón de trabajo de MGDF tiene una vida de anaquel limitada de tres días. Las alícuotas de MGDF preparadas fueron almacenadas a 4-8°C hasta tres días sin congelamiento. Se preparó un lote de MGDF fresco por cada paciente el día de la preparación de la célula CD34<sup>+</sup> (día 0 de cultivo). Por cada paciente, se prepararon alícuotas patrón de trabajo de MGDF de un frasco separado de material que fue desechado después de su uso. Se prepararon alícuotas suficientes para por lo menos cinco preparaciones de medio de cultivo celular individuales.

#### 1.5 Factor de células troncales (factor de células troncales humanas con metionilo recombinantes 50 µg/ml).

El factor celular de las células troncales humanas con metionilos recombinantes fue usado en el medio de cultivo de células troncales para promover el crecimiento celular y la transducción retroviral. Este se preparó co

15 El frasco y el frasco con SCF (Amgen Inc., 1875 mg de SCF con metionilo humano recombinante liofilizado) y el medio de cultivo IMDM (Medio de Dulbecco Modificado por Iscove; Gibco BRL Cat# 12440-046) fueron calentados a temperatura ambiente. Usando una técnica aséptica, se extrajeron 1.25 ml de agua esterilizada a través de una aguja hacia una jeringa y se inyectaron en el frasco con SCF. El SCF fue reconstituido agitando sin sacudir. Usando una aguja y jeringa nuevas, se extrajeron 0.2 ml de la solución de SCF y se agregaron a 15 ml de un tubo cónico estéril que contenía 5.8 ml de IMDM. Esto constituyó 6 ml de una solución patrón de trabajo de 50 mg/ml. Usando una pipeta estéril de 5 ml, se transfirieron alícuotas de 1 ml de solución patrón de trabajo de SCF a tubos de microcentrífuga estériles.

20 Las alícuotas de SCF preparadas fueron almacenadas a 4-8°C durante hasta tres días sin congelamiento. El patrón de 50 mg/ml fue preparado fresco para cada paciente el día de la preparación de las células CD34<sup>+</sup> (día 0 de cultivo). Se usó un frasco de material separado para cada paciente. Cada alícuota fue de un solo uso únicamente para la preparación de medio de cultivo celular diariamente.

#### 1.6 Nevirapina (5 mg/ml de Nevirapine-Virimmune<sup>MR</sup>, 18.7 mM)

30 La nevirapina (Virimmune<sup>MR</sup>) fue usada para inhibir la reproducción del VIH en cultivos de células troncales CD34 durante el periodo del cultivo celular y la transducción retroviral. La nevirapina fue preparada y dividida en alícuotas como una solución patrón de 5 mg/ml (18.7 mM) y agregada al medio de cultivo celular a una concentración final de 500 mM. Se preparó un solo lote de patrón de trabajo de nevirapina para todo el ensayo clínico. Este patrón fue dividido en alícuotas para proporcionar tres frascos por paciente por cada día de preparación en medio de cultivo.

35 Se pesaron aproximadamente 100 mg de polvo anhidro de Nevirapina (Boehringer Ingelheim. Mfr# 43074) en un tubo de 50 ml (Tubo de centrifuga de polipropileno estéril de 50 ml Bluemax<sup>MR</sup>; Falcon Cat# 2098). Se agregó etanol (Alcohol Deshidratado Prueba 200 USP, Punctilious; Quantum Chemical Corp), al tubo para producir una solución de 5 mg/ml. Fueron transferidas alícuotas de 0.5 ml de solución patrón de trabajo de 5 mg/ml a tubos de microcentrífuga tapados con una tapa roscada, estéril, de 1.5 ml (Sarstedt Cat# 72692005) y se almacenó a -20°C.

La solución patrón de Nevirapina fue descongelada a temperatura ambiente antes de su uso. Cada alícuota fue de un solo uso para la preparación de medio de cultivo celular diariamente.

#### 1.7 Suero bovino fetal

40 El suero bovino fetal fue un constituyente del medio de cultivo de CD34<sup>+</sup> y se usó a una concentración del 20%. Los sobrenadantes virales usados para la transducción tuvieron 10% de FBS y por lo tanto fueron suplementados con 10% de FBS antes de usarse en la transducción de las células CD34.

45 El FBS, proporcionado en botellas de 500 ml, fue dividido en alícuotas en volúmenes de 50 ml para minimizar el desperdicio. El suero (suero bovino fetal 500 ml; Stem Cell Technologies HCC-6450) fue descongelado en un baño de agua a 37°C, mezclado con agitación sin sacudir hasta estar visiblemente homogéneo y se dividió en alícuotas asépticamente en volúmenes de 50 ml en tubos de centrifuga de 50 ml (tubo de centrifuga de polipropileno estéril de 50 ml Bluemax<sup>MR</sup>; Falcon Cat# 2098). Las alícuotas fueron almacenadas congeladas. Cada alícuota fue de un solo uso para la preparación del medio diariamente.

#### 1.8 Preparación del medio de cultivo de CD34<sup>+</sup>.

50 Las células CD34<sup>+</sup> aisladas se hicieron crecer en este medio de cultivo durante por lo menos un día antes de la transducción. El medio fue concebido para mantener una alta viabilidad de células progenitoras. Este procedimiento es para la preparación de 500 ml de medio:

Se pipetearon los siguientes en un embudo de filtración (matraz filtro de 0.45 µm con receptor de 500 ml;

Nalgene cat# SFC 162-0045) en este orden:

400 ml de IMDM (Medio de Dulbecco Modificado por Iscove; Gibco BRL, Cat # 12440-046).

100 ml de FBS (Suero bovino fetal en 2 alícuotas de 50 ml de acuerdo a 1.2 anteriormente)

500 ml de SCF (véase 1.5 anteriormente)

5 500 ml de MGDF (véase 1.4 anteriormente)

13.3 ml de nevirapina (véase 1.6 anteriormente)

Se aplicó vacío hasta que la mitad había pasado a su través, entonces el contenido se agitó suavemente para mezclar. La filtración fue completada y el contenido se agitó nuevamente.

10 El medio de cultivo de CD34<sup>+</sup> se preparó fresco cuando se requirió. Este fue almacenado a temperatura ambiente en un ambiente protegido de la luz hasta aproximadamente 30 minutos antes de su uso, entonces se calentó a 37°C en un baño de agua. El medio en exceso de los requerimientos inmediatos fue marcado con el ID# de CRF del paciente y se almacenó a 4°C. Esto no fue usado para ningún otro paciente y se desechó cuando se completó el procedimiento de cultivo/transducción/cosecha celular del paciente.

#### 1.9 Sulfato de Protamina

15 La protamina facilita la unión del vector en el medio acondicionado viral a las células CD34<sup>+</sup> objetivo.

20 El sulfato de protamina de ampollas (Elkin-Sinn, 5 ml, 10 mg/ml) fue dividido en alícuotas para minimizar el desperdicio. Cada transducción de CD34<sup>+</sup> usó dos alícuotas por paciente de modo que se distribuyeron alícuotas de aproximadamente 0.5 ml en 10 tubos de microcentrífuga tapados con tapa roscada estériles de 1.5 ml. Esos fueron almacenados a 4°C sin congelamiento. Un frasco fue usado cada día de la transducción (día 1 y día 2) para preparar la mezcla de transducción al VCM. Las alícuotas fueron de un solo uso y se desecharon después de la preparación de VCM cada día.

#### 1.10 Mezclas de transducción de VCM con sulfato de protamina.

25 Las células CD34<sup>+</sup> cultivadas fueron transducidas con medio acondicionado con virus (VCM) producido por Magenta Corporation (bIOreLIANCE Corp.) bajo condiciones GMP. Existieron dos preparaciones VCM correspondientes a la ribozima y vectores control. El VCM de PA317/RRz2 fue de un menor título que el VCM de PA317/LNL6, por lo tanto se usaron 300 ml de RRz2 o 200 ml de LNL6 por transducción para igualar los números de partículas virales infecciosas en cada transducción.

30 La transducción se prolongó durante dos días consecutivos. Para producir las mezclas de transducción de VCM, cada VCM fue suplementado con factores de crecimiento y suero para igualar el medio de cultivo del primer día como se expone a continuación:

El día 1, una botella de 200 ml de VCM de PA317/LNL6, dos botellas de 200 ml de PA317/RRz2 y 2 alícuotas de 30 ml de Suero bovino fetal fueron descongeladas completamente a 37°C en un baño de agua. Una alícuota de Nevirapina fue descongelada a temperatura ambiente y los otros reactivos calentados a temperatura ambiente: 1 alícuota de Sulfato de Protamina, 1 alícuota de SCF, 1 alícuota de MGDF.

35 La preparación de la mezcla de LNL6 fue completada antes de comenzar la mezcla de RRz2. Para preparar el VCM de LNL6, se pipetearon los siguientes en un embudo filtro (matraz filtro de 0.45 mm de Nalgene con receptor de 500 ml, Nalge SFCA 162-0045) en este orden:

20 ml de FBS (véase anteriormente)

88 ml de sulfato de protamina (véase a continuación)

40 220 ml de SCF (véase anteriormente)

220 ml de MGDF (véase anteriormente)

6 ml de nevirapina (véase anteriormente)

200 ml de PA317/LNL6 (PA317/LNL6-3; Magenta Corporation, título de  $1.4 \times 10^7$  ivp/ml).

El embudo fue agitado suavemente para mezclar y se le aplicó vacío para filtrar la mezcla.

45 El VCM de RRz2 fue preparado de la misma forma con la excepción de que se usaron los volúmenes siguientes:

30 ml de FBS

132 ml de sulfato de protamina

330 ml de SCF

330 ml de MGDF

5 9 ml de nevirapina

300 ml de PA317/RRz2 (PA317/RRz2-17R<sup>+</sup>; Magenta Corporation, título de  $0.8 \times 10^7$  ivp/ml)

Los 100 ml restantes de RRz2 VCM fueron marcados con el CRF# e inmediatamente congelados de nuevo a -80°C. Estos fueron usados al segundo día de la transducción.

10 Se siguió el mismo procedimiento el Día 2 para la preparación de las segundas mezclas de transducción de VCM LNL6 y RRz2 con la excepción de que se usó una botella de 200 ml de PA317/RRz2 y los 100 ml restantes del Día 1 fueron usados para la mezcla de RRz2.

Cada mezcla de transducción de VCM fue preparada fresca cada día de la transducción y almacenada en el gabinete de seguridad biológica hasta que las células CD34<sup>+</sup> estuvieron listas para la transducción.

1.11 Preparación de la Retronectin<sup>®</sup> (25 mg/ml de Retronectina en PBS).

15 Se usó una solución de Retronectin<sup>®</sup> (fragmento de fibronectina humana CH-296) para recubrir recipientes de cultivo tisular para facilitar la transducción retroviral de células CD34<sup>+</sup>.

20 Un frasco que contenía 2.500 mg de Retronectin<sup>®</sup> liofilizada de Takara Shuzo Co. Ltd., código #T100B, ordenado de BioWhittaker, fue calentado a temperatura ambiente. Se le agregaron 2.5 ml de agua estéril, el material fue disuelto agitando suavemente, extraído con una jeringa con aguja. La mezcla fue filtrada a través de un filtro Millex (Millipore, cat # SLGV 013 OS) en un tubo de 50 ml (tubo de cultivo tisular de 50 ml, estéril; Falcon Cat# 2098) y diluida con 4 ml de PBS dividido en dos tubos de 50 ml y aforando a 100 ml de volumen total. Se extrajeron 200 ml para la prueba de endotoxina al mismo tiempo que el producto final, el resto fue almacenado a 4°C. Generalmente, el reactivo fue recubierto sobre los recipientes inmediatamente.

1.12 Preparación de HSA al 2% (seroalbúmina humana en PBS).

25 La HSA al 2% fue usada para bloquear los recipientes de cultivo tisular después de que fueron recubiertos con Retronectina. Esta se preparó asépticamente mezclando 8 ml de solución de HSA al 25% (Albumarc25<sup>MR</sup>) con 92 ml de PBS (libre de calcio y magnesio, 1x; Virus Core Lab o JRH Biosciences Cat #59321-78p). El reactivo fue usado generalmente de manera inmediata.

1.13 Recipientes recubiertos con Retronectina.

30 Se usaron matraces recubiertos con Retronectina para algunos pacientes para transducir células CD34<sup>+</sup> con vectores retrovirales.

35 Se pipetearon 25 ml de solución de Retronectina (ver anteriormente) en 4 matraces de 175 ml (matraces de plástico Bacteriales 175 cm<sup>2</sup>, con cierres ventilados de 0.2 μm, Sarstedt 83.1812.502) y se dejaron reposar durante dos horas a temperatura ambiente. La solución fue extraída de los matraces y se agregaron 25 ml de HSA al 2%. Después de 30 minutos adicionales a temperatura ambiente, la solución fue extraída y los matraces lavados con 25 ml de IMDM (Medio de Dulbecco Modificado por Iscove; GIBCO BRL; Cat #12440-046). Los matraces fueron sellados en bolsas de plástico y almacenados a 4°C antes de usarse dentro de 2-3 días.

1.14 Mezclas de transducción de VCM (usadas con Retronectina).

40 Cuando los matraces recubiertos con retronectina fueron usados para las transducciones, se omitió sulfato de protamina de las mezclas de transducción de VCM. Esas se prepararon en una forma similar a las descritas en 1.10., anteriormente excepto que se usaron los siguientes volúmenes:

45 Para la primera transducción en la mañana del día 2, se descongelaron 200 ml de alícuotas de preparación de virus en un baño de agua a 37°C, como lo fue la alícuota de FBS. Las mezclas de transducción de VCM LNL6 o RRz2 (con Retronectina) fueron preparadas agregando un embudo filtro (matraz filtro de 0.45 μm de Nalgene con un receptor de 250 ml, Nalge SFCA 162-0045) en este orden:

10 ml de FBS (véase anteriormente)

110 ml SCF (véase anteriormente)

110 ml MGDF (véase anteriormente)

3 ml de nevirapina (véase anteriormente)

100 ml de PA317/LNL6 o 100 ml de PA317/RRz2 (véase anteriormente).

5 Los componentes fueron mezclados agitando suavemente y esterilizados por filtración. La preparación de la mezcla de LNL6 fue completada antes de iniciar la mezcla de RRz2.

Para una segunda transducción en la noche, se usaron los 100 ml restantes de PA317/LNL6 y 100 ml de PA317/RRz2 de la misma manera para preparar mezclas de transducción de VCM. Esas fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta ser usadas.

10 1.15 Mezclas de transducción de VCM usadas con Retronectina (pacientes 8-10). Las mezclas de transducción de VCM para los pacientes #8-10 fueron preparadas y usadas de la misma manera, excepto que los volúmenes usados en la preparación fueron duplicados. Se efectuaron tres rondas de transducción durante 2 días, a saber en la noche del día 1, y en la mañana y tarde de día 2.

1.16 Amortiguador de Lavado de células CD34<sup>+</sup> (PBS con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, + HSA al 1%).

15 Se usó amortiguador de lavado de CD34<sup>+</sup> que contenía 1% (concentración final) de HSA para lavar las células antes de la infusión de las células CD34<sup>+</sup> transducidas. Se usó 1L de amortiguador de lavado por paciente y se preparó fresco o varios días de anticipación.

20 De una botella nueva de 1L de PBS, fueron extraídos 40 ml de PBS con una pipeta estéril de 25 ml, de modo que se mantenían aproximadamente 960 ml. Se transfirieron asépticamente 40 ml de solución de HSA al 20% (Solución de HSA al 25%, Albumarc25<sup>MR</sup>) a la botella de PBS usando una jeringa de 50 ml con una aguja calibre 18 unida, y se mezcló bien agitando, sin sacudir. El amortiguador de lavado fue almacenado a 4°C y calentado a 37°C antes de su uso. Un lote de 1L fue para la utilización exclusiva de un paciente y fue de un sola utilización únicamente, cualquier residuo fue desechado.

1.17 Amortiguador de Infusión de CD34<sup>+</sup> (RPMI, libre de rojo de fenol, +5% de seroalbúmina humana).

25 El amortiguador de infusión CD34<sup>+</sup> está concebido para mantener la viabilidad de células CD34<sup>+</sup> transducidas cosechadas hasta ser transfundidas. El RPMI estuvo libre de rojo de fenol cuando fue usado para la infusión directa en el paciente. Este contenía seroalbúmina humana a una concentración final del 5%.

Se usaron 100 ml para la suspensión de cada lote de células cosechadas después el lavado. Este amortiguador puede ser producido fresco el día de la cosecha/infusión o puede ser preparado con varios días de anticipación.

30 Usando una pipeta estéril de 25 ml, fueron transferidos 80 ml de RPMI libre de rojo de fenol (Libre de Rojo de Fenol, Gibco-BRL, Cat 118-030) a un tubo de centrifuga cónico de 250 ml. Se agregaron asépticamente 20 ml de solución de HSA al 25% (Albumarc25<sup>MR</sup>), American Red Cross, usando una jeringa de 25 cc con una aguja calibre 21 unida. La mezcla fue agitada suavemente. Si el reactivo fue preparado de manera anticipada, este fue almacenado a 4°C, pero si fue preparado fresco el día de la cosecha, fue almacenado a temperatura ambiente hasta su uso. La mezcla fue precalentada a 37°C antes de su uso. Un lote de 100 ml fue para la utilización exclusiva de un paciente y fue de una sola utilización únicamente.

35 1.18 Preparación de PBS para FACS (PBS, libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, + suero bovino Fetal al 2% + NaN<sub>3</sub> al 0.1%).

El PBS para FACS es un amortiguador de lavado que fue usado para lavar las células durante el procedimiento de tinción por FACS. Adicionalmente, si el análisis por FACS fue efectuado inmediatamente después de la tinción (es decir dentro de las siguientes 4-6 horas) este fue usado para resuspender las células teñidas.

40 Se preparó una solución patrón de Azida (al 10%) disolviendo 4 g de azida de sodio en un tubo de 50 ml en agua destilada. La solución de PBS FACS fue preparada agregando a 48.5 ml de PBS, en un tubo de 50 ml, 1 ml de suero bovino fetal y 0.5 ml de la solución de azida de sodio. Las soluciones fueron almacenadas a 4°C. La solución patrón de azida tiene una vida de anaquel ilimitada, el PBS para FACS tiene una vida de anaquel de 1 año. El PBS para FACS se usó frío.

45 1.19 Preparación de bloqueador de FACS (suero AB humano al 5% en PBS, libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>).

50 Este fue usado en la reacción de tinción de anticuerpo por FACS para reducir la tinción de fondo no específica de las células. Este contenía 5% de suero AB humano (Sigma cat #H-4522, almacenado a -20°C, descongelado a 37°C en un baño de agua) diluido en PBS estéril (libre de calcio y magnesio, 1x; Virus Core Lab o JRH Biosciences cat #59321-78P). Este fue filtrado de manera estéril a través de un filtro de 0.45 µm Acrodisc (Gelman #4184) y almacenado como alícuotas de 1 ml a -20°C.

1.20 Preparación de fijador de paraformaldehído para FACS (PBS, libre de Ca y Mg, paraformaldehído al 2%).

El paraformaldehído para FACS es una solución fijadora que preserva las células después de la tinción del anticuerpo para el análisis por FACS. Se usó a una concentración del 1% para resuspender células después de la tinción por FACS, la tinción del anticuerpo permanecerá estable hasta por lo menos 3 días. Después de este tiempo, la señal de fondo de los anticuerpos fluorescentes puede incrementarse. Esta contenía 10 ml de paraformaldehído al 10% (Polysciences #04018) mezclado con 40 ml de PBS y se almacenó a 4°C. Las células fueron suspendidas en 200  $\mu$ l de PBS y a continuación fijadas con 200  $\mu$ l de este amortiguador para crear una concentración de trabajo del 1%.

#### 1.21 Amortiguador de lisis de urea

El amortiguador de lisis de urea fue usado para preparar lisados celulares para la extracción con fenol del ADN. Este contenía 84 g de urea (Boehringer-Mannheim 1685 899), 4 g de SDS (USB 21651), 1 ml de EDTA a 0.2 M, 1 ml de base de Tris 1M, 1 ml de Tris HCl 1M, 14 ml de NaCl 5M en un volumen final de 200 ml en agua. Esta solución fue filtrada a través de un filtro de 0.45  $\mu$  y almacenada a temperatura ambiente.

#### EJEMPLO 2: Ensayo clínico en fase I

Se realizó un estudio clínico de terapia génica de fase I para investigar si i) la introducción de una ribozima anti-VIH-1 en células hematopoyéticas progenitoras circulantes podría dar como resultado la emergencia de emigrantes tímicos que tuvieran secuencias de vector, ii) la maduración de linfocitos T normales podrá tomar lugar en células modificadas genéticamente, iii) la presencia y expresión del vector podría persistir a largo plazo y iv) la ribozima podría conferir una ventaja de supervivencia a las células vulnerables al VIH-1 (Amado et al. 1999).

Para la transducción de células con un gen de ribozima, se usó RRz2. El RRz2 codifica para la ribozima cabeza de martillo Rz2, que está dirigida contra una región altamente conservada del gen tat del gen del VIH-1. La secuencia de ADN que codifica para Rz2 fue subclonada en un Sitio Sal-I dentro de la región no traducida del gen de la neomicina fosfotransferasa (*neo<sup>R</sup>*) en pLNL6 (Bender et al 1987) para producir el RRz2. La ribozima es expresada como un transcrito de neo-ribozima de LTR de MoMLV en RRz2. Para controlar los efectos específicos de la ribozima potenciales sobre el injerto de células progenitoras y el desarrollo del linfocito T, y para estudiar los efectos potenciales sobre la supervivencia de los linfocitos T conferida por Rz2, las células progenitoras también fueron transducidas con el vector retroviral de control LNL6.

En este estudio, los pacientes infectados con VIH-1 con menos viremia de 10,000 copias/ml y conteos de CD4 de entre 300 y 700 células/mm<sup>3</sup> fueron sometidos a movilización de células progenitoras sanguíneas periféricas (PBPC) con la citocina factor estimulante de la colonia de los granulocitos (G-CSF) durante 6 días. Los pacientes recibieron factor estimulante de la colonia de los granulocitos (G-CSF) subcutáneamente a una dosis de 10  $\mu$ g/kg diariamente durante 6 días. La obtención de PBPC se llevó a cabo proporcionando un volumen de sangre de aféresis los días 5 y 6 del tratamiento con G-CSF usando el sistema de Aféresis COBE<sup>®</sup> Spectra<sup>MR</sup> (Gambro BCT, Lakewood, CO). La selección de las células CD34<sup>+</sup> se efectuó usando el Sistema de Concentración de Células troncales CEPRATE<sup>®</sup> SC (CellPro Inc. Bothell, WA) (pacientes 1 a 7) y sistemas de selección de células Isolex 300i (Nexell Therapeutics, Irvine, CA) (pacientes 8 a 10). Después de la purificación de PBPC para la expresión del marcador superficial CD34, las células fueron cultivadas durante únicamente un día en medio de cultivo de CD34 para la inducción al ciclo usando la combinación de citocinas de factor del crecimiento y desarrollo megacariocítico (MGDF) y factor de células troncales (SCF) (Amado et al 1998). El MGDF y el SCF fueron proporcionados por Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA) y usados a una concentración de 100 ng/ml y 50 ng/ml, respectivamente.

Aproximadamente, fueron transducidos números iguales de células CD34<sup>+</sup> independientemente con los vectores de RRz2 y LNL6. Las líneas celulares productoras de LNL6 y RRz2 fueron preparadas en un proceso de dos etapas transfecando los constructores de ADNc, pLNL6 o pRRz2, en la línea celular empaquetadora psi2 para producir dos poblaciones de virus ecotrópico incompetente para la reproducción. Esas dos poblaciones fueron usadas entonces para infectar la línea de células empaquetadoras anfotrópicas PA317 (Miller y Buttimore 1986). Las líneas celulares productoras clonales derivadas siguiendo la selección en G418, fueron verificadas por la integridad de los constructos y enviadas a BioReliance Corporation (Rockville, MD) para la preparación de un banco de células maestras y la preparación posterior de virus GMP con prueba de seguridad. Todos los lotes de sobrenadante retroviral (LNL6 y RRz2) fueron probados por su esterilidad, retrovirus competente para la reproducción y seguridad general por BioReliance Corporation. Los títulos virales fueron confirmados infectando la línea celular NIH 3T3 usando diluciones en serie y calificando la resistencia a G418. Los títulos de LNL6 y RRz2 fueron de  $1.4 \times 10^7$  y  $0.8 \times 10^7$  partículas virales infecciosas/ml respectivamente. El sobrenadante retroviral (Mezcla de Transducción de VCM) fue agregado una vez al día durante dos días a los pacientes 1 a 3, dos veces al día para los pacientes 4-7, y 3 veces durante 2 días para los pacientes 8 a 10. Para los pacientes 4 a 10, las transducciones fueron efectuadas en un matraz recubierto con el fragmento CH296 de fibronectina humana (RetroNectin<sup>MR</sup>, Takara Shuzo, obtenida de BioWhittaker, Inc. Walkersville, MD). Para inhibir la reproducción de VIH potencial *in vitro*, se llevaron a cabo cultivos y transducciones de células CD34<sup>+</sup> en presencia de Nevirapine a una concentración de 500 nM (Boehringer Ingelheim, Ridgefield, CT). La ausencia de la reproducción de VIH fue verificada midiendo el antígeno p24 por ELISA en el infundido final (las 10 muestras tuvieron niveles de p24 indetectables). Los cultivos fungales, bacterianos y de micoplasma, así como los ensayos de detección de endotoxina fueron negativos en el producto celular final para los 10 pacientes.

Después de la transducción, las células fueron reunidas, probadas para determinar su esterilidad, el conteo de

células, viabilidad, fenotipo CD34/CD38, p24, y endotoxina, y a continuación lavadas e infundidas con pacientes receptores autólogos sin mielosupresión. Este esquema de tratamiento es ilustrado en la Figura 5. Las muestras fueron mantenidas a un lado para su prueba final en ensayos de CFC, análisis por RCR y análisis por PCR para la eficiencia de la transducción.

5 Participaron diez pacientes en este estudio (Tabla 1). La edad media fue de 42 años (intervalo de 32 a 59). El número medio de regímenes antirretrovirales usados fue de 3 (intervalo de 1 a 6). El número total de células CD34<sup>+</sup> infundidas estuvo comprendido entre 1.3 y 10.1 X 10<sup>6</sup> células por kilogramo de peso corporal (kg) (media 3.2 +/- 1.1 X 10<sup>6</sup> células/kg). La eficiencia de la transducción para los primeros tres pacientes, llevada a cabo en presencia de sulfato de protamina, fue baja (intervalo de <1% a 4%), contabilizando un número de células CD34<sup>+</sup> transducidas infundidas que fluctúan de 0.01 a 0.08 X 10<sup>6</sup> células/kg (Tabla 1). Las células que contenían el transgen fueron detectadas hasta 6 meses en el paciente 1 (ribozima en médula ósea y células mononucleares de sangre periférica (PBMC), LNL6 en granulocitos), hasta 9 meses en el paciente 2 (RRz2 en PBMC) y 12 meses en el paciente 3 (LNL6 en PBMC y RRz2 en monocitos).

15 **Tabla 1. Características de los pacientes y del producto de infusión de células CD34<sup>+</sup>.** La Tabla representa la edad del paciente, el género, número de regímenes antirretrovirales anteriores (ART), la utilización de retronectina para soportar la transducción, la pureza de CD34<sup>+</sup>, el número de células CD34<sup>+</sup> infundidas, porcentaje de transducción, y el número de células CD34<sup>+</sup> transducidas infundidas.

TABLA 1

| Paciente | Edad | Género | ART | Retro-nectina | Pureza de CD34 <sup>+</sup> (%) | Células CD34 <sup>+</sup> infundidas (X10 <sup>6</sup> /kg) | Trans-ducción (%) | Células CD34 <sup>+</sup> transducidas (X10 <sup>6</sup> /kg) |
|----------|------|--------|-----|---------------|---------------------------------|---|-------------------|---|
| 01       | 59   | M      | 1   | No            | 65                              | 3.38  | 0.4               | 0.01  |
| 02       | 44   | M      | 4   | No            | 80                              | 2.08  | 4                 | 0.08  |
| 03       | 40   | M      | 4   | No            | 66                              | 2.98  | 2                 | 0.06  |
| 04       | 44   | M      | 6   | Si            | 67                              | 1.29  | 10                | 0.13  |
| 05       | 37   | M      | 6   | Si            | 94                              | 10.01   | 7                 | 0.70  |
| 06       | 32   | M      | 3   | Si            | 90                              | 1.63  | 32                | 0.52  |
| 07       | 41   | M      | 3   | Si            | 96                              | 8.45  | 48                | 4.06  |
| 08       | 46   | M      | 2   | Si            | 98                              | 9.37  | 57                | 5.34  |
| 09       | 48   | M      | 3   | Si            | 93                              | 1.64  | 36                | 0.59  |
| 10       | 38   | F      | 1   | Si            | 95                              | 5.07  | 28                | 1.42  |

20 Para mejorar la eficiencia de la transducción, se transdujeron células CD34<sup>+</sup> autólogas recibidas de 7 pacientes subsecuentes en presencia del fragmento CH296 de fibronectina humana (Hanenberg et 1997; Hanenberg et al 1996). En esos pacientes, la eficiencia de la transducción se incrementó a un nivel medio de 32% +/- 6.9 (intervalo del 7% al 57%) (Figura 6). El cálculo de las eficiencias de la transducción se llevó a cabo efectuando PCR competitivas en células CD34<sup>+</sup> transducidas (Knop et al 1999). Las eficiencias también fueron determinadas efectuando PCR para secuencias de vector en colonias únicas que crecieron a partir del producto de células CD34<sup>+</sup> transducidas final.

25 En promedio, la eficiencia de la transducción para el LNL6 fue 1.6 veces mayor que la obtenida con RRz2, probablemente reflejando diferencias en los títulos de vector. Después de un seguimiento medio de hasta 30 meses (intervalo de 12 a 36 meses), fueron detectados transgenes en todos los pacientes en puntos en el tiempo múltiples y en linajes hematopoyéticos múltiples. En promedio, se descubrió la presencia del gen en 0.1 a 0.01% de PBMC analizadas.

30 La Figura 7 representa la presencia del gen multilínea a largo plazo en un paciente representativo. La Figura 7a representa secuencias de vector de LNL6 y RRz2 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células mononucleares de médula ósea (PBMC), linfocitos T y monocitos en el paciente 5 dos años después de la infusión de células CD34<sup>+</sup> transducidas. Los linfocitos T y los monocitos fueron seleccionados de PBMC a una pureza de > 90%, de acuerdo a lo confirmado por citometría de flujo. Para cada tipo de célula, se muestran cuatro reproducciones de un conjunto de muestras.

35

También se analizó la expresión de los constructos genéticos en PBMC usando RT-PCR. Se preparó el ARN de PBMC seleccionadas por centrifugación por Ficoll-Hypaque de muestras de sangre, usando el equipo RNeasy de Qiagen (Valencia, California), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN residual fue eliminado por digestión con ADNasa. El ARN fue transcrito de manera inversa usando transcriptasa inversa Superscript de Gibco (Carlsbad, California) con 7 reproducciones de cada muestra. Las muestras fueron entonces reunidas, y se efectuó la amplificación del ADNc en 10 reproducciones. La PCR inicial en caliente de la ronda 1 se efectuó usando perlas Promega Taq (Madison, WI). La ronda 2 se efectuó usando Perkin Elmer Ampliwax gem (Boston, MA). La Figura 7b representa la expresión del vector a corto y largo plazo de ambos del LNL6 y el RRz2 en PBMC hasta 2 años después de la infusión en 3 pacientes representativos usando un cebador marcado radioactivamente. Por cada muestra, se incluyó una reacción que no contenía transcriptasa inversa (-RT).

Para determinar si las células CD34<sup>+</sup> transducidas podrían experimentar desarrollo del linfocito T en pacientes infectados por VIH se seleccionaron células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de sangre periférica por la expresión del marcador superficial CD45RA y CD62L, que caracteriza a los linfocitos T indiferenciados (Sanders et al 1988; Tedder et 1985; Kansas 1996; Picker et al 1993), y se analizaron esas subpoblaciones de linfocitos T por la presencia de LNL6 y RRz2.

Se efectuó un análisis por PCR semicuantitativo en subconjuntos de leucocitos usando cebadores dirigidos contra el gen neo<sup>R</sup> que se superpone a la secuencia de Rz2 en el vector RRz2. Para la detección por PCR, el ADN fue extraído de las poblaciones celulares usando el procedimiento de extracción de Polímero Acast (Ward et al 1998). Se construyó un control de la relación de ADN diluyendo ADN de células CEM T4 transducidas con LNL6 y RRz2 a una relación de 1:5 (donde LNL6 =1) en un fondo de ADN de PBL (negativo) a una concentración de células marcadas de 0.005%. Entonces se efectuó una PCR anidada (inicio en caliente) en 50 µl de mezcla de reacción de PCR. Los cebadores usados fueron 5L1A: CAC TCA TGA GAT GCC TGC AAG; 3L2A: GAG TTC TAC CGG CAG TGC AAA; 5Nes1: GAT CCC CTC GCG AGT TGG TTC A (Ronda #1 de los Cebadores: 5Nes1 y 3L2A; Ronda #2: 3L2A y marcado: 5L1A). Se incluyeron diez reproducciones por muestra de PCR de la ronda 1 de 17 ciclos de recocido a 68°C y desnaturalización a 94°C. Las reproducciones de las muestras fueron entonces reunidas y usadas como patrón para la PCR de la ronda 2 de 35 ciclos con una temperatura de recocido de 68°C y una temperatura de desnaturalización a 94°C. Las muestras de productos cuádruples fueron resueltas sobre un gel de partes desnaturalizante al 5%, y cuantificadas usando los programas y sistemas de programación Molecular Dynamics Imagequant. Los productos de la PCR para el LNL6 y RRz2 fueron de 174 y 216 pares de bases, respectivamente, e incluyen una extensión del término no traducido del gen neo<sup>R</sup>. Los resultados fueron incluidos si la relación control se encontraba dentro de los límites aceptados (para una relación de 1:3.5 de LNL6:RRz2 en una muestra que contenía vector del 0.005%, el intervalo aceptado fue de 1:1.1 a 1:6.9).

La Figura 7c representa la detección de secuencias de vector en linfocitos T indiferenciados. El gel representa análisis por PCR para las secuencias de vector de LNL6 y RRz2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y en subconjuntos de linfocitos T indiferenciados seleccionados de sangre periférica en dos años del paciente 7 después de la infusión de células CD34<sup>+</sup> transducidas. Las poblaciones de linfocitos T indiferenciados fueron seleccionadas a una pureza de >90% de poblaciones seleccionadas CD4 y CD8. Los linfocitos T y los monocitos son seleccionados de PBMC usando microperlas MACS CD3 y CD14 (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA). Linfocitos T indiferenciados fueron seleccionados tiñendo con anticuerpo anti-CD45RA IgG<sub>1</sub> monoclonal conjugado con FITC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) seguido por selección usando un equipo Multisort anti-FITC (Miltenyi Biotec Inc., Auburn CA). Posteriormente, se efectuó la selección de CD62L usando un anticuerpo anti-CD62L IgG<sub>2a</sub> murino (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), seguida por la selección con microperlas IgG<sub>a+b</sub> anti-ratón de rata (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA).

La figura 7(D) representa secuencias de vector detectadas en subconjuntos de células T indiferenciadas en el paciente 5 a los 2.5 años.

La figura 7(E) representa secuencias de vector detectadas en subconjuntos de células T indiferenciadas en el paciente 7 a los 2 años.

La figura 7(F) representa secuencias de vector detectadas en subconjuntos de células T indiferenciadas en el paciente 8 a las 4 semanas después de la infusión.

La figura 8 representa un resumen de la detección de transgenes ribozima y vector de control por PCR semicuantitativa en células mononucleares de médula ósea (BMMC), PBMC, granulocitos, linfocitos T y monocitos en los 10 pacientes hasta 3 años después de la infusión.

En los 10 pacientes, los ensayos biológicos para retrovirus competentes para una reproducción (RCR) al final de la transducción usando sobrenadante viral y células enriquecidas con CD34<sup>+</sup> cultivadas fueron negativos. La prueba de RCR del infundido de células final fue efectuada al 5% del sobrenadante del cultivo al final de la transducción así como el 1% de las células CD34<sup>+</sup> transducidas por cocultivo, usando una etapa de amplificación de 2 pases en la línea células *Mus dunni*. Los sobrenadantes del cultivo de células *Mus dunni* resultantes fueron probados entonces por retrovirus infecciosos usando el ensayo enfocado con PG4 S+L-. Las muestras de PBMC del paciente analizadas por PCR para RCR 6 meses y 1 año después de la infusión de células CD34<sup>+</sup> no reveló evidencias de RCR. Para la detección de RCR en las células del paciente, se analizó el ADN extraído de PBMC 6 meses y 1 año después de la infusión de células CD34<sup>+</sup> transducidas para determinar la presencia de secuencias de envoltura anfotrópica usando los

5 siguientes cebadores: 5'-CTA TGT GAT CTG GTC GGA GA-3' y 5'-CCA CAG GCA ACT TTA GAG CA-3'. El ensayo permite la detección de retrovirus competentes para la reproducción amplificando una reacción altamente conservada que codifica parte de la región determinante del hospedador del gen de la envoltura, que se requiere para la infección de células a través del receptor anfotrópico. La región amplificada es de una longitud de 289 pares de bases. La sensibilidad del ensayo es una célula positiva en un fondo de  $10^5$  células negativas. Como un control positivo, se efectuó la línea celular empaquetadora PA317 en cada ensayo. Los productos de la PCR fueron resueltos sobre un gel NuSieve al 2.5%).

10 Para ambos vectores, se descubrió una fuerte correlación lineal entre el número de células CD34<sup>+</sup> transducidas infundidas y la persistencia de la detección del gen a 2 años después de la infusión en PBMC (LNL6 p=0.021; RRz2 p=0.034) y linfocitos T (p<0.0001 para LNL6 y RRz2). Se usó la correlación del rango de Spearman para cuantificar la relación entre el número de células transducidas reintroducidas y el marcado posterior de PBMC y linfocitos T de la progenie. Los análisis se basaron en valores dados en células/kg por cada paciente. En esos análisis, el marcado de LNL6 correlacionó con la cantidad de células transducidas por LNL6 reintroducidas, y el marcado con RRz2 correlacionó con la cantidad de células transducidas con RRz2 reintroducidas. El número mínimo de células CD34<sup>+</sup> transducidas que dio como resultado un marcado superior a 1 año fue de  $0.5 \times 10^6$  células/kg.

15 Se detectaron secuencias de vector en células indiferenciadas hasta 2.5 años después de la infusión (el último punto temporal evaluado). Por ejemplo, la figura 7c representa la presencia de secuencias de vector en células indiferenciadas altamente enriquecidas en un paciente representativo.

20 Las secuencias de vector fueron detectadas en células indiferenciadas hasta 3 años después de la infusión (el último punto en el tiempo evaluado). Las Figura 7D-F muestran secuencias de vector en células indiferenciadas y con memoria altamente enriquecidas de 4 a 130 semanas después de la infusión en tres pacientes. La edad promedio y carga viral de los pacientes cuyos linfocitos T indiferenciados tuvieron secuencias de vector detectables fue de 41 años (intervalo de 32 a 48 años) y 3,680 copias/ml (intervalo: indetectable a 22,628 copias/ml) respectivamente. Un resumen de la detección del vector en linfocitos T indiferenciados y la carga viral en el momento de la detección se representa en la Tabla 2. También se analizaron aspirados con agujas finas de nodos linfáticos de 4 pacientes para la presencia de secuencias de vector. Fueron detectados ambos del LNL6 y RRz2 en 2 de los 4 pacientes (paciente 7 a los 2.5 años después de la infusión y paciente 10, 1 año después de la infusión).

**Tabla 2- Resumen de detección del vector de células T indiferenciadas.**

30 Se seleccionaron poblaciones de linfocitos T indiferenciados circulantes a una pureza de >85% de poblaciones seleccionadas CD4 y CD8. Las células fueron analizadas por PCR. La carga viral en el punto en el tiempo del análisis del vector se representa bajo cada símbolo, ND: no determinada. Dos valores indican que están disponibles dos determinaciones para un intervalo de tiempo. NT: no probada; (+): LNL6, RRz2 o ambos vectores detectados en linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (indiferenciados); (-): Ningún vector detectado en células T indiferenciadas CD4 ó CD8.

35

| NUMERO DE PACIENTE | <3 MESES   | DE 3 A 6 MESES | 6-12 MESES  | 12-24 MESES | >24 MESES        |
|--------------------|------------|----------------|-------------|-------------|------------------|
| 1                  | NT         | NT             | +<br>660    | NT          | NT               |
| 2                  | NT         | NT             | +<br>12,893 | NT<br>--    | NT               |
| 3                  | NT         | NT             | -<br>782    | -<br>ND     | NT               |
| 4                  | +<br>590   | NT             | +<br>22,628 | NT          | NT               |
| 5                  | NT         | NT             | +<br>3,183  | +<br>3,899  | ++<br>130/15,800 |
| 6                  | NT         | ++<br>368/606  | -<br>2,905  | -           | NT               |
| 7                  | +<br>4,509 | NT             | +<br>ND     | +<br>12,496 | +<br>ND          |
| 8                  | +<br>ND    | NT             | NT          | NT          | NT               |
| 9                  | +<br>ND    | NT             | +<br>ND     | +<br>ND     | NT               |
| 10                 | NT         | +<br>925       | +<br>1,384  | +<br>4,562  | NT               |

5 Para determinar si la presencia de ribozima anti-VIH-1 en células CD4<sup>+</sup> confirió protección contra la infección por VIH, se midieron los números de copias de vectores de LNL6 y RRz2 por PCR en diferentes tipos de células con el tiempo. Se implementaron comparaciones intraconstructo de la velocidad de declinación del marcado como regresión lineal de efecto mezclado (Miller, 1986). La intensidad del marcado se sometió a regresión en (a) (log) del tiempo desde la infusión, (b) un indicador del tipo de célula, y (c) un término de interacción tiempo x tipo de célula (producto multiplicativo). Podrían ser efectuados análisis de modelos lineales mezclados para esos datos debido a que la estimación de los algoritmos convergió consistentemente (ajuste de modelos en SAS PROC MEZCLADOS). La correlación intrasujeto de las intensidades de marcado fue modelada usando una estructura de bloqueo de "mediciones repetidas" para los datos. A través de esos análisis, se ajustaron los modelos usando una matriz de varianza-covarianza no estructurada para residuos, o asumiendo una matriz simétrica compuesta. Surgieron cálculos aproximados de parámetros sustancialmente idénticos y pruebas relevantes de cada tipo de análisis.

10 Un nivel más sostenido de marcado con RRz2 en tipos de células vulnerables al VIH que en tipos de células no sometidas a agotamiento inducido por VIH es consistente con la protección inducida por Rz2 que proporciona una ventaja de supervivencia selectiva para células transducidas con RRz2.

20 Como se representa en la Figura 9a, el marcado con RRz2 declinó a aproximadamente un octavo de la tasa en linfocitos T de sangre periférica que en BMMC (-0.081 células por log-semana para los linfocitos T contra -0.643 células para BMMC por log-semana, diferencia p=0.0095). A diferencia de la tasa o velocidad de declinación de BMMC que contiene RRz2, la tasa o velocidad de declinación de linfocitos T que contenían RRz2 no fue significativamente diferente de cero, y la diferencia entre ambas tasas o velocidades fue significativa (p<0.0001 para BMMC, p=0.55 para linfocitos T, p=0.009 para la prueba estadística que compara las tasas de declinación de células que contienen RRz2 entre ambos

tipos de células). Para excluir la posibilidad de que esos resultados se deban a diferencias en la tasa de declinación intrínsecas entre los tipos de células, el marcado de LNL6 se representa en la Figura 9b. Este análisis mostró una tasa de declinación de copias de LNL6 de -0.716 para los linfocitos T y -0.725 para BMMC. Ambas curvas fueron significativamente diferentes de una curva de tasa o velocidad de declinación de cero (valores de  $p$  0.0019 y 0.004 para linfocitos T y médula ósea respectivamente). El valor de  $p$  para la prueba estadística que compara las tasas o velocidades de declinación de RRz2 entre ambos tipos de células fue de 0.97 reflejando cinéticas de declinación casi idénticas para el vector de LNL6. Esas comparaciones fueron implementadas como modelos de regresión de efecto mezclado (Miller 1986). Concordando con la ausencia de actividad protectora con VIH conferido por LNL6, no se observó declinación diferencial para el marcado con LNL6 entre esos dos tipos de células ( $p=0.9781$ ), (Figura 9b). Esos resultados muestran que las diferencias estadísticamente significativas a las velocidades o tasas de declinación del marcado los dos vectores fueron observados a favor de RRz2 en PBMC y linfocitos T, pero se observaron tasas o velocidades de declinación iguales entre los vectores en el caso de BMMC y granulocitos. Además, los linfocitos T indiferenciados que contienen RRz2 se incrementaron con el tiempo, mientras que los que contienen LNL6 declinaron (+ 0.145 contra -0.240 por log semana para RRz2 y LNL6 respectivamente, diferencia  $p=0.033$ ). Esos resultados indican que RRz2 confiere una ventaja de supervivencia selectiva a células vulnerables al VIH, incluyendo los emigrantes tímicos recientes, en pacientes con infección por VIH-1.

A continuación, se intentó determinar si la magnitud de la declinación diferencial entre linfocitos T que contienen LNL6 y RRz2 fue correlacionada con el número de células CD34<sup>+</sup> transducidas con RRz2 que cada paciente recibió. Hasta este punto, la diferencia entre las pendientes de declinación entre ambos vectores para cada paciente se correlacionó con el número de células CD34<sup>+</sup> transducidas con RRz2 que fueron infundidas. Las pendientes de declinación específicas del paciente para el marcado LNL6 y RRz2 fueron calculadas por regresión lineal, y la diferencia en las pendientes (RRz2-LNL6) fue tomada como un indicador de la protección mediada por RRz2. Se usó la correlación del rango de Spearman para examinar las relaciones entre las velocidades de declinación diferencial y los números de células CD34<sup>+</sup> transducidas e infundidas).

Las gráficas que describen esta relación para las pendientes de declinación de linfocitos T y PBMC se muestran en las Figuras 9c y d respectivamente. Esos análisis demuestran una fuerte relación lineal entre el número de células CD34<sup>+</sup> transducidas que fueron infundidas en la magnitud de la declinación diferencial de LNL6 contra RRz2 en PBMC y linfocitos T. Cuando los números de células CD34<sup>+</sup> transducidas por RRz2 reinfundidas son tomados como una variable continua que predice la declinación diferencial del marcado con el tiempo en un análisis de regresión, los resultados son estadísticamente significativos con  $p < 0,0001$  (estadísticas con el coeficiente de regresión  $t$  para el término de interacción en una regresión de marcado diferencial (RRz2-LNL6) sobre (log) tiempo, número de células infundidas, y su interacción del término del producto). Esos datos indican que existe un efecto dependiente de la dosis inesperado sobre la supervivencia diferencial entre células vulnerables al VIH-1 protegidas y no protegidas, y que el beneficio clínico usando las estrategias de terapia génica de células hematopoyéticas progenitoras dependerá de la dosis de progenitoras transducidas administradas a los pacientes.

Todos los pacientes en este estudio han estado recibiendo terapia antirretroviral y hasta la fecha, ninguno de los pacientes ha desarrollado infecciones oportunistas. La cinética del conteo de células CD4<sup>+</sup> y la carga viral se ilustran en la Figura 10. Se observó un incremento inicial en la carga viral al día 1 después de la infusión en algunos pacientes quienes discontinuaron la terapia antirretroviral durante el periodo de movilización. La continuación o sustitución de fármacos de inhibidores de la transcriptasa inversa nucleotídicos para el inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleotídico o inhibidor de proteasa fue incluida en el protocolo para evitar la inhibición potencial de la transcriptasa inversa de MMLV durante la transducción (H. Bazin, et al., 1989). Los aumentos ocasionales en la viremia respondieron a modificaciones de la terapia antirretroviral.

El cambio promedio en el conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de entrada al año 3 fue un incremento de 10 células por mm<sup>3</sup> (intervalo de -40 a +80). La carga viral disminuyó en un promedio de 2.25 logs en 6 pacientes (intervalos de 0.35 a 3.9), permaneció indetectable en 3 pacientes, y se incrementó 1 log en un paciente. Esos cambios no correlacionan con el grado o persistencia de detección del vector o expresión del vector en ningún tipo de célula, y se piensa que resultan influidos por la susceptibilidad viral individual a la terapia antirretroviral.

La genotipificación viral demostró mutaciones de resistencia a fármacos múltiples en todos los pacientes (datos no representados). También se realizaron análisis genotípicos de la región de unión/escisión Rz2 del VIH en todos los pacientes al entrar al estudio y a las 12, 24, 52 y 104 semanas. Después del tratamiento con ribozima se efectuó el análisis del sitio de escisión como se describió anteriormente (Wang et al. 1998) con modificaciones menores. Brevemente, se extrajo el ARN viral y se transcribió de manera inversa con un equipo de RT-PCR Access (Promega, Madison, WI) usando el cebador 1 (TGGCAATGAAAGCAACT) durante 45 minutos a 48°C. El ADNc resultante fue amplificado por PCR mediante la adición del Cebador 2 (TTTAGAGGAGCTTAAGAATGA) durante 25 ciclos (94°C durante 20 seg., 55°C durante 30 seg, y 68°C durante 30 seg). Se produjo ADN de una sola hebra para el secuenciamiento del ciclo por medio de un segunda etapa de PCR usando AmpliTaq (Perkin-Elmer) y Cebador 3 (AGTTTTAGGCTGACTTCCTGG) durante 25 ciclos a 94°C durante 20 seg, 55°C durante 30 seg, y 68°C durante 30 seg. El secuenciamiento se efectuó sobre productos de PCR purificados con el equipo de reacción preparado para secuenciamiento del ciclo de terminación con tinte ABI PRISM con ADN polimerasa AmpliTaq (Perkin-Elmer) en un secuenciador de ADN automatizado (ABI Model 377, Applied Biosystems, Foster City, CA) usando Cebador 4 (TGGAAGCCATAATAAGAAT). La alineación de las secuencias se efectuó con los programas y sistemas de

programación Sequence Navigator (Perkin-Elmer) y se leyó y editó manualmente. La secuencia resultante fue comparada con la cepa de referencia de VIH- HXB2 de clado B.

Seis de los 10 pacientes presentaron cargas virales que permitieron la determinación de la secuencia. Los pacientes 1, 2, 5 y 6 presentaron secuencias naturales. El paciente 4 presentó una transición de A a C en la posición -1 del triplete diana GUA. El paciente 7 presentó una transición de G a T en la posición -4 del triplete diana GUA. Las evidencias indican que esos ARN mutantes son eliminables por la ribozima. Las mutaciones detectadas en ambos de esos pacientes estuvieron presentes antes del tratamiento; en consecuencia no se usaron como resultado de resistencia inducida por la eficacia al constructo.

Los estudios descritos se realizaron en ausencia de mielosupresión, por lo tanto las células CD34<sup>+</sup> modificadas contribuyeron a formar un sistema hematopoyético quimérico. Las células CD34<sup>+</sup> transducidas deben competir con células troncales endógenas por la reconstitución hematopoyética. En realidad estos resultados indican una correlación entre las dosis de células y la duración del injerto con células transducidas. Debido a que no se esperaba una ventaja de supervivencia al nivel de las células CD34<sup>+</sup> transducidas, y dada la correlación establecida de supervivencia a los números de células CD34<sup>+</sup> más infundidas, estudios futuros tendrán como propósito incrementar el número de células modificadas genéticamente administradas. Recientemente, se informó de que la corrección genética de la deficiencia del receptor de la citocina  $\gamma c$  que caracteriza a la enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa humana (SCID)-X1 conduce al desarrollo de un sistema inmune funcional (Cavazzana-Calvo et al. 2000). Con respecto a la aplicación de estrategias de corrección genética, el modelo de infección con VIH es diferente del modelo de SCID-X1. A diferencia del escenario del VIH/SIDA, en el que ambas células CD34 transducidas y no transducidas pueden contribuir a la timopoyésis, en el caso de la SCID-X1, donde el receptor funcional resultante media las señales de supervivencia, la timopoyésis resulta únicamente de células CD34<sup>+</sup> que contienen el gen exógeno. De este modo, en la infección por VIH, presumiblemente tendría lugar la ventaja de supervivencia al nivel de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que da como resultado una expansión de esas células que contienen ribozima en presencia de reproducción de VIH. En este caso el virus proporciona a la presión de supervivencia selectiva, puesto que las células no protegidas seguirían siendo vulnerables. Esta hipótesis no fue probada en el presente estudio, puesto que los pacientes habían permanecido en terapia antirretroviral. Es posible que pueda producirse un mayor grado de supervivencia preferida en presencia de reproducción viral no controlada.

Estos estudios han demostrado que los constructos pueden ser introducidos retroviralmente en células hematopoyéticas progenitoras CD34<sup>+</sup>, y que esas células contribuirán a la hematopoyesis multilínea a largo plazo en pacientes infectados por VIH. El presente estudio representa el segundo informe de un ensayo de terapia génica con células troncales en la infección por VIH. Un ensayo previo utilizando un vector retroviral que contiene un gen señuelo de elemento que responde a rev en pacientes pediátricos dio como resultado la detección del gen anti-VIH en 2 de 4 pacientes únicamente en una ocasión al día 1 después de la infusión celular. El vector control fue detectado a bajos niveles en los 4 pacientes a los 30 días, en 3 pacientes a 90 días y en 1 paciente a los 250 y 330 días después de la infusión (Kohn et al. 1999). Esos resultados contrastan con los resultados de reconstitución a largo plazo. Sobre la base de los resultados en el contexto de la presente invención, el marcado a corto plazo observada en el informe anterior parece deberse por lo menos en parte a las bajas dosis de células CD34 transducidas administradas. Mientras que estudios de terapia génica para VIH anteriores usando linfocitos T transducidos han mostrado una persistencia más prolongada de un vector terapéutico en comparación con un vector control hasta un año después de la infusión (Ranga et al. 1998), el presente es el primer informe que indica que el desarrollo de los linfocitos T sobrevive a largo plazo a partir de progenitores hematopoyéticos modificados genéticamente en el contexto de la infección por VIH, y que representa evidencias de protección celular de linfocitos T indiferenciados y con memoria contra el agotamiento inducido por VIH. El descubrimiento de que la producción sostenida de linfocitos T indiferenciados que contienen transgen ocurre aún en pacientes con viremia detectable es significativo, dado que es conocido que los timocitos indiferenciados son infectados por VIH (Ostrowski et al. 1999), y que el timo puede actuar como una fuente de latencia de VIH-1 durante la diferenciación de los linfocitos T (Brooks et al. 2001). A medida que continúe la timopoyésis en el paciente adulto, el reemplazo de este conjunto latente basado en linfocitos T indiferenciados con células que son modificadas para inhibir efectivamente la reproducción viral dará como resultado el restablecimiento de células inmunes protegidas y la inhibición del rebote viral después de la retirada de la terapia antirretroviral, o después del desarrollo de resistencia al fármaco. La presencia de secuencias de ribozima en otros reservorios virales como los monocitos también podría contribuir a controlar la reproducción del virus en esos escenarios. Esos resultados justifican aún más la exploración de la transferencia de genes de células troncales anti-VIH como una forma de terapia anti-VIH.

### **Ejemplo 3: procedimientos específicos usados**

#### **3.1 Ensayo de micoplasma**

Después del cultivo y transducción, los cultivos celulares cosechados fueron sometidos a prueba para la determinación de micoplasma. El procedimiento usado se basó en la amplificación de una secuencia de ADN específica de micoplasma por PCR y la detección posterior del amplicón por ELISA. El procedimiento usó el equipo de prueba de ELISA por PCR para Micoplasma (Boehringer Mannheim, Cat#1 663 925). Las muestras de prueba (1 muestra por donador) y una muestra control negativo (alícuota de 1 ml de medio de cultivo RPMI fresco que contenía 5% de seroalbúmina humana) fueron centrifugadas en tubos de microcentrífuga a una velocidad máxima durante 10 minutos a 4°C para sedimentar cualquier micoplasma. Para solubilizar el sedimento, se agregaron 10  $\mu$ l de agua estéril y 10  $\mu$ l de

reactivo de Lisis (solución 1 del equipo). Se llevó a cabo un tratamiento adicional de acuerdo a las instrucciones del equipo. Se evitó la contaminación cruzada de las muestras y reactivos en el procedimiento de PCR usando puntas para aerosol nuevas para todas las etapas de pipeteo. Cada experimento incluyó dos controles negativos y un control de ensayo positivo. La amplificación por PCR usó un ciclo de 5 min a 95°C, 39 ciclos de 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 62°C; 1 minuto a 72°C, finalizando con 10 minutos a 72°C. Después de la etapa de ELISA de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes, los controles negativos fueron aceptados si eran inferiores a 0.25 unidades de  $A_{450}$ - $A_{690}$ , repitiéndose en caso contrario el ensayo. Los controles de ensayo positivos fueron aceptados si eran superiores a 1.2 unidades de  $A_{450}$ - $A_{690}$ , si eran menores fueron repetidos. Las muestras fueron consideradas como positivas para contaminación por micoplasma si la absorbancia era de más de 0.2 unidades de  $A_{450}$ - $A_{690}$  mayores que los controles negativos.

### 3.2 Ensayo de endotoxina

La presencia de endotoxina fue determinada en los cultivos celulares después del cultivo y la transducción por dos razones: la presencia de un bajo nivel de endotoxina en los cultivos sería una indicación de una contaminación previa posible por microorganismos Gram negativos, y en segundo lugar, los altos niveles de endotoxina son tóxicos a las células en cultivo. Este ensayo se llevó a cabo el día de la cosecha después de la transducción, antes de la infusión. El ensayo se llevó a cabo usando el equipo de lisado de amebocitos QCL-1000 Limulus (BioWhittaker #50-647U) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se preparó una solución de interrupción constituida por ácido acético glacial al 25% puesto que ésta no fue proporcionada con el equipo BioWhittaker. Un equipo fue suficiente para 5 cultivos de paciente. Los resultados fueron analizados con los programas y sistemas de programación Softmax. Si los resultados de la muestra de infusión diluida o muestra de VCM diluida eran superiores a 5 EU/ml, la infusión podría no haber continuado. Si los resultados de la muestra de infusión no diluida o la muestra de VCM no diluida eran mayores de 0.3 EU/ml, los resultados de la tinción de Gram fueron remitidos para la confirmación de una posible contaminación por bacterias en la bolsa de infusión. De otro modo se siguió con la infusión.

### 3.3 Tinción de Gram

Se usó la tinción de Gram para probar bacterias Gram positivas y Gram negativas en cultivos celulares antes de la infusión. Se usaron portaobjetos de calidad controlada, los cuales tenían controles positivos y negativos incorporados (portaobjetos Fisherbrand Gramv QC cat #08-80) y el Dispositivo de Tinción de Gram de diagnóstico de Fisher (Cat #SG 100D) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Se dispersó una muestra de 5  $\mu$ l de cada mezcla de infusión uniformemente sobre los portaobjetos. Después de la tinción, los portaobjetos fueron examinados bajo un objetivo 100x con aceite de inmersión. Los cuadros control en la primera columna marcados con "+", que contienen *Staph. Aureus* Gram positivo aparecieron como puntos redondos púrpura oscuro. Los cuadros control en la primera columna marcados con "-" que contienen *E. coli* Gram negativa aparecieron como cilindros rojos-rosas. Si los controles no se apreciaron como éstos, se repitió la tinción. Si las muestras de infusión contenían cualesquier objetos observados como los controles, la infusión no habría procedido. Las células cultivadas mostraron objetos relativamente largos y membranas celulares como filamentos delgados opacos.

### 3.4 Preparación de muestras de cocultivo y amplificación para la prueba de RCR.

Las células transducidas con retrovirus de paciente y el sobrenadante de cultivo celular transducido fueron sometidos a prueba para retrovirus competente para la reproducción (RCR). Por los requerimientos de la U.S. Food & Drug Administration (FDA) se sometieron a prueba 1% o 10<sup>8</sup> de las células de paciente transducidas totales (el inferior) por cada paciente en un ensayo de cocultivo de *Mus dunni* y se probó el 5% del sobrenadante de cultivo celular transducido en el ensayo de amplificación de *Mus dunni*. Esos ensayos fueron efectuados en BioReliance Corp., (anteriormente MA BioServices en Rockville, Maryland, EUA). Las muestras para esos ensayos fueron tomadas al momento de la cosecha celular y la preparación para la infusión y se almacenaron hasta que todos los procedimientos de transducción/cosecha del paciente fueron completados y entonces se transportaron para su prueba.

Las muestras de RCR para la amplificación fueron preparadas para almacenarse como se expone a continuación. Se prepararon muestras de sobrenadante de las células CD34<sup>+</sup> cosechadas finales por triplicado y consistieron en alícuotas de sobrenadante clarificado (5% del volumen total por tubo). Fueron almacenadas a -80°C hasta la recogida de la mezcla de amplificación de pacientes transducida final. Se prepararon muestras de cocultivo de RCR por duplicado para su almacenamiento, usando 2% de cada lote de célula CD34<sup>+</sup> por muestra, y se resuspendieron en medios de criopreservación. Las muestras fueron entonces almacenadas en nitrógeno líquido hasta el momento del transporte. Fueron incluidas suficientes células para asegurar que el número correcto de células disponibles (1%) fuera logrado tras el descongelamiento de la muestra en BioReliance Corp. laboratories.

### 3.5 Aislamiento de plasma/PBMC/médula ósea

Se recogieron muestras de sangre y muestras de médula ósea de pacientes antes de la selección para la infusión y a varios puntos en el tiempo hasta por lo menos 3 años después de la infusión. La sangre fue recogida de tubos ACD de 10 ml, el volumen recogido dependió de las pruebas requeridas. De esas muestras de sangre, fue recogido el plasma y se preparó un PBMC como masas celulares o muestras criopreservadas. Las BMMC fueron preparadas a partir de médula ósea y usadas frescas para el ensayo de CFC y el resto se criopreservaron. Los

procedimientos usados fueron los siguientes.

Recolección de plasma: se centrifugaron tubos de sangre (10 ml, elementos de extracción al vacío ACD-A) durante 10 minutos a 2.000 rpm. La fracción de plasma de cada tubo fue recogida cuidadosamente y reunida en un tubo estéril de 50 ml. Se tomaron alícuotas de volúmenes de 2 ml de plasma y se almacenaron a -80°C.

5 Preparación de PBMC: usando la masa de células eritrocítica/leucocíticas después de la recolección del plasma, las células fueron diluidas a 3 veces el volumen de partida inicial con amortiguador de lavado y se distribuyeron en lotes de 30 ml en tubos de centrifuga de 50 ml. Cada suspensión celular diluida fue subcolocada con 10 ml de Ficoll-Paque (Pharmacia Cat#17-0849-03) y centrifugada a 2.000 rpm durante 20 min a 20°C en un rotor de paletas giratorio. La capa superior fue aspirada, dejando la capa de células mononucleares sin perturbación en la interfase. Las células de la interfase fueron transferidas a un nuevo tubo de 50 ml, reunidas si era apropiado, lavadas con amortiguador de lavado, centrifugadas a 1.500 rpm durante 15 min, y la masa celular resuspendida en 5-10 ml de amortiguador de lavado. Se llevó a cabo un control de células viables sobre 50 ml de mezcla de células usando un hemacitómetro y Azul de Trypan (dilución 1:25). Se tomaron alícuotas de las muestras 1-2 x 10<sup>6</sup> células por tubo y se almacenaron congeladas si se requería, y se lisaron con 140 µl de amortiguador de lisis de Urea. Para la criopreservación, las células fueron resuspendidas a 1-5 x 10<sup>6</sup> células por ml en medio criopreservativo de PBMC y se enfriaron gradualmente en nitrógeno líquido para su almacenamiento.

20 Preparación de células mononucleares de médula ósea (BMMC): Se diluyó médula ósea 1:1 con amortiguador de lavado, y se subcolocaron muestras de 30 ml con Ficoll-Paque y se trataron como anteriormente para PBMC. Los conteos de células viables se llevaron a cabo en 30 µl de muestras y el volumen requerido para el ensayo de CFC (2.5-3 x 10<sup>6</sup> células) colocada a un lado para el ensayo. Todas las BMMC restantes fueron criopreservadas a 1 x 10<sup>7</sup> células por ml en el medio de criopreservación de CD34<sup>+</sup>.

### 3.6 Selección de la muestra para el ensayo CFU de médula ósea

25 Los ensayos de CFU se efectuaron en médula ósea de pacientes antes de la infusión, proporcionando por lo tanto una línea basal o control para todos los otros ensayos de colonia efectuados después de la infusión. Puesto que las células no habían sido expuestas a un agente terapéutico genético o control, no fueron seleccionadas sobre G418. Todos los procedimientos se efectuaron en una campana de biocontención y se aplicó una técnica aséptica en todo momento.

30 Las BMMC preparadas como se describió anteriormente fueron divididas en alícuotas en tres tubos de microcentrifuga estériles de 1.5 ml a 1.5x10<sup>6</sup> células, 7.5x10<sup>5</sup> células, 3x10<sup>5</sup> células por tubo. Las muestras fueron centrifugadas a 2.500 rpm durante 2 min, el medio aspirado y las masas celulares suspendidas perfectamente en 300 µl de RPMI (Gibco BRL, Cat # 118-030) + 1% de FBS (Stem Cell tecnologías, Cat# HCC-6450). Las mezclas celulares fueron pipeteadas en tubos (de poliestireno de 6 ml Falcon, Cat#2058) conteniendo cada una 3 ml de Methocult GFH4434 (Stem Cell Technologies, Cat# HCC-4434). Los contenidos fueron agitados vorticialmente perfectamente durante por lo menos 15 segundos, dejándose en reposo hasta que las burbujas sedimentaran, y se recubrieron cuidadosamente alícuotas de 1.1 ml sobre discos en forma de rejilla (Nunc Cat# 174926) arreglados en una caja de petri. Las cajas de petri presentaban un disco en forma de rejilla adicional que contenía agua estéril, abierto para mantener la humedad durante el cultivo. Las cajas de petri con las cajas en forma de rejilla fueron incubadas a 37°C en un incubador modificado y las colonias se observaron después de 10-14 días.

### 3.7 Ensayo de CFC después de la infusión

40 El ensayo de células formadoras de colonias (CFC) después de la infusión incluyó cultivos con y sin G418. Fue utilizado para evaluar el desarrollo de células progenitoras transducidas después de la infusión. Se usaron dos números/discos de células para asegurar que las colonias estuvieran a una densidad óptima cuando fueran retiradas.

45 Las BMMC se prepararon como se describió anteriormente y se dividieron en alícuotas a 6x10<sup>5</sup> o 1.5x10<sup>6</sup> células en tubos de microcentrifuga estériles. Las células se sedimentaron a ~2.500 rpm durante 2 min. El medio fue aspirado y el sedimento celular resuspendido perfectamente en 600 µl de RPMI + 1% de FBS. Se agregaron 300 µl de cada mezcla celular a tubos que contenían 3 ml de Methocult GFH4434 (StemCell Technologies, Cat# HCC-4434), uno +G418 a 0.9 mg/ml (G418, genticina cristalina, Gibco-BRL Cat# 11811-031) y otros sin -G418. Las muestras fueron entonces agitadas vorticialmente y tratadas adicionalmente como se describió anteriormente para la selección de la muestra en CFU en médula ósea.

### 50 3.8 Preparación de células T, monocitos y granulocitos a partir de sangre.

55 Se aislaron leucocitos de sangre de paciente en varios puntos en el tiempo después de la infección. Esas células fueron fraccionadas en tres tipos (los linajes de células T, macrófagos y granulocitos) para seguir la presencia de RRz2 o LNL6 y niveles de VIH. La sangre fue separada primero en polimorfos en la etapa 1 en eritrocitos, granulocitos y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC se fraccionaron además en dos columnas: una columna CD3 para producir linfocitos y una columna CD14 para producir monocitos. La fracción de granulocitos fue evaluada por su pureza por tinción con Giemsa y las fracciones de linfocitos y monocitos fueron teñidas con FACS para evaluar la

pureza. Todas las fracciones fueron tratadas para preparar lisados celulares para la extracción de ADN y análisis por PCR posteriores.

5 Todos los procedimientos fueron efectuados en una cabina de contención biológica clase II. Se dispusieron 5 ml de sangre humana, fresca, anticoagulada con ACD en tubos de 10 ml, recogida menos de 2 horas anteriormente y mantenida a temperatura ambiente, sobre 3.5 ml de polimorfos de la etapa 1 (Accurate Chemical & Scientific Corporation, Cat# AN221710, almacenado a temperatura ambiente y protegido contra la luz).

10 Los tubos fueron centrifugados a 1.650 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente en un rotor de paletas giratorio. Después de la centrifugación, resultaron visibles dos bandas de leucocitos. La banda superior en la interfaz plasma/Etapa 1 estaba constituida por células mononucleares y la banda inferior por células PMN (granulocitos). Los eritrocitos fueron centrifugados. Todo excepto 1 ml de plasma fue aspirado y transferido a un tubo de "plasma", dejando la capa de células mononucleares sin perturbación en la interfase. Todas las recolecciones de plasma fueron reunidas para cada paciente, divididas en alícuotas en lotes de 2 ml y conservadas para la preparación posterior de la tinción granulocítica. Las células de la interfase de PBMC fueron transferidas cuidadosamente a un tubo de "PBMC", procurando no retirar la banda inferior. Todas las recolecciones de PBMC fueron reunidas para cada paciente. La banda inferior fue transferida a un tubo de "granulocitos" y reunida. Se agregó un volumen igual de PBS hipotónico al tubo de granulocitos. Ambos tubos "PBMC" y "granulocitos" fueron llenados con amortiguador de lavado hasta 50 ml, mezclados y centrifugados a 1500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Un sobrenadante fue aspirado y las células lavadas una vez con 50 ml de amortiguador de lavado. Después de la centrifugación, las células fueron resuspendidas en 10 ml de PBS. Se efectuó un conteo celular (dilución 1:20 con suspensión celular de PBMC y 1:5 con suspensión de granulocitos).

20 Preparación y fenotipificación de sedimento/lisado de células granulocíticas: la suspensión o sedimento celular original fue resuspendido a una concentración final de  $1 \times 10^7$  células/ml, si fue necesario recentrifugando las células primero. Se transfirieron 100  $\mu$ l a un tubo de microcentrifuga para la tinción del fenotipo. Esas células fueron centrifugadas en una microcentrifuga a  $\sim 3.000$  rpm durante 1 minuto, suspendidas en 10  $\mu$ l de fracción de plasma, y 5  $\mu$ l de esta suspensión concentrada se esparcieron sobre cada uno de dos portaobjetos de microscopio. Los portaobjetos fueron secados al aire, teñidos con tinción de Giemsa durante 30 min, enjuagados con agua destilada y se dejaron secar al aire. Fueron examinados bajo un objetivo de 20x y se contó la fracción de granulocitos. El resto de las células granulocíticas fueron sedimentadas en una microcentrifuga a  $\sim 3.000$  rpm durante 2 minutos para la extracción de ADN posterior.

### 30 **3.9 Preparación de ADN de células (Fenolización de ADN-Vacutainer)**

35 Se usaron elementos de extracción al vacío (vacutainer) (Hemogard, SerumSep, 6 ml. Cat# 369789) para algunas extracciones de ADN. Esta fue una forma rápida de extraer ADN genómico de células CD34<sup>+</sup> seleccionadas, colonias de metilcelulosa, y PBMC de pacientes. Se sedimentaron 1 ó 2 millones de células en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml a 3.000 rpm durante 3 minutos en la microcentrifuga, se lavaron una vez con un ml de PBS y a continuación se dispersaron en 70  $\mu$ l de agua. Se agregaron 140  $\mu$ l de amortiguador de lisis de urea a cada tubo, y las fases se mezclaron perfectamente agitando vorticialmente los tubos de 5 a 8 veces. Esos tubos pueden ser conservados congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  indefinidamente. Por cada muestra, se agregaron 0.5 ml de solución de fenol (Tris equilibrado de United States Biochemical # 20083, con 0.4 g de semisulfato de hidroxiquinolona agregados por 400 ml) y la mezcla se bombeó 2 ó 3 veces usando una jeringa de 1 ml con una aguja calibre 23 ó 25, a continuación se vertieron en un elemento de extracción al vacío que contenía 210  $\mu$ l de agua. Entonces se agregaron 15  $\mu$ l de cloroformo a cada elemento de extracción al vacío. Fueron tapados, centrifugados a 2.400 rpm durante 5 min, a continuación se agregaron 0.5 ml de fenol/cloroformo. Fueron agitados durante 30 segundos y recentrifugados a 2.000 rpm durante 3 min. Se repitió la extracción con fenol/cloroformo, seguido por dos extracciones con cloroformo/alcohol isoamílico. Fueron transferidos 400  $\mu$ l de extracto anterior a un tubo de microcentrifuga con una punta resistente al aerosol, y el ADN precipitado con 25  $\mu$ l de NaCl 5M y 850  $\mu$ l de etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El ADN fue recuperado por centrifugación, lavado una vez con etanol al 70%, secado al aire, y resuspendido en 50  $\mu$ l de agua o Tris 5 mM pH 9. Para las fracciones de PBMC o muestras de médula ósea, se usaron 20  $\mu$ l por cada  $10^6$  células. Las preparaciones de ADN fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para muestras de colonias, los 210  $\mu$ l de agua en los elementos de extracción al vacío contenían 10  $\mu$ g de ARNT (Sigma R 9001) como portador.

50 También se preparó ADN de células usando el "Protocolo Acest" y se usó en ensayos de PCR competitivos y PCR-RCR. Las masas celulares de aproximadamente  $5 \times 10^6$  células en un tubo de microcentrifuga fueron resuspendidas en 300  $\mu$ l de amortiguador de lisis (Tris-HCl a 10 mM, KCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  a 3 mM, Triton al 0.4% x 100, pH 8.0, esterilizado por filtración), se agregaron 3  $\mu$ l de PreTaq (Boehringer Mannheim Cat #1696491), la muestra se hirvió durante 5 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo de 1.5 ml con tapón roscado limpio, se agregaron 100  $\mu$ l de amortiguador ACES (2.28 Aces (Sigma Cat. No. A-7949), en 12.5 ml de NaOH 0.5 M, 12.5 ml de Tween 20, pH 6.8, en un volumen de 50 ml, esterilizado por filtración) y 25  $\mu$ l de polímero (Ward et al 1998), la muestra se mezcló vorticialmente brevemente y a continuación se centrifugó durante 2 min a 13.000 rpm. El sedimento fue resuspendido en 50  $\mu$ l de NaOH 20 mM y se dejó a temperatura ambiente hasta que se disolvió perfectamente. La muestra fue hervida durante 5 minutos y la concentración de ADN determinada midiendo la densidad óptica a 260 nm. Las extracciones de células después de la infusión se llevaron a cabo bajo contención de PC3 debido a

la presencia de VIH.

### 3.10 PCR

5 Para la detección de las secuencias de LNL6 o RRz2 en células o colonias de células, se llevó a cabo el análisis por PCR del ADN celular. Los cebadores del PCR fueron marcados con P32 para permitir la detección cuantitativa del producto de la PCR. El marcado se llevó a cabo con  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (ICN #3502005) y Polinucleótido cinasa T4 (GIBCO-BRL Cat# 18004-010) por el procedimiento recomendado. El exceso de marcado no incorporado fue eliminado usando columnas giratorias de G25 Sephadex. Se usó amortiguador 10x para PCR, que contenía Tris 250 mM,  $\text{MgCl}_2$  50 mM, NaCl 500 mM, dATP, dCTP, dGTP, TTP cada uno de 2.5 mM (Gibco BRL 10297-018), 1.0 mg/ml de BSA (Sigma A-4378, preparado como 100 mg/ml), pH 8.0.

10 Los estándares de ADN de pLNL6 y pRRz2 fueron diluidos en Tris 5 mM, pH 9 para proporcionar 1.000 y 100.000 copias por  $\mu\text{l}$  usando ADN de hígado humano como portador y se diluyeron posteriormente para proporcionar un intervalo de 5-5.000 copias por 5  $\mu\text{l}$  de muestra. Para el análisis de la globulina beta humana, se produjeron estándares de ADN humano a partir de un patrón de 1 mg/ml para producir diluciones a 10.000, 3.000, 1.000, 300 y 100 copias de gen por  $\mu\text{l}$ .

15 “Copias superiores” de LNL6/RRz2: procedimiento usado para cuantificar niveles relativamente altos de LNL6 y RRz en preparaciones de ADN. Ese ADN procedía de células CD34 y colonias hematopoyéticas. En este protocolo las reacciones de PCR fueron de 25  $\mu\text{l}$  con no más de  $10^4$  copias del genoma humano. Los cebadores oligonucleotídicos fueron 5L1A, 3L1D, polimerasa Taq de Fisher. La amplificación se llevó a cabo durante 94°C durante 3 minutos, 68°C durante 1 minuto, seguida por 27 ciclos de 94°C durante 1 minuto y 68°C durante 1 minuto usando un controlador térmico programable de MJ Research. También se trataron diez muestras estándares (control), que contenían 5.000, 20 1.000, 500, 100, 50, 10, 5, 0, 0, y 0 copias de RRz2 y 0, 0, 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, y 5.000 copias de LNL6, respectivamente, todas en presencia de 5.000 de genoma humano.

25 “Copias inferiores” de LNL6/RRz2: procedimiento usado para cuantificar niveles relativamente bajos de LNL6 y RRz en preparaciones de ADN. Ese ADN procedía de células de sangre periférica (linfocitos, macrófagos, y granulocitos). En este protocolo la reacción se llevó a cabo en muestras de 50  $\mu\text{l}$  con aproximadamente  $10^6$  copias del genoma humano. Se mezclaron 20  $\mu\text{l}$  de muestras de ADN con 30  $\mu\text{l}$  que contenían los cebadores 5L1A y 2L1D (uno marcado), amortiguador y polimerasa, y se trataron como para las “Copias superiores”, con la excepción de que las etapas de 94°C se extendieron durante 90 segundos. Las muestras estándar fueron en presencia de  $10^6$  copias del genoma humano.

30 Las muestras amplificadas fueron analizadas sobre geles de poliacrilamida al 5% ó 6% por electroforesis usando un amortiguador de Tris-Borato-EDTA (TBE 10x, borato de Tris 0.89M pH 8.3 + EDTA 20 mM) y la radioactividad en las bandas se cuantificó usando un AMBIS 4000 Radioimager.

35 Como un estándar adicional, se cuantificó ADN de beta globulina en preparaciones de ADN donde el número de copias del genoma humano fue de  $\approx 10.000$ . Ese ADN procedía de células CD34<sup>+</sup> y colonias hematopoyéticas, y PBMC, células T, y médula ósea del paciente. La amplificación se llevó a cabo usando cebadores oligonucleotídicos Lx1 y LA2, y 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 65°C durante 2 minutos.

40 También se usó un procedimiento de PCR radioactiva anidada para calcular la relación de marcado de LNL6:RRz2 donde menos de aproximadamente 0.01% de las células contienen cualquier constructo. Las dos rondas de PCR proporcionaron mayor sensibilidad y la incorporación de la marca radioactiva permitió fácilmente la cuantificación usando los programas y sistemas de programación Imagequant. Se usó una técnica de laboratorio meticulosa para evitar la contaminación cruzada y se llevaron a cabo controles apropiados. La primera ronda de PCR usó 1  $\mu\text{g}$  de ADN patrón, los cebadores 5Nes1 y 3L2A, amortiguador II (Perkin Elmer Cat#N808-0010) con  $\text{MgCl}_2$  2mM, dNTP y ADN Polimerasa Taq (Perkin Elmer Cat #N801-0060) en volúmenes de 50  $\mu\text{l}$  con taqbeads (Perkin Elmer Cat #IN808-0100). La amplificación se llevó a cabo para diez reproducciones de cada muestra en placas de PCR Thermofast 96 (Advances Biotechnologies, Cat #AB0600) usando 1 ciclo a 94°C, 17 ciclos de 30 seg/68°C y 30 sec/94°C, y enfriando a 4°C. Los productos de las diez reproducciones fueron reunidos y se usaron 5  $\mu\text{l}$  de muestra reunida por cada segunda ronda de reacción de amplificación. La PCR de la segunda ronda usó el cebador marcado 5L1A y el cebador 3L2A bajo las mismas condiciones que la primera ronda, excepto que se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación. Los productos fueron analizados sobre geles de poliacrilamida. El producto de 216 pb correspondió al RRz2, el producto de 174 pb al LNL6.

### 3.11 RCR-PCR.

55 El ensayo RCR-PCR permitió la detección de retrovirus competentes a la replicación amplificando una región ampliamente conservada del gen *env*. La secuencia amplificada codifica para parte de la región determinante del anfitrión de la proteína envolvente que se requiere para la infección de células a través del receptor anfotrópico. La región amplificada fue de 289 pb de longitud. La sensibilidad del ensayo fue una célula positiva en un fondo de un millón de células negativas ( $10^6$ ).

5 La reacción de PCR usó 7  $\mu$ l de ADN de muestra y los cebadores 5RCR6 = 5'-CTA TGT GAT CTG GTC GGA GA-3' y 3RCR6 = 5'-CCA CAG GCA ACT TTA GAG CA-3' con el Amortiguador II (Perkin Elmer, Cat # N808-0010) y  $Mg^{2+}$  (Perkin Elmer, Cat# N808-0010), dNTP 0.25 mM (Gibco BRL 10297-018), y polimerasa Taq (Taqbead<sup>MR</sup> DNA Polymerase, Promega, Cat # M5661). La amplificación se llevó a cabo con 3 min a 94°C, seguida por 45 ciclos de 94°C durante 30 seg, 63°C durante 30 seg y 72°C durante 30 seg. Las muestras amplificadas fueron analizadas sobre geles de NuSieve al 2.5%. La presencia de la banda de 289 pb indicó la presencia de RCR.

10 Se ensayó un control "sin ADN" que contenía agua en lugar de ADN de muestra en cada experimento de PCR para verificar que no hubo contaminación de ningún reactivo. También se ensayó un control negativo (ADN de CEMT4) para asegurar la especificidad de los amplicones generados. Se ensayó un control positivo ( $10^{-5}$  PA317) en cada PCR para verificar que la sensibilidad de la PCR fue de por lo menos 1 positiva en 100.000 células negativas. Las muestras de "PA317 sembradas", referentes a la adición de 10  $\mu$ l de  $10^{-3}$  ADN de "siembra de PA317" a 20 ng/ml, también se incluyó en cada experimento para permitir probar todas las muestras de prueba en los tubos de PCR replicado. La adición de este ADN de PA317  $10^{-3}$  positivo, verificó el resultado de PCR negativa fue un negativo verdadero para la RCR, no resultado falso negativo debido a ADN no amplificable. Todas las manipulaciones implicaron una técnica de laboratorio meticulosa para evitar contaminación cruzada, por ejemplo, limpieza de bancas y pipetas con hidróxido de sodio 0.1 M, cambio frecuente de guantes y utilización de puntas de barrera de aerosol.

### 3.12 Aislamiento de la colonia en el ensayo CFC

20 El ensayo CFC fue efectuado en células de médula ósea de paciente, células enriquecidas con CD34<sup>+</sup> de aféresis, y el producto transducido final. Las colonias del ensayo fueron analizadas por PCR para los genes LNL6 y RRz2 como se describió anteriormente. Las células de las colonias después de 14 días crecieron en medio de metocelulosa donde se aislaron y lisaron como se expone a continuación. Bajo el microscopio, se aspiraron colonias individuales con puntas resistentes al aerosol P200 y se lavaron en tubos de microcentrífuga. Las puntas fueron enjuagadas con PBS para extraer toda la metocelulosa. Las muestras fueron agitadas vorticialmente a velocidad media durante 15 segundos para disolver la metocelulosa sin cortar las células. El ADN fue aislado de las células después de la lisis como se describió anteriormente.

### 3.13 Extracción de ARN y análisis por RT-PCR

30 Se extrajo el ARN de muestras de paciente usando QIAmp RNA Blood Mini Kit (Qiagen Cat No 52304) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El ARN fue extraído de  $1-5 \times 10^6$  células y resuspendido en 50  $\mu$ l de agua libre de RNasa. Después del tratamiento con DNasa las preparaciones de ARN usando RQ-1 DNasa (Promega, Cat No. M6101), se llevó a cabo la síntesis de ADNc usando aproximadamente 700-1.000 ng de ARN por reacción, cebador 3L2A, y enzima Superscript RNasa H menos RT (Gibco Cat No. 18053-017) a 37°C durante 45 min. Se efectuaron siete reproducciones para cada muestra de ARN y los productos se reunieron antes de usarse como patrón o molde en el procedimiento de PCR anidada descrito anteriormente.

#### Ejemplo 4:

35 Las células HP son cosechadas, transducidas y reinfundidas como se expone a continuación. El procedimiento comprende las etapas siguientes:

Movilización de células HP de médula ósea del sujeto humano en la sangre periférica;

Aféresis de la sangre periférica del individuo para obtener las células HP movilizadas;

40 Etapas de lavado #1; el lavado de las células mononucleares de sangre periférica no purificada usando un lavador de células en preparación para la citorreducción;

Etapas de citorreducción; para eliminar el exceso de células rojas, granulocitos, plaquetas y linfocitos T;

Etapas de lavado #2 de las células HP enriquecidas usando un lavador de células;

Selección de células CD34<sup>+</sup> o agotamiento de células positivas al antígeno de la población de células HP;

Etapas de lavado #3, lavado de las células HP purificadas usando un lavador de células;

45 Cultivo celular colocando las células HP purificadas en cultivo con citocinas/factores del crecimiento;

Procedimiento de transducción de las células HP usando un vector retroviral que contiene el plásmido recombinante del gen en presencia de un agente facilitador de la transducción, preferentemente introduciendo el vector viral introducido usando un lavador de células;

50 Cosechar el producto Celular y lavar las células HP, incluyendo las células HP transducidas usando un lavador celular;

Preparación del producto de infusión, colocando las células HP en una bolsa de infusión y efectuar la prueba de

liberación segura del producto; y

Infusión del paciente, proporcionando las células nuevamente al mismo sujeto.

Esas etapas son descritas con mayor detalle con ejemplos y otras modificaciones como se expone a continuación:

5 Etapa 1 – Movilización de las células HP

10 La primera etapa de este procedimiento utiliza un agente para movilizar las células HP de la médula ósea hacia la sangre periférica. Un ejemplo es la utilización de factor estimulante de la colonia de los granulocitos (G-CSF, Neupogen<sup>MR</sup>) que es administrado al paciente subcutáneamente, a por lo menos 10 µg/kg/día y preferentemente a 30 µg/kg/día, una vez al día, durante hasta cinco días consecutivos. Se efectúan conteos de sangre completa (CBC), conteo diferencial y de plaquetas diariamente durante la administración de G-CSF para evaluar el grado de leucocitosis. Se extrae una muestra de sangre para el conteo de células CD34<sup>+</sup> el día 3 de la administración de G-CSF para asegurar que el conteo de CD34<sup>+</sup> de sangre periférica sea superior a 20 células/mm<sup>3</sup> antes del inicio de la aféresis. No alcanzar este número de células CD34<sup>+</sup> sin embargo no previene la aféresis los días 4,5 y 6 de la administración G-CSF.

15 Etapa 2 – Aféresis

20 La aféresis es un procedimiento de “filtración de sangre” para obtener la fracción de células mononucleares de la sangre periférica. Se realizó con una de las máquinas Cobe Spectra (Gambra), Hemonetics (Domedica) o Amicus (Baxter) en por lo menos dos ocasiones separadas, (preferentemente en los días 4, 5 ó 6 después de la movilización, donde el día 1 es el primer día de movilización inducida), aunque en otros ejemplos esto puede hacerse días antes o después determinando el día en el que el conteo de CD34<sup>+</sup> de sangre periférica es superior a 5 células/mm<sup>3</sup> o más preferentemente a 10 células/mm<sup>3</sup> y todavía más preferentemente 20 células/mm<sup>3</sup>. En una forma de realización preferida, esta aféresis produce un producto celular de aproximadamente 5 Litros (L) del flujo de sangre a través, preferentemente, este será de 5-10 L, más preferentemente 10-20 L, y todavía más preferentemente 20L o más. El producto de cada aféresis es tratado por separado o, en una forma de realización preferida, reunido después de la segunda aféresis. Los conteos de células totales, y los números de células CD34<sup>+</sup> absolutos son registrados. La utilización de las etapas 1 y 2 producirá hasta más de 5x10<sup>6</sup>, preferentemente más de 2x10<sup>7</sup>, más preferentemente más de 4x10<sup>7</sup> HP (de acuerdo a lo medido por la positividad de CD34) células/kg.

25 Etapa 3 - Etapa de lavado #1 (preferentemente en los días de la aféresis).

Las células reunidas son lavadas. Esto se hace por centrifugación celular o más preferentemente usando un lavador de células automatizado, en un ejemplo este lavado de célula se efectúa usando un lavador Nexell CitoMate.

30 Etapa 4 - Etapa de citorreducción (preferentemente los días de la aféresis).

35 En una forma de realización, las células del procedimiento de la aféresis se someten a “citorreducción” usando un sistema como el sistema Charter Medical DACS-SC<sup>MR</sup>. En la forma de realización en la que el producto es almacenado durante la noche desde el primer día para reunirlo con el producto del segundo día, los dos productos de la aféresis se someten a citorreducción el día de la recolección y el primer producto almacenado hasta que el segundo producto se haya sometido a citorreducción.

Etapa 5 - Etapa de lavado #2 (preferentemente el día 6).

Las células son tomadas, reunidas (en la forma de realización en la que existen dos productos) y lavadas por centrifugación o usando un dispositivo Nexell CitoMate o similar. (Si existen más de dos productos todos serán reunidos en el último punto temporal).

40 Etapa 6 - Selección de células CD34<sup>+</sup> (preferentemente el día 6)

45 Las células CD34<sup>+</sup> son seleccionadas del producto después del lavado usando el Isolex 300i, Miltenyi o una estrategia de agotamiento del linaje de células que expresan marcadores (por ejemplo, glicoproteína A CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b, StemSep). La fracción reunida enriquecida de CD34<sup>+</sup> o células agotadas en linaje preferentemente comprende por lo menos 40%, más preferentemente por lo menos 60% y todavía más preferentemente por lo menos 80% de células de este tipo.

Etapa 7 - Etapa de lavado #3 (preferentemente el día 6)

Las células son lavadas por centrifugación o usando el Nexell CytoMate o equipo similar.

Etapa 8 - Cultivo celular (preferentemente los días 6-9)

50 Las células son contadas y colocadas preferentemente a 1x10<sup>5</sup> a 5x10<sup>6</sup> células/ml en matraces de cultivo celular, bolsas de cultivo celular o en una forma de realización preferida en una bolsa de cultivo Nexell Lifecell X-Fold de 1,000 ml (390 cm<sup>2</sup>) o similar con medio de Dulbecco Modificado por Iscove más Suero Fetal Bovino al 10% (FBS) que

contiene citocinas/factores del crecimiento. En una forma de realización preferida esta mezcla de citocina/factor del crecimiento está constituida por el factor de células troncales (50 ng/ml) y el factor del crecimiento y desarrollo de megacariocitos (100 ng/ml). las etapas 3-9 darán como resultado hasta  $12 \times 10^7$  células HP o más (de acuerdo a lo evaluado por la positividad CD34) por kg.

#### 5 Etapa 9 - Procedimiento de transducción (preferentemente el Día 8)

Las células son cosechadas del primer matraz, la bolsa de cultivo tisular, incluyendo una forma de realización preferida de una bolsa de Cultivo Lifecell o similar y usando el dispositivo Cytomate similar, resuspendidas en sobrenadante retroviral (un ejemplo de éste es un alícuota de 200 ml) y transferidas a un segundo recipiente de cultivo tisular, un tipo del que es la bolsa de cultivo Lifecell X-Fold que tiene un agente que facilita la transducción en el retrovirus. Estos agentes incluyen polibreno, sulfato de protamina, lípidos catiónicos o en una forma de realización preferida, en un recipiente de cultivo tisular que ha sido prerrecubierto con RetroNectina a 1-4 mcg/cm<sup>2</sup>. Después de 4-10 horas o hasta 24 horas, el procedimiento de transferencia será repetido usando el CytoMate o similar; para esta segunda transducción las células son transferidas a un nuevo recipiente de cultivo tisular (polibreno, sulfato de protamina) o devueltas al mismo recipiente o recubierto con RetroNectina similar del que provienen. En una forma de realización preferida, esto se hace en una alícuota fresca de sobrenadante retroviral y se cultiva durante la noche. En otras formas de realización esto no se realiza o repite varias veces durante periodos de tiempo similares. Se recoge una alícuota de los sobrenadantes retrovirales para probar la esterilidad. Esto dará como resultado hasta  $6 \times 10^7$  células HP que contienen gen o más (de acuerdo por lo evaluado por la positividad CD34) por kg. Este número es determinado por un ensayo cuantitativo. La eficiencia de la transducción será de por lo menos 20%, y preferentemente en el intervalo de 30-50%, y más preferentemente, más del 50%.

#### Etapa 10- Cosecha de producto celular (preferentemente el día 9).

La mañana del día 9, las células son cosechadas y lavadas usando una centrifuga celular estándar o sistemas automatizados como las muestras de Cytomate de cultivo celular. Esto producirá hasta  $5.7 \times 10^7$  células HP que contienen gen o más (de acuerdo con lo evaluado por la positividad en CD34) por kg.

#### 25 Etapa 11- Producto de la infusión (preferentemente el Día 9)

Las células son resuspendidas en un amortiguador de infusión fisiológico que contiene 5% de seroalbúmina humana o similar como portador. Son extraídas las muestras en alícuotas para determinar la esterilidad (aeróbica, anaeróbica, fungal, micoplasma). El producto de la infusión no es liberado hasta que estén disponibles los resultados de la prueba de endotoxina (LAL) y tinción de Gram.

#### 30 Etapa 12- Infusión del paciente (preferentemente el día 9).

La preparación de células CD34<sup>+</sup> es administrada al paciente premedicado según sea apropiado. En una forma de realización preferida, el paciente recibe una sola infusión de  $0.5-6 \times 10^7$  células CD34<sup>+</sup> transducidas por kilogramo de peso corporal (célula/kg) en amortiguador de infusión fisiológico con un contenido de 5% por seroalbúmina humana o similar como portador. La dosis de células CD34<sup>+</sup> transducidas por paciente dependerá de la eficiencia de cada etapa de los procedimientos de movilización, aféresis, aislamiento, cultivo y transducción. El número total de células CD34<sup>+</sup> (transducidas o no transducidas) es determinado por conteo celular y citometría de flujo. Las células HP que contienen gen introducido dan lugar a un sistema hematopoyético quimérico en el que existe un porcentaje de células HP que contiene un gen en la médula ósea. En una forma de realización preferida, para el tratamiento de VIH-SIDA, este porcentaje de células HP que contienen genes de por lo menos el 5%, más preferentemente superior a 10%, y todavía más preferentemente, superior a 20%.

#### **Ejemplo 5. Utilización de ARNi con capacidad de direccionamiento múltiple para inhibir la reproducción de VIH-1**

Se diseñó un constructo de ARNi con capacidad de direccionamiento múltiple contra VIH-1 como se expone a continuación. Se produce un casete que comprende 3 unidades de ARNi presentando cada una segmentos de 19-25 nucleótidos correspondientes al VIH-1 en orientación sentido (1A, 2A, 3A) y orientación antisentido (1B, 2B, 3B) véase la Figura 14, de modo que 1B, 2B y 3B sean complementarias en secuencia a 1A, 2A y 3A, respectivamente. Las secuencias 1A, 2A y 3A son seleccionadas como si estuvieran altamente conservadas en la mayoría de las cepas de VIH-1, por ejemplo la posición de las secuencias 5831-5849 (atggagccagtagatccta), la posición de la secuencia 5852-5870 (ctagagccctggaagcatc), y la posición de la secuencia 5971-5989 (tggcaggaagaagcggaga) en la cepa HXB2 o regiones correspondientes en otras cepas. Las secuencias fueron calculadas usando el servicio localizado en el siguiente sitio web:

<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/NUM-HXB2/HXB2.Nuc.html>.

Las secuencias 1A, 2A y 3A preferentemente difieren en no más de un nucleótido en comparación con las secuencias correspondientes en la mayoría de las células de VIH-1. Cada una de la secuencias de 19 nucleótidos son conservadas razonablemente dentro del gen tat sobre muchos subtipos de VIH y muy bien conservadas en el subtipo B. Cada una de esas secuencias de 19 nucleótidos presenta no más de una desviación de un par de bases de la secuencia

de consenso dentro del subtipo B. La primera secuencia incluye la diana para Rz2. Las diferencias próximas a los extremos de las secuencias pueden ser toleradas mejor. Las unidades ARNi están separadas por separadores que pueden ser de 3-7 nucleótidos de longitud. Los separadores pueden ser más largos, por ejemplo comprender secuencias de intrón para ayudar a la localización citoplásmica de las unidades de ARNi. El casete es flanqueado por secuencias de ribozima de autoescisión para permitir la liberación de moléculas de ARNi múltiples. Por ejemplo, el extremo 5' puede ser tratado por una ribozima cabeza de martillo donde el dominio catalítico está concebido de acuerdo con la patente US nº 6.127.114, y el extremo 3' por una ribozima de horquilla autocatalítica concebida de acuerdo con la patente US nº 5.856.188. Tal configuración proporciona extremos con bases apareadas (romos) para la molécula de ARNi sin nucleótidos extra, aunque pueden ser tolerados. La escisión autocatalítica se produce en las posiciones indicadas con una flecha (Figura 14) para liberar las tres moléculas que contienen ARNi. Los separadores 1/2 y 2/3 pueden comprender secuencias de escisión, por ejemplo secuencias escindibles de las ribozimas cabeza de martillo o de horquilla o unidades de ribozima adicionales, para permitir la separación de las unidades ARNi. Claramente, pueden ser usadas unidades de ARNi únicas o multímeros de hasta seis o incluso diez unidades.

El casete es montado como una molécula de ADN a partir de oligonucleótidos recocidos traslapados e insertados en un vector plasmídico bajo el control de un promotor T7. Una cepa de *E.coli* deficiente en recombinación que permite la reproducción estable de plásmidos con secuencias repetidas invertidas, como es conocido en la técnica, es usada como hospedador de la clonación. Los separadores más largos (por ejemplo intrones) también ayudan a este respecto. La secuencia nucleotídica del inserto de ADN es confirmada por la secuenciación de ADN. Se utiliza la ARN polimerasa T7 para transcribir el ADN *in vitro* en presencia de UTP marcado radiactivamente y la capacidad de autoescisión de las unidades de ribozima son ensayadas por electroforesis en los productos de la transcripción sobre geles de poliacrilamida y autorradiografía. La autoescisión se produce a una eficiencia superior a 90% durante la transcripción a 37°C durante 1 hora. La longitud y/o secuencia de los racimos y ciclos en los dominios de ribozima pueden ser ajustadas si la escisión es menos eficiente de lo deseado.

El casete es insertado en la forma plásmida de un vector retroviral como el pLNL6 bajo el control de un promotor dependiente de la ARN polimerasa II. De manera alternativa, puede ser usado un promotor dependiente de la ARN polimerasa III. El casete es insertado en un sitio de restricción en el vector en la orientación apropiada. El plásmido resultante es introducido en líneas de células empaquetadoras como la línea AM-12 y células transfectadas de manera estable usada para producir el vector retroviral. La línea de células CemT4 o PBL son transducidas con el vector retroviral y la expresión del constructo de ARNi determinada por ensayos de protección con ARNasa o PCR de transcripción inversa, como es conocido en la técnica. Se aprecia una protección significativa de las células transducidas después de la infección con cualquiera de las diferentes cepas de VIH-1. Se observa una reducción de producción de p24 de más de 90% en comparación con el control (vector sin casete de ARNi), indicando una reproducción de VIH-1 reducida.

Las células CD34<sup>+</sup> son obtenidas a partir de pacientes, transducidas con el vector retroviral en presencia de RetroNectina por procedimientos como se describió anteriormente en la presente solicitud. Son administradas por lo menos 0.5 x 10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup> células transducidas por kg (de peso del paciente) en una población de células total de más de 1.63 x 10<sup>6</sup> de esas células CD34<sup>+</sup> por kg a los pacientes por infusión. Preferentemente, son administradas más de 5 x 10<sup>6</sup> células CD34<sup>+</sup> transducidas por kg. Esas células se injertan a la médula ósea de los pacientes y producen linfocitos T y macrófagos/monocitos protegidos durante más de 3 años después de la infusión. Esas células están relativamente protegidas contra la infección por VIH-1 y contribuyen a una función inmunitaria mejorada.

### DISCUSIÓN FINAL

En el ensayo clínico descrito en la presente memoria, se demostró que la introducción de un gen para la expresión de un agente anti-VIH en células CD34<sup>+</sup> *ex vivo* y la infusión de esas células en pacientes autólogos es técnicamente factible y segura. Se descubrió la presencia y la expresión del constructo de ribozima en células linfoides y mieloides de sangre periférica durante por lo menos 3 años. El grado de marcado celular varió en los 10 pacientes tratados en este estudio, permitiendo las conclusiones siguientes. Se descubrió que los parámetros relevantes al grado de marcado celular fueron el porcentaje de transducción de células CD34<sup>+</sup>, el número de células CD34<sup>+</sup> transducidas infundidas, y el número total de células CD34<sup>+</sup> infundidas. Se descubrió que el número real de células transducidas es importante. Las células no transducidas podrían ejercer una función en la mejora de la supervivencia de las células transducidas en la sangre periférica y órganos como el hígado puesto que se alojan en el compartimento de la médula ósea. El injerto prolongado de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> transducidas requirió una dosis mínima de 0.52 x 10<sup>6</sup> células transducidas en una población de células CD34<sup>+</sup> total de por lo menos 1.63 x 10<sup>6</sup> células, en el contexto de la ausencia de precondicionamiento mieloablativo. Se produjo una supervivencia preferida de los linfocitos que contienen ribozimas sobre los linfocitos control, aún bajo niveles relativamente bajos de selección. El grado de supervivencia preferido fue dependiente de las dosis de células CD34<sup>+</sup>, es decir, que correlacionó positivamente con el número de células transducidas infundidas, que resultó inesperado. Es razonable esperar un grado aún mayor de supervivencia preferida de linfocitos protegidos con ribozima a niveles mayores de selección, y un mayor beneficio terapéutico a dosis de células superiores.

Se proporcionan así las bases para una terapia génica efectiva de células hematopoyéticas para el tratamiento del SIDA/infección por VIH y muchas otras enfermedades. Proporciona un conocimiento importante para asegurar una calidad efectiva y la evaluación del procedimiento en un escenario clínico.

**REFERENCIAS**

|    |                       |      |                                    |
|----|-----------------------|------|------------------------------------|
|    | Amado et al           | 1998 | Human Gene Ther 9:173-183          |
|    | Amado y Chen          | 1999 | Science 285:674-676                |
|    | Amado et al           | 1999 | Human Gene Ther 10:2255-2270       |
| 5  | Austin et al          | 2000 | Blood 95:829-36                    |
|    | Autran et al          | 1997 | Science 277: 112-116               |
|    | Bagnis et al          | 2002 | Exp Hematol 30:108-15              |
|    | Bai et al             | 2000 | Molecular Therapy 1:244-54         |
|    | Barnett et al         | 1998 | Brit J Hematol 102:553-65          |
| 10 | Bazin et al           | 1989 | Biochem Pharmacol 38:109-19        |
|    | Behringer et al       | 1999 | Bone Marrow Transplant 24:295-302  |
|    | Benboubker et al      | 2001 | Brit J Hematol 113:247-50          |
|    | Bender et al          | 1987 | J Virol 61:1639-46                 |
|    | Bender et al          | 1991 | Blood 77:2591-6                    |
| 15 | Bertolini et al       | 1998 | Bone Marrow Transplant 21:S5-7     |
|    | Bodine et al          | 1998 | Ann NY Acad Sci 850:139-50         |
|    | Bonyhadi et al        | 1997 | J Virol 71:4704-16.                |
|    | Bordignon et al       | 1995 | Science 270:470-5                  |
|    | Briones et al         | 1999 | Haematologic 84:483-8              |
| 20 | Brooks et al          | 2001 | Nature Med 7:459-64                |
|    | Bunting et al         | 1999 | Ann NY Acad Sci 872:125-40         |
|    | Campos                | 1993 | Leukemia 7:1409-15                 |
|    | Case et al            | 1999 | Proc Natl Acad Sci USA 96:2988-93  |
|    | Cavazzana-Calvo et al | 2000 | Science 288:669-672                |
| 25 | Cavazzana-Calvo       | 2001 | J Gene Med 3:201-6                 |
|    | Challita y Kohn       | 1994 | Proc Nad Acad Sci USA 91:2567-71   |
|    | Chang y Roni          | 1996 | Gene 183:137-42                    |
|    | Chatterjee et al      | 1999 | Blood 93:1882-1894                 |
|    | Cheng et al,          | 2000 | Nat Med 6:1235-40                  |
| 30 | Cherry et al,         | 2000 | Mol Cell Biol 20:7419-26           |
|    | Chu et al             | 1998 | J Mol Med 76:184-192               |
|    | Cohen-Haguenaer et al | 1998 | Hum Gene Ther 9:207-16             |
|    | Crystal               | 1995 | Science 270:404-10                 |
|    | Dao et al             | 1997 | Blood 89:446-56                    |
| 35 | Dao et al             | 1998 | Proc Natl Acad Sci USA 95:13006-11 |
|    | Dao et al             | 1998 | Blood 92:4612-21                   |

|    |                        |       |   |
|----|------------------------|-------|---|
|    | Dao y Nolta            | 1999  | Leukemia 13:1473-80                         |
|    | Dao y Nolta            | 2000  | Leukemia 14:773-6                           |
|    | Donahue et al          | 1998  | Nature Med 4:181-6                          |
|    | Douek et al            | 1998  | Nature 396:690-695                          |
| 5  | Ducos et al            | 2000  | Gene Ther 7:1790-4                          |
|    | Dunbar et al           | 1995  | Blood 85:3048-3057                          |
|    | Dunbar et al           | 1998a | Hum Gene Ther 9:2629-40                     |
|    | Dunbar et al           | 1998b | Hum Gene Ther 7:231-53                      |
|    | Dunbar et al           | 2001  | Ann NY Acad Sci 938:236-45                  |
| 10 | Eglitis y Schneiderman | 1997  | Biochem Biophys Res Commun 231:477-80       |
|    | Fan et al,             | 2000  | Hum Gene Ther 11:1313-27                    |
|    | Fehse et al,           | 1997  | Hum Gene Ther 8:1815-24                     |
|    | Feng et al,            | 1997  | Nature Biotechnol 15: 866-870               |
|    | Fisher-Adams et al     | 1996  | Blood 88:492-504                            |
| 15 | Fu y Liesveld          | 2000  | Blood Rev 14:205-18                         |
|    | Gabarre et al          | 2000  | The Lancet 355:1071-2                       |
|    | Gambotto et al         | 2000  | Methods Mol Biol 135:495-508                |
|    | Gerard et al           | 1996  | Hum Gene Ther 7:343-54                      |
|    | Gervaix et al          | 1997  | Hum Gene Ther 8:2229-38                     |
| 20 | Giarratana et al       | 1998  | Bone Marrow Transpl 22:707-15               |
|    | Gitlin et al           | 2002  | Nature advance online publicn. 26 June 2002 |
|    | Glimm et al            | 1998  | Hum Gene Ther 9:771-8                       |
|    | Gluckman               | 2000  | Exp Hematol 28:1197-205                     |
|    | Goemer et al           | 1999  | Blood 94:2287-92                            |
| 25 | Gothot et al           | 1998  | Blood 92: 2641-2649                         |
|    | Grimm y Kleinschmidt   | 1999  | Hum Gene Ther 10:2445-2450                  |
|    | Haas et al             | 2000  | Mol Ther, 2:71-80                           |
|    | Hacein-Bey-Abina et al | 2002  | New Eng J Medicine 346:1185-93              |
|    | Halene et al           | 1999  | Blood 94:3349-57                            |
| 30 | Halene y Kohn          | 2000  | Hum Gene Ther 11:1259-67                    |
|    | Hampel et al           | 1990  | Nucleic Acids Res 18:299-304                |
|    | Hanenberg et al        | 1996  | Nat Med 2:876-82                            |
|    | Hanenberg et al        | 1997  | Hum Gene Ther 8:2193-2206                   |
|    | Hao et al              | 1996  | Blood 88:3306-3313                          |
| 35 | Harrison               | 1980  | Blood 55:77-81                              |
|    | Harrison et al         | 1988  | Proc Natl Acad Sci USA 85:822-6             |

|    |                      |      |  |
|----|----------------------|------|--|
|    | Haseloff y Gerlach   | 1988 | Nature 334:585-91                          |
|    | Hennemann et al      | 1999 | Exp Hematol 27:817-825                     |
|    | Herrera et al        | 2001 | Brit J Hematol 114:920-30                  |
|    | Hesforffer et al     | 1998 | J Clin Oncol 16:165-72                     |
| 5  | Ho                   | 1993 | Leukemia 7:1738-46                         |
|    | Ho et al             | 1995 | Nature 373:123-126                         |
|    | Ho et al             | 1996 | Blood 88 (suppl I):405a                    |
|    | Hodgson y Bradley    | 1979 | Nature 281:381-2                           |
|    | Hogan et al          | 2002 | Proc Natl Acad Sci USA 99:413-8            |
| 10 | Hoogerbrugge et al   | 1996 | Gene Ther 3:179-183                        |
|    | Huhn et al           | 1996 | Exp Hematol 24:839-47.                     |
|    | Huss                 | 2000 | Stem Cells 18:1-9                          |
|    | Hutchings et al      | 1998 | J Hematother 7:217-24                      |
|    | Imbert et al         | 1998 | Exp Hematol 26:374-81                      |
| 15 | Jacque et al         | 2002 | Nature advance online publicn 26 June 2002 |
|    | Jamieson et al       | 1999 | Immunity 10: 569-575                       |
|    | Jones et al          | 1990 | Nature 347:188-9                           |
|    | Kansas               | 1996 | Blood 88:3259-87                           |
|    | Kiem et al           | 1997 | Blood 90:4638-4645                         |
| 20 | Kiem et al           | 1998 | Blood 92:1878-1886                         |
|    | Kirby et al          | 2000 | Blood 95:3710-5                            |
|    | Knaan-Shanzer et al  | 2001 | Hum Gene Ther 12:1989-2005                 |
|    | Knop et al           | 1999 | Gene Therapy 6:373-84                      |
|    | Kobari et al         | 2000 | Exp Hematol 28:1470-80                     |
| 25 | Kohn                 | 1995 | Nature Medicine 1:1017-1023                |
|    | Kohn et al           | 1998 | Nature Medicine 4:775-780                  |
|    | Kohn et al           | 1999 | Blood 94:368-71                            |
|    | Krämer et al         | 1999 | Proc Natl Acad Sci USA 96:2087-92          |
|    | Kume et al           | 1999 | Int J Hematol 69:227-33                    |
| 30 | Lane et al           | 1995 | Blood 85:275-82                            |
|    | Lange y Blankenstein | 1997 | Gene Therapy 4:303-8                       |
|    | Lataillade et al     | 2000 | Blood 95:756-68                            |
|    | Law et al            | 1999 | Exp Hematol 27:147-54                      |
|    | LeDoux et al         | 2001 | Hum Gene Ther 12:1611-21                   |
| 35 | Lee et al            | 1994 | J Virol 68:8254-64                         |
|    | Lewis y Verfaillie   | 2000 | Exp Hematol 28:1087-95                     |

|    |                    |      |   |
|----|--------------------|------|---|
|    | Lieber et al       | 1999 | J Virol 73:9314-24                        |
|    | Lisziewicz et al   | 1993 | Proc Natl Acad Sci USA 90:8000-4          |
|    | Liu et al          | 1999 | Hum Gene Ther 10:2337-46                  |
|    | Lyman y Jacobsen   | 1998 | Blood 91:1101-34                          |
| 5  | Maciejewski et al  | 1995 | Nature Med 1:667-73                       |
|    | Malech et al       | 1997 | Proc Natl Acad Sci USA 94:12133-8         |
|    | Malik et al        | 1995 | Blood 86:2993-3005                        |
|    | Maryin et al       | 1996 | Blood 88:4568-78                          |
|    | Marasco et a       | 1998 | Human Gene Ther 9:1627-42                 |
| 10 | Marini et al       | 2000 | Caner Gene Ther 7:816-25                  |
|    | Martinez et al     | 1999 | Exp Hematol 27:561-8                      |
|    | Mautino y Morgan   | 2002 | AIDS Patient Care y Stds 16:11-26         |
|    | Michienzi et al    | 2000 | Proc Nalt Acad Sci USA 97:8955-60         |
|    | Miller             | 1986 | Beyond ANOVA; New York; John Wiley y Sons |
| 15 | Miller y Bultimore | 1986 | Mol Cell Biol 6:2895-902                  |
|    | Miyoshi et al      | 1999 | Science 283:682-686                       |
|    | Moore y MacKenzie  | 1999 | Prog Exp Tumor Res 36:20-49               |
|    | Mountain           | 2000 | TIBTECH 18:119-128                        |
|    | Murray et al       | 1999 | Exp Hematol 27:1019-28                    |
| 20 | Murray et al       | 2000 | Hum Gene Ther 11:2039-50                  |
|    | Naldini et al      | 1996 | Science 272:263-7                         |
|    | Newbound et al     | 2001 | Exp Hematol 29:163-73                     |
|    | Ng et al           | 2002 | Bril J Hematol 117:226-37                 |
|    | Nolta et al        | 1992 | Exp Hematol 20:1065-1071                  |
| 25 | Novina et al       | 2002 | Nature advance online publicn 3 June 2002 |
|    | Ogawa et al        | 1993 | Blood 81:2844-2853                        |
|    | Ojwang et al       | 1992 | Proc Natl Acad Sci USA 89:10802-6         |
|    | Omori et al        | 1999 | J Hematother Stem Cell Res 8:503-14       |
|    | Orlic y Bodine     | 1994 | Blood 84:3991-3994                        |
| 30 | Orlic et al        | 1999 | Ann NY Acad Sci 872:115-24                |
|    | Ostrowski et al    | 1999 | J Virol 73:6430-5                         |
|    | Quan et al         | 1999 | Exp Hematol 27:1511-8                     |
|    | Pakker et al       | 1998 | Nature Medicine 4:208-14                  |
|    | Parkman            | 1986 | Science 232:1373-78                       |
| 35 | Peters et al       | 1996 | Blood 87:30-7                             |
|    | Picker et al       | 1993 | J Immunol 150:1105-21                     |

|    |                    |      |  |
|----|--------------------|------|--|
|    | Poulin et al       | 1999 | J Exp Med 190:479-86                         |
|    | Ragg et al         | 2000 | Cancer Res 60:5187-95                        |
|    | Ramezani et al     | 2002 | Frontiers in Bioscience 7:A29-36             |
|    | Ranga et al        | 1998 | Proc Natl Acad Sci USA 95:1201-6             |
| 5  | Reese et al        | 1999 | J Hematother Stem Cell Res 8:515-23          |
|    | Reis               | 1999 | Transplant Proc 31:2970-2                    |
|    | Relyer et al       | 2001 | J Gene Med 3:207-18                          |
|    | Relyer et al       | 2002 | J Gene Med 4:122-32                          |
|    | Richter y Karlson  | 2001 | bit J Hematol 73:162-69                      |
| 10 | Rivella et al      | 2000 | J Virology 74:4679-87                        |
|    | Robbins et al      | 1998 | Proc Natl Acad Sci USA 95:10182-7            |
|    | Roe et al          | 1993 | EMBO J 12:2099-2108                          |
|    | Rosler et al       | 2000 | Exp Hematol 28:841-52                        |
|    | Rossi et al        | 1992 | AIDS Res y Human Retroviruses 8:183-9        |
| 15 | Sadelain et al     | 2000 | Curr Opin Hematol 7:364-77                   |
|    | Syers et al        | 1988 | Immunol Today 9:195-9                        |
|    | Syhaus et al       | 1998 | Exp Hematol 26:73-8                          |
|    | Sanyal y Schuening | 1999 | Hum Gene Ther 10:2859-68                     |
|    | Sarver et al       | 1990 | Science 247:1222-5                           |
| 20 | Sato et al         | 1999 | Blood 94:2548-2554                           |
|    | Saylors et al      | 1999 | Gene Ther 6:944-6                            |
|    | Schilz et al       | 1998 | Blood 92:3163-71                             |
|    | Schilz et al       | 2000 | Mol Ther 2:609-18                            |
|    | Schilz et al       | 2001 | J Gene Med 3:427-36                          |
| 25 | Sczakiel y Pawlita | 1991 | J Virol 65:468-72                            |
|    | Shaheen et al      | 1996 | J Virol 70:3392-400                          |
|    | Siena et al        | 1989 | Blood 74:1905-14                             |
|    | Smythe et al       | 1994 | Proc Natl Acad Sci USA 91:3657-61            |
|    | Solar et al        | 1998 | Blood 92:4-10                                |
| 30 | Strayer et al      | 2000 | Gene Ther 7:886-95                           |
|    | Su et al           | 1997 | Blood 89:2283-90                             |
|    | Sun et al          | 1995 | Proc Natl Acad Sci USA 92:7272-6             |
|    | Sun et al          | 1995 | Nucl Acids Research 23:2909-13               |
|    | Sun et al          | 1996 | Nucl Acids Mol Biol Catalytic RNA 10: 329-34 |
| 35 | Sullon et al       | 1998 | J Virol 72:5781-8                            |
|    | Takaloku et al     | 2001 | J Clinical Investig 108:447-55               |

|    |                     |      |                                   |
|----|---------------------|------|-----------------------------------|
|    | Tavolini            | 1997 | Gene Ther 4:150-5                 |
|    | Thomas et al        | 1999 | Methods 17:202-18                 |
|    | To et al            | 1997 | Blood 85:2233-58                  |
|    | Traycoff et al      | 1998 | Exp Hematol 26:53-62              |
| 5  | Uchida et al        | 1998 | Proc Natl Acad Sci USA 95:1939-44 |
|    | Vassilopoulos et al | 2001 | Blood 98:604-609                  |
|    | Veres et al         | 1998 | J Virol 72:1894-                  |
|    | Verfaillie et al    | 2000 | Exp Hematol 28:1071-9             |
|    | Vignoli et al       | 1998 | AIDS 12:999-1005                  |
| 10 | von Laer et al      | 1998 | JVirol 72:1424-30                 |
|    | Wang et al          | 1998 | Human Gene Ther 9:1283-91         |
|    | Ward et al          | 1998 | American J Pathology 153:373-379  |
|    | Williams et al      | 1999 | Ann NY Acad Sci 872:109-13        |
|    | Yu et al            | 1995 | Proc Natl Acad Sci USA 92:699-703 |
| 15 | Zanjani et al       | 1998 | Exp Hematol 26:353-60             |
|    | Zauli et al         | 1996 | JExpMed 183:99-108                |
|    | Zhang et al         | 1999 | J Exp Med 190:725-32              |
|    | Zhang et al         | 1998 | Proc Natl Acad Sci USA 95:1154-9  |
|    | Zimmermann et al    | 1995 | Bone Marrow Transpl 9:439-44      |
| 20 |                     |      |                                   |

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para su utilización en el tratamiento de la infección por VIH en un sujeto humano, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y por lo menos  $1,63 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal de un sujeto humano al que debe administrarse la composición, siendo por lo menos  $0,52 \times 10^6$  de dichas células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal de dicho sujeto transducidas con un constructo viral que expresa un agente anti-VIH y en la que las células CD34<sup>+</sup> transducidas pueden ser injertadas, dando lugar a células de progenie durante por lo menos 12 meses, en el sujeto.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, que comprende por lo menos  $9,37 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal de un sujeto humano, en la que por lo menos  $5 \times 10^6$  células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> son transducidas.
3. Composición según las reivindicaciones 1 a 2, en la que el agente anti-VIH es un ARN.
4. Composición según las reivindicaciones 1 a 2, en la que el agente anti-VIH es una molécula de ARNi.
5. Composición según las reivindicaciones 1 a 2, en la que el agente anti-VIH es una molécula antisentido.
6. Composición según las reivindicaciones 1 a 2, en la que el agente anti-VIH es una ribozima.
- 15 7. Composición según la reivindicación 6, en la que el agente anti-VIH es una ribozima codificada por los nucleótidos de ADN que presentan la secuencia 5'-TTA GGA TCC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACT GGC TC-3'.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que las células son transducidas con un vector retroviral.
- 20 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la composición está sustancialmente libre de citocinas.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la composición está sustancialmente libre de virus.
- 25 11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que las células CD34<sup>+</sup> transducidas pueden ser injertadas, y dar lugar a células de progenie durante por lo menos 24 meses, en el sujeto.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el sujeto es un adulto.
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> son autólogas.
- 30 14. Procedimiento para la preparación *in vitro* de la composición según la reivindicación 1, que comprende: a) aislar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> mediante un procedimiento inmunoselectivo a partir de leucocitos aislados que pueden obtenerse de un sujeto humano que ha sido sometido a la movilización de las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> en la sangre y el aislamiento de los leucocitos por aféresis; b) someter las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> de la etapa a) a un procedimiento de transducción con un gen de interés que codifica un agente anti-VIH en presencia de un agente que colocaliza las células con un vector de transducción; y c) determinar el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> tras la etapa b), y si el número total de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> tras la etapa b) es inferior a  $1,63 \times 10^6$  células por kg de peso corporal del sujeto humano, realizando de nuevo a continuación las etapas a) y b) y combinar las células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>.
- 35 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el agente anti-VIH es una ribozima codificada por nucleótidos de ADN que presentan la secuencia 5'-TTA GGA TCC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACT GGC TC-3'.
- 40 16. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el agente que colocaliza las células con el constructo viral es un fragmento de fibronectina.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el fragmento de fibronectina es el fragmento de fibronectina recombinante CH-296.

**FIGURA 1A**

**Ciclo de replicación retroviral**

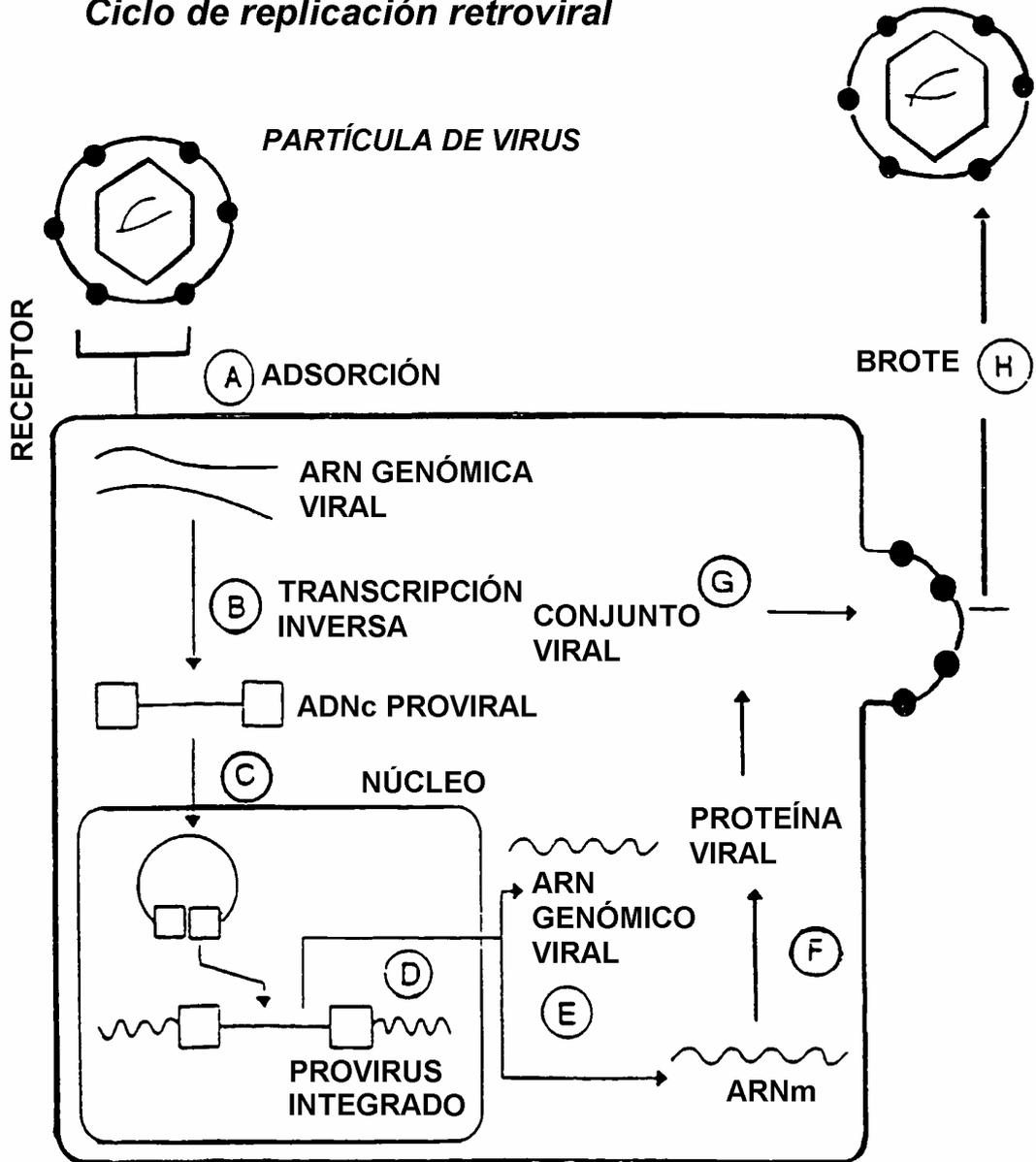
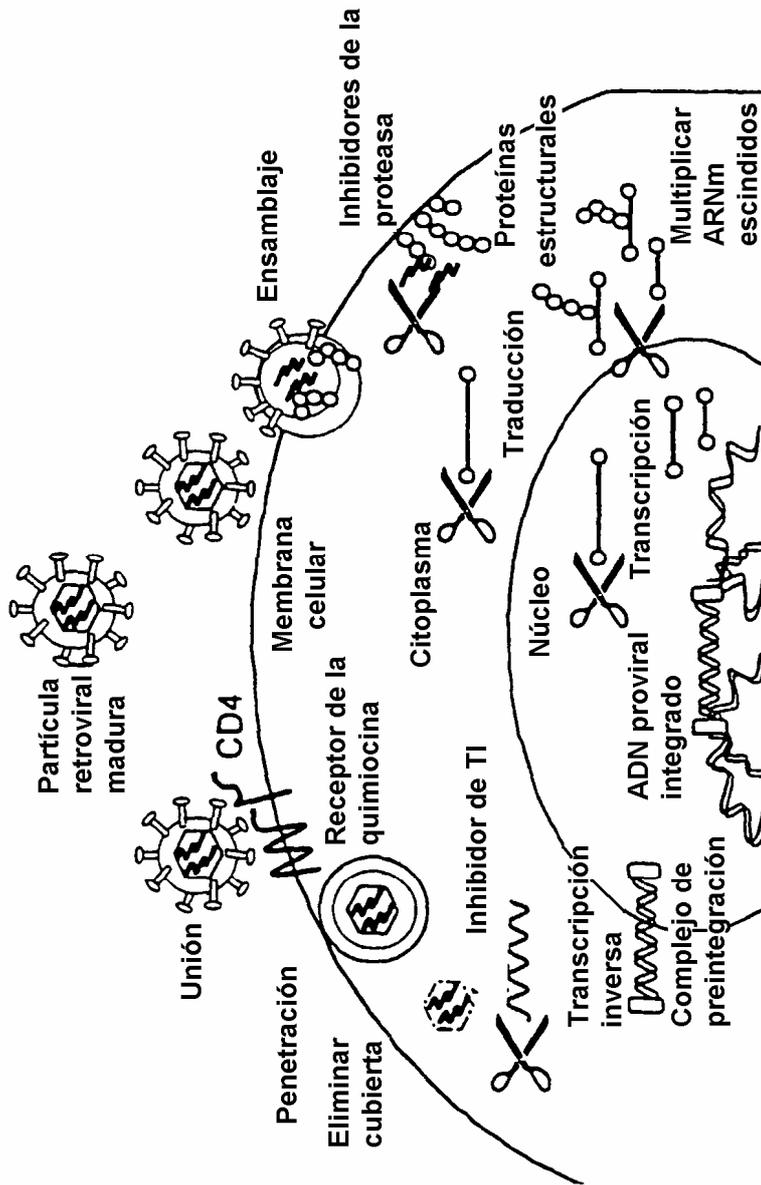


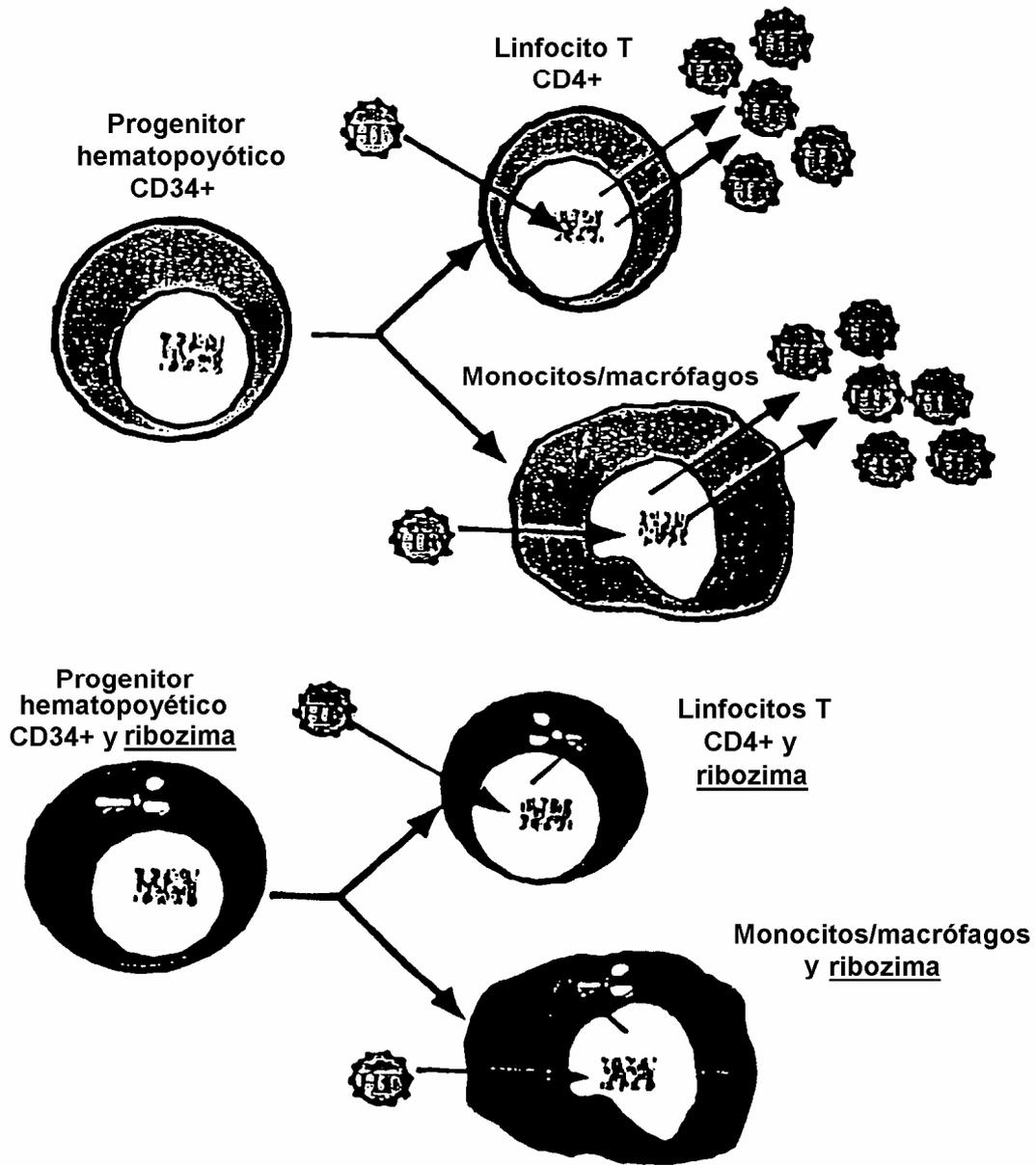
FIGURA 1B



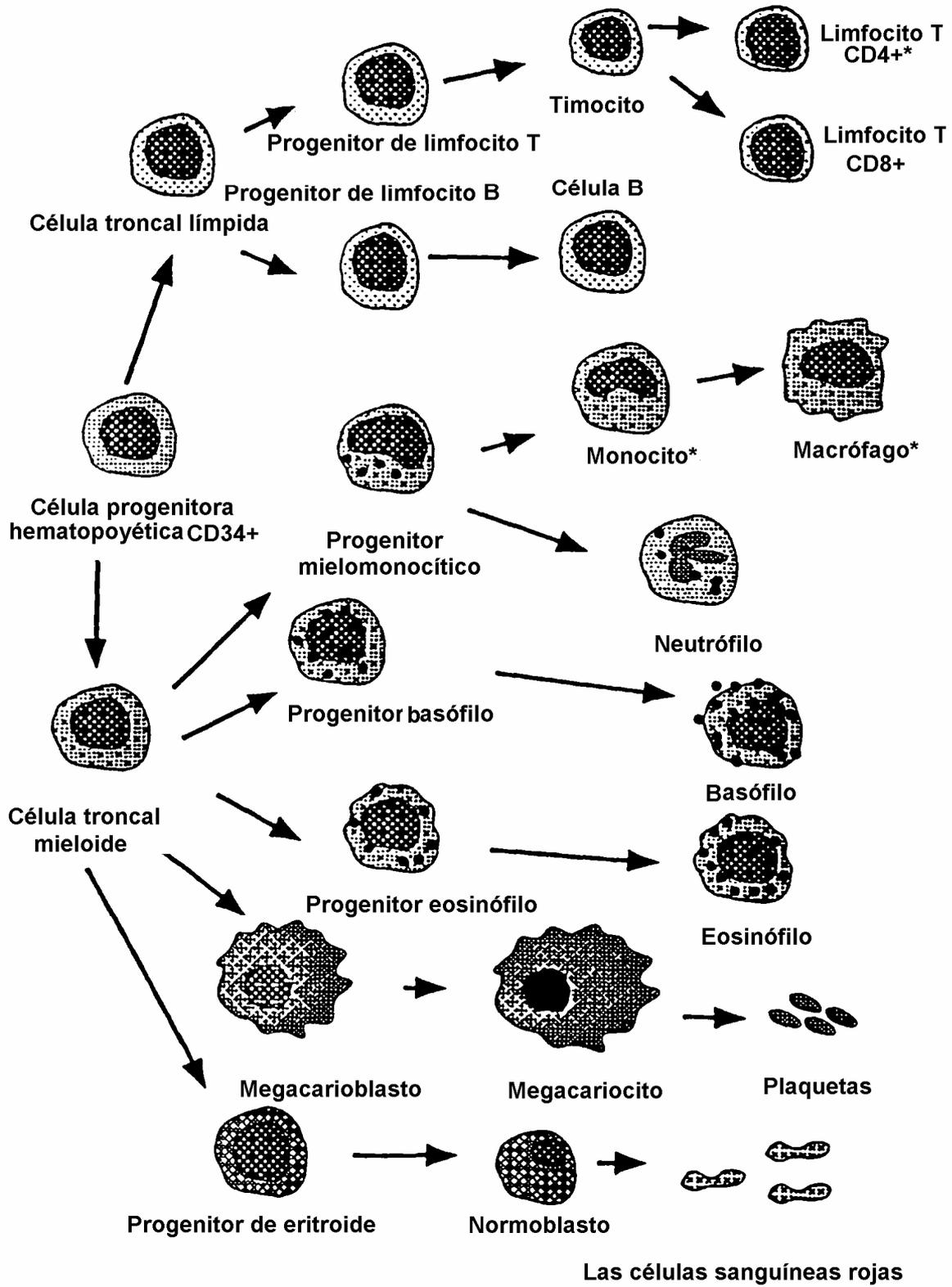
✂ Ribozoma

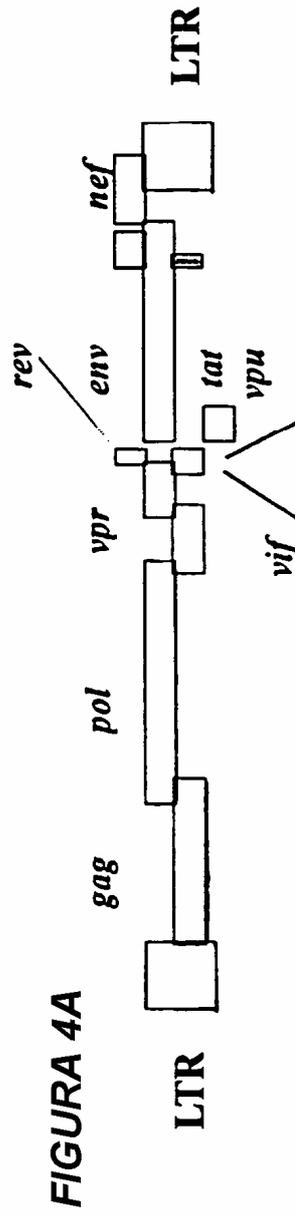
- Escisión de la región *tat* *in vitro*
- Expresión de ribozima sostenida en los tipos celulares relevantes
- Inhibición de la replicación del VIH
- Viabilidad celular mejorada *in vitro*
- Sin desarrollo de resistencia

**Figura 2**

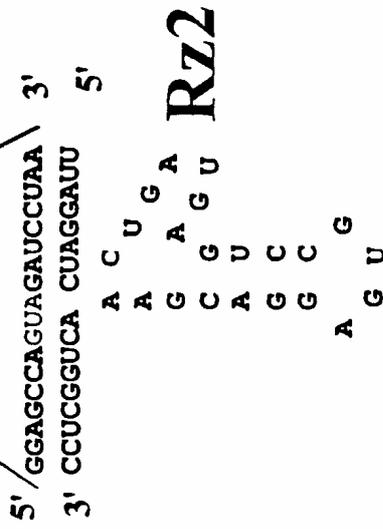


**FIGURA 3**





**FIGURA 4B**



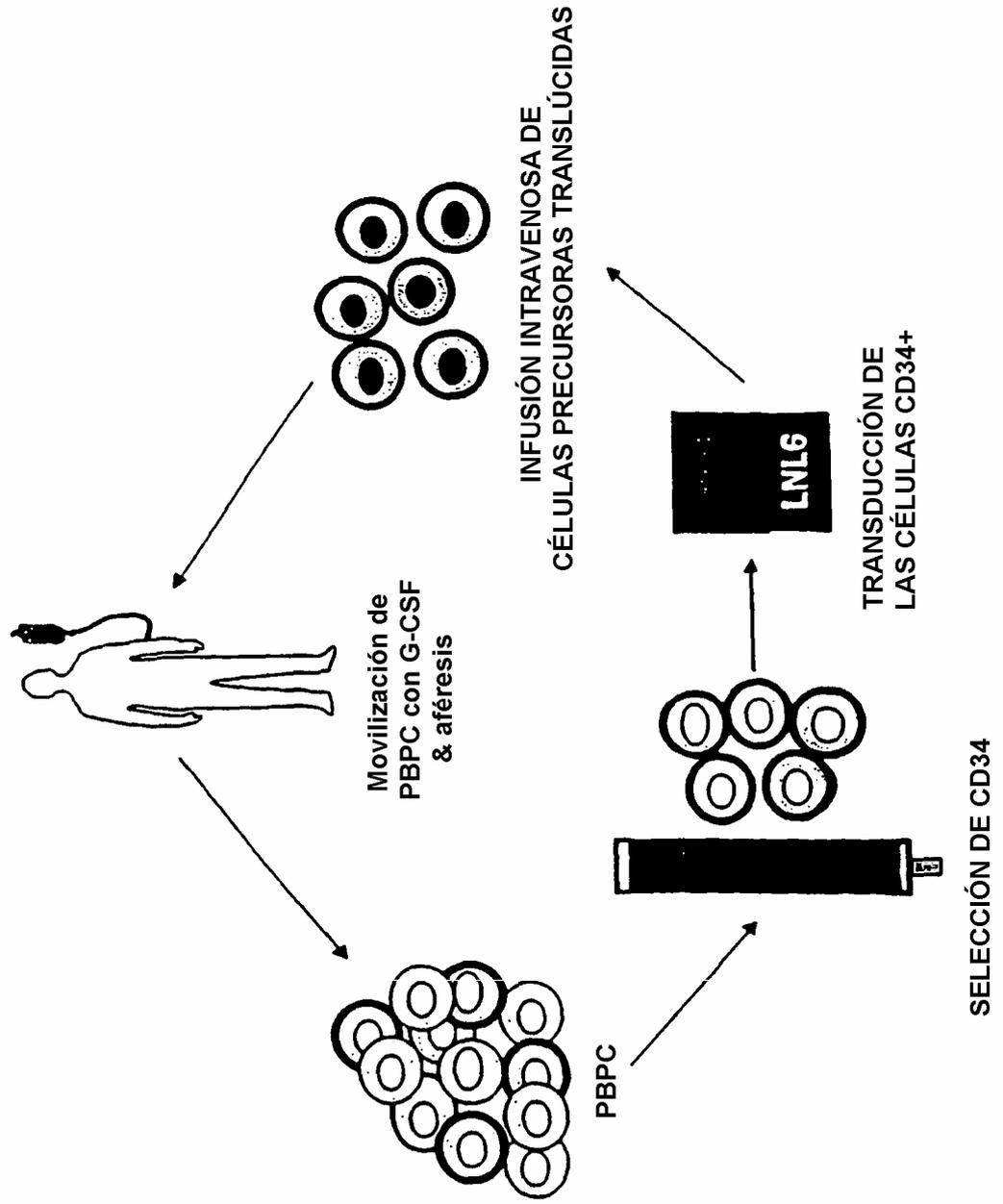
**FIGURA 4C**

|            | Asn | Gly | Ala | Ser | Arg | Ser | STOP |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| <b>Vpr</b> | AAU | GGA | GCC | AGU | AGA | UCC | UAA  |

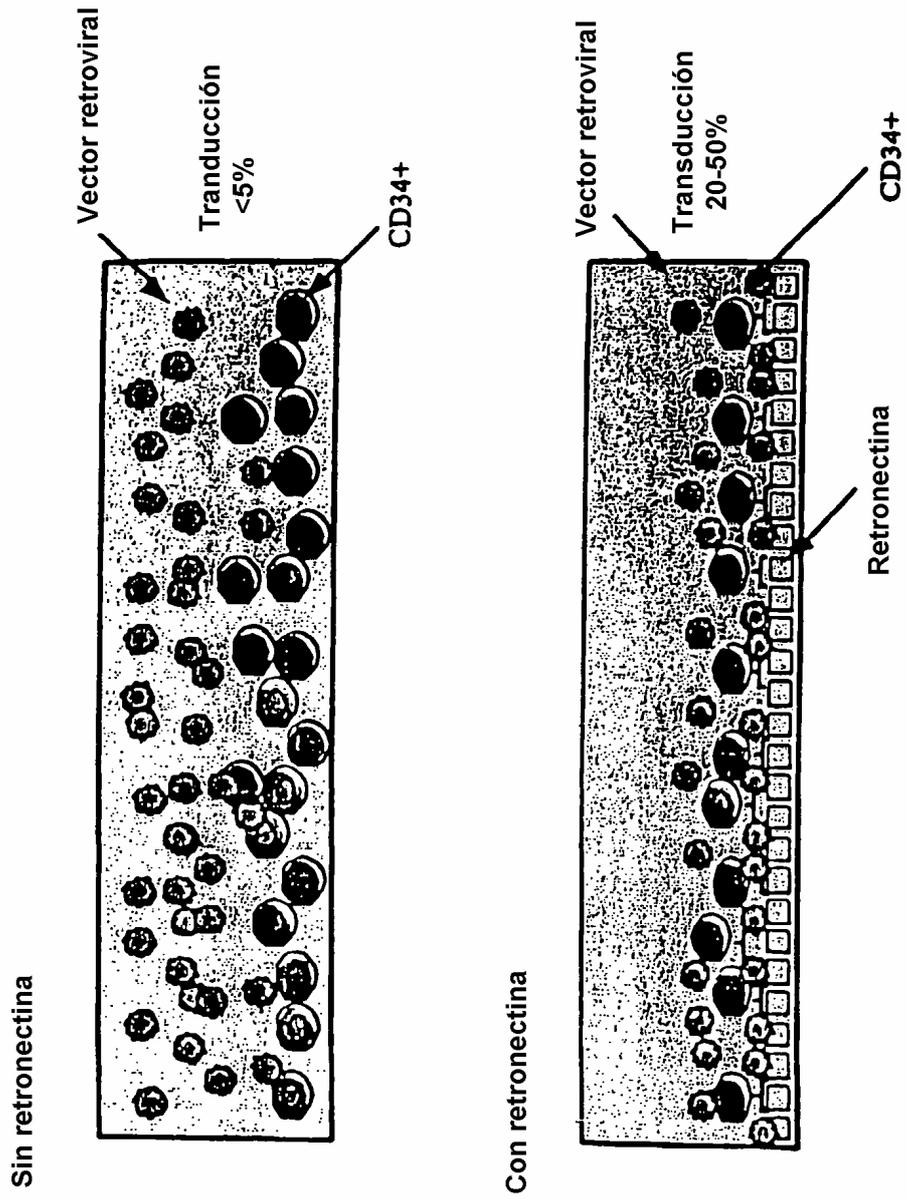
  

| Met | Glu | Pro | Val | Asp | Pro |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AUG | GAG | CCA | GUA | GAU | CCU |

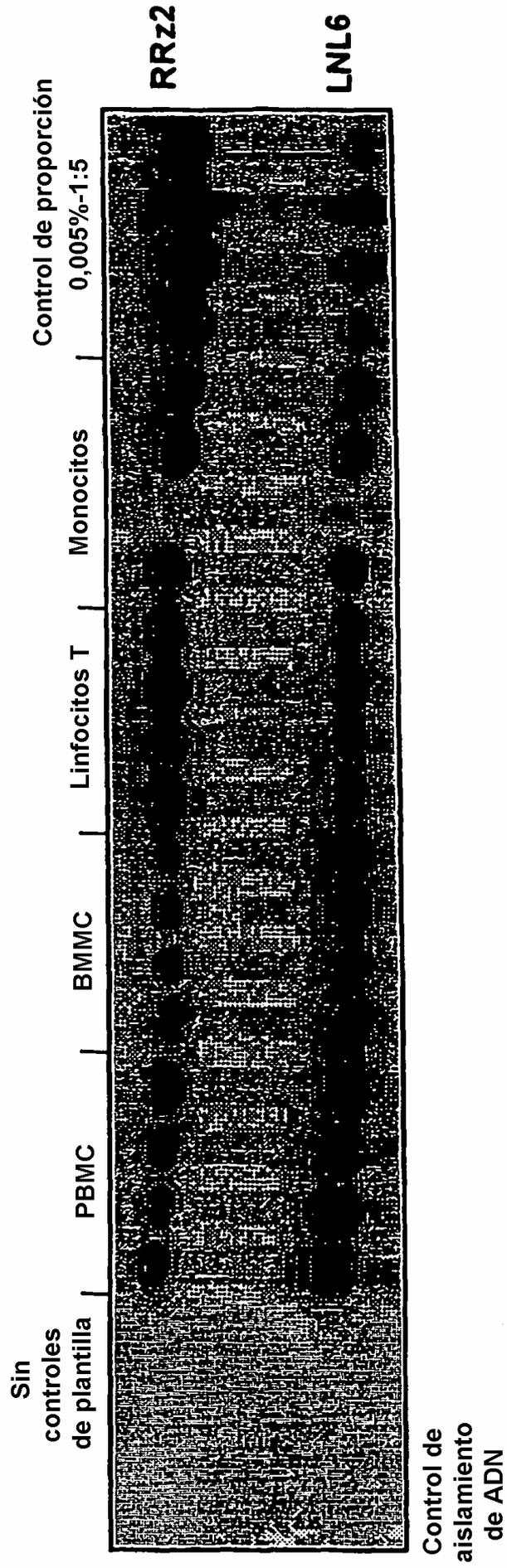
**FIGURA 5**



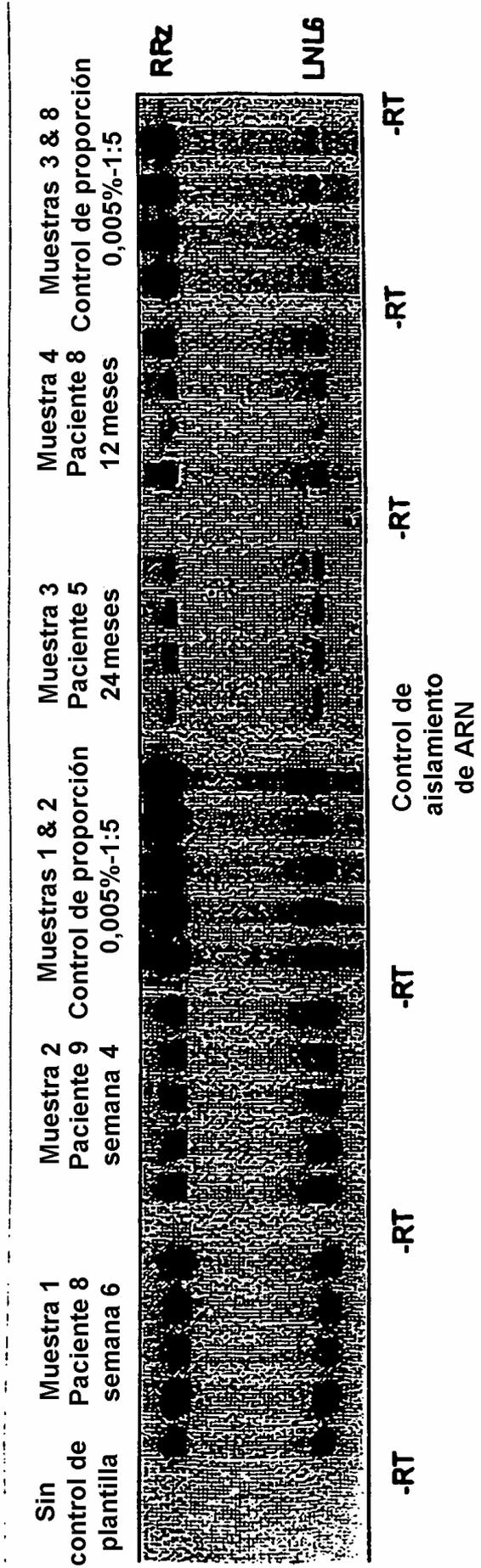
**FIGURA 6**



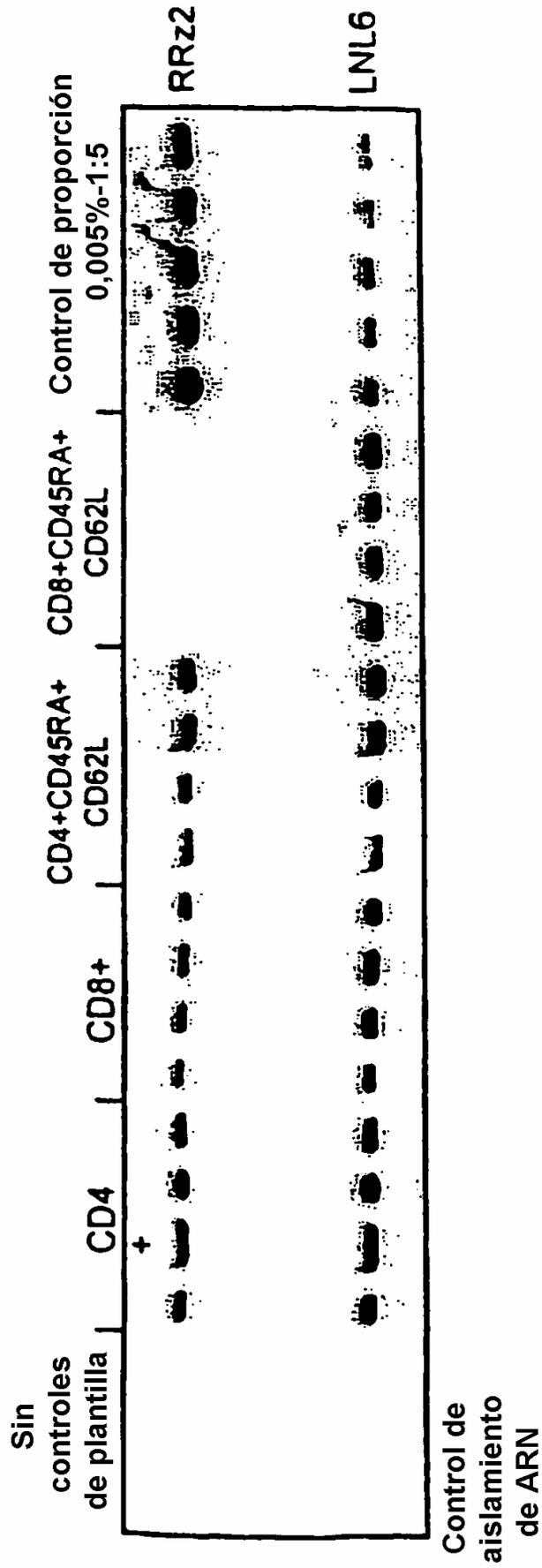
**FIGURA 7A**



**FIGURA 7B**



**FIGURA 7C**



**FIGURA 7D**

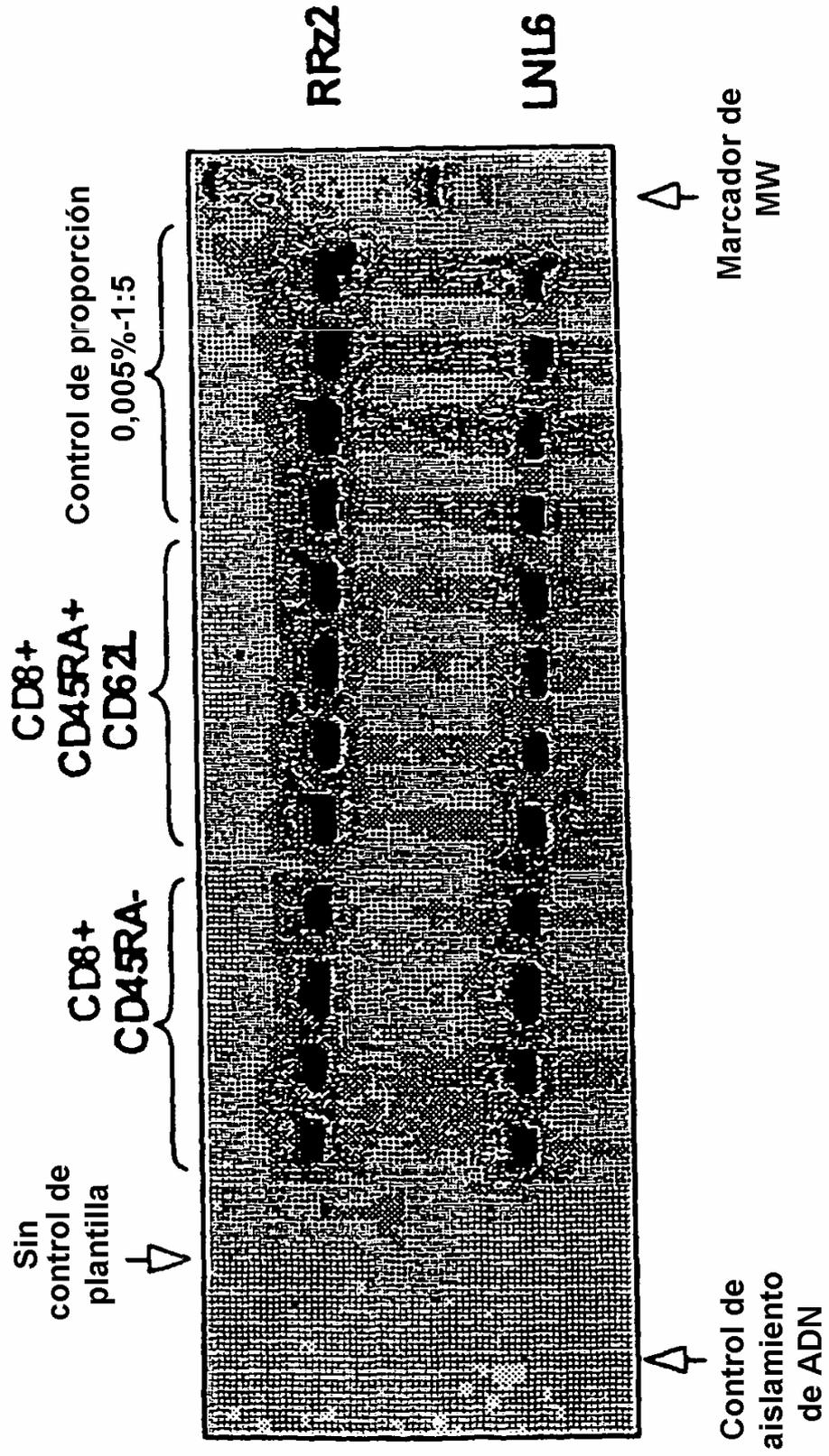
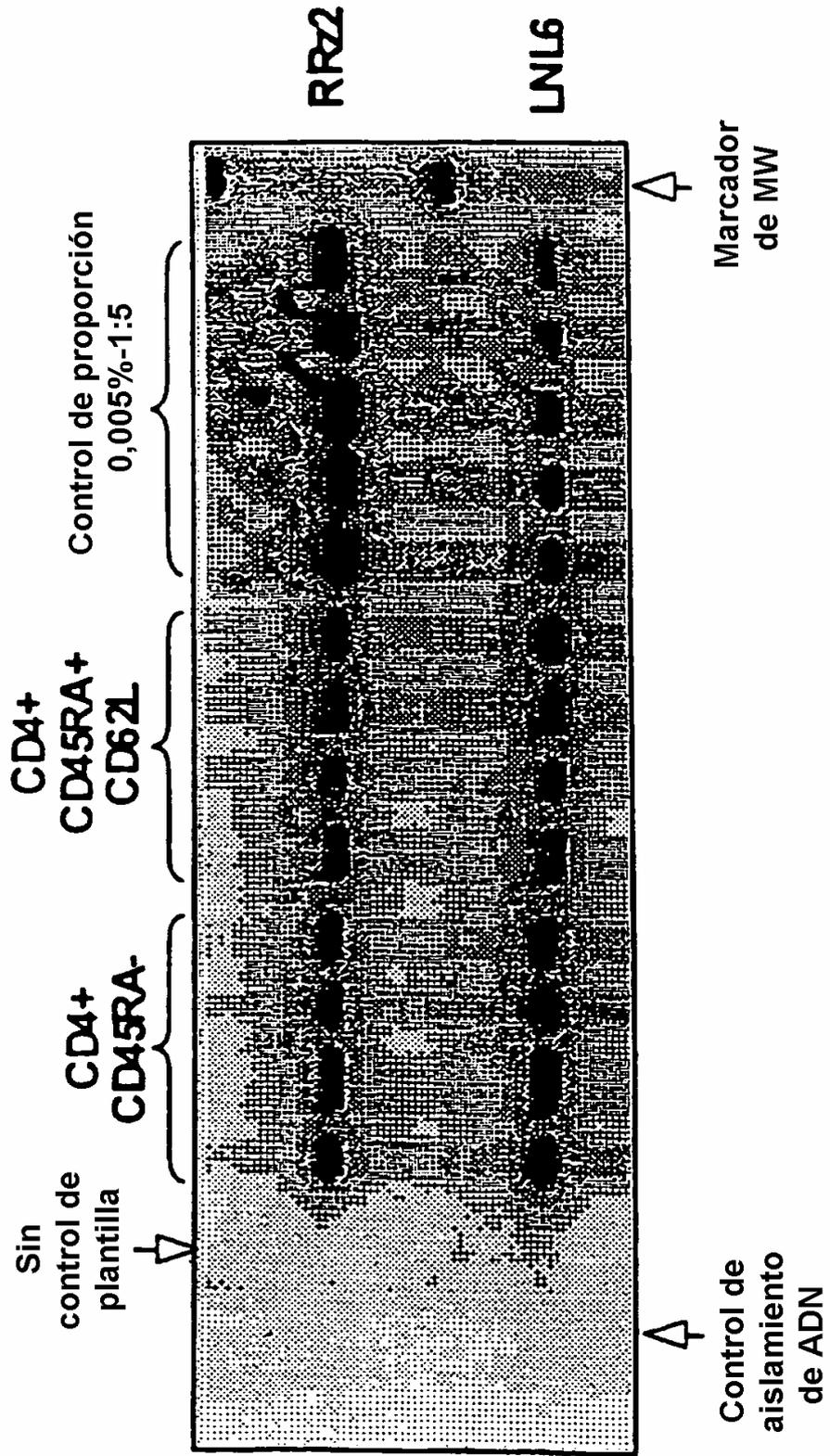


FIGURA 7E



**FIGURA 7F**

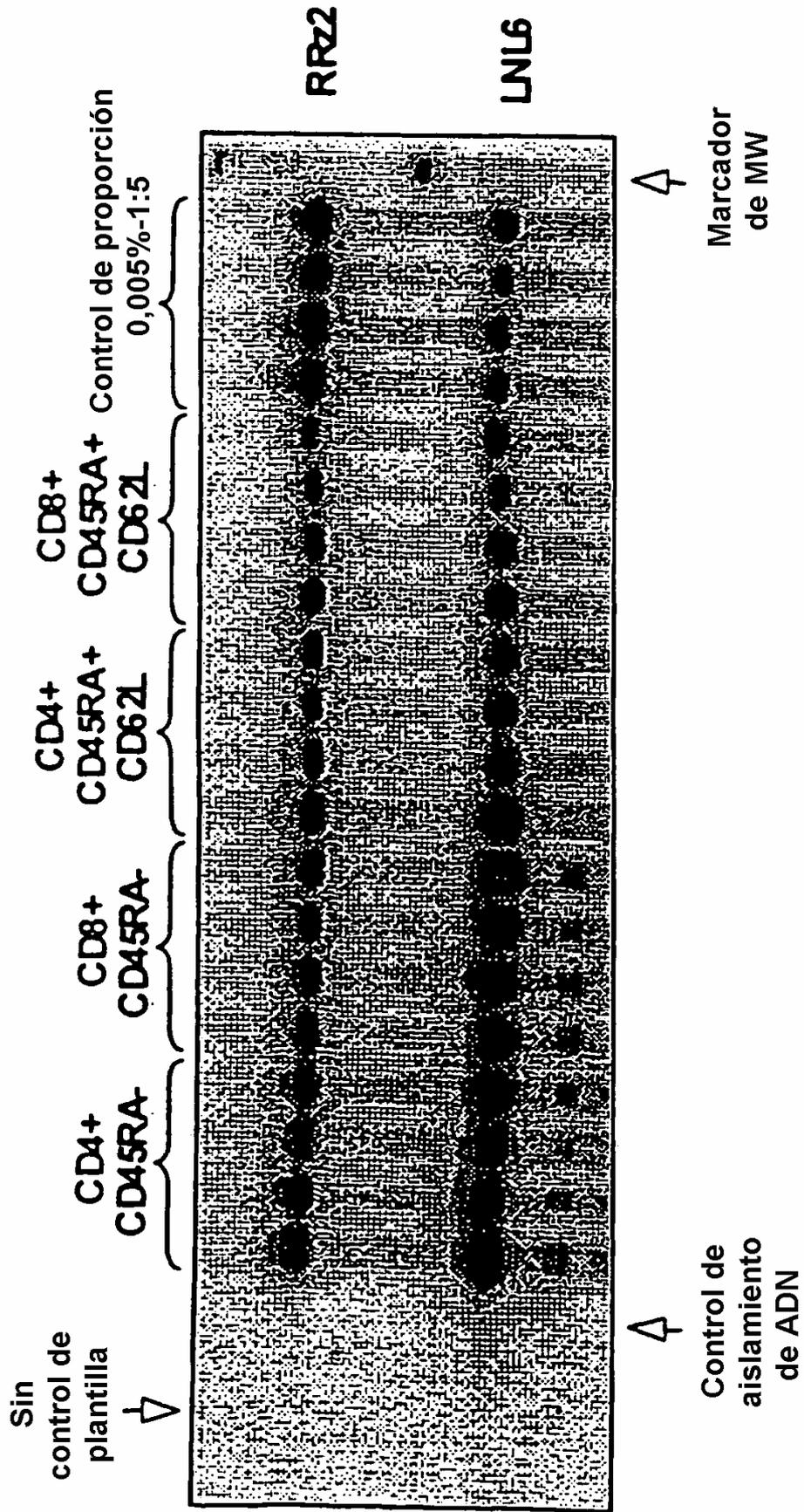
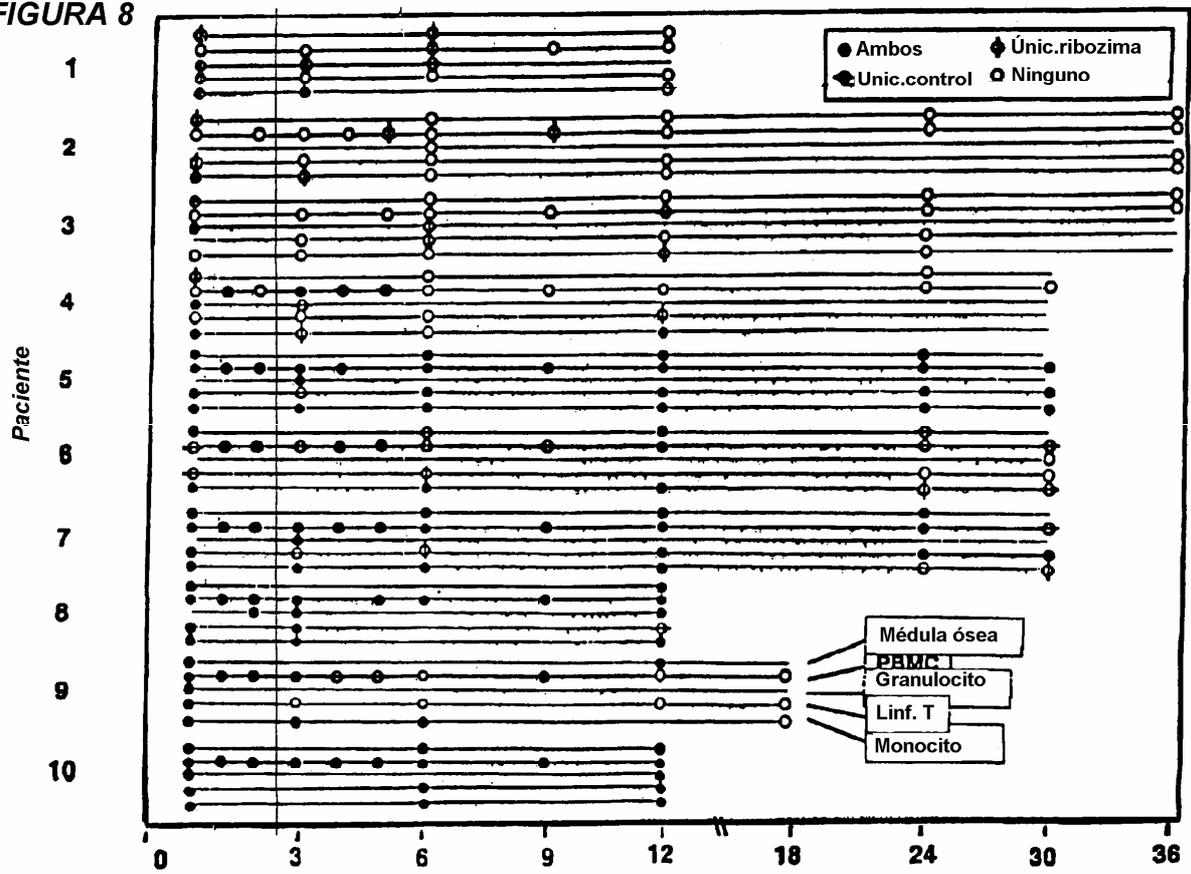
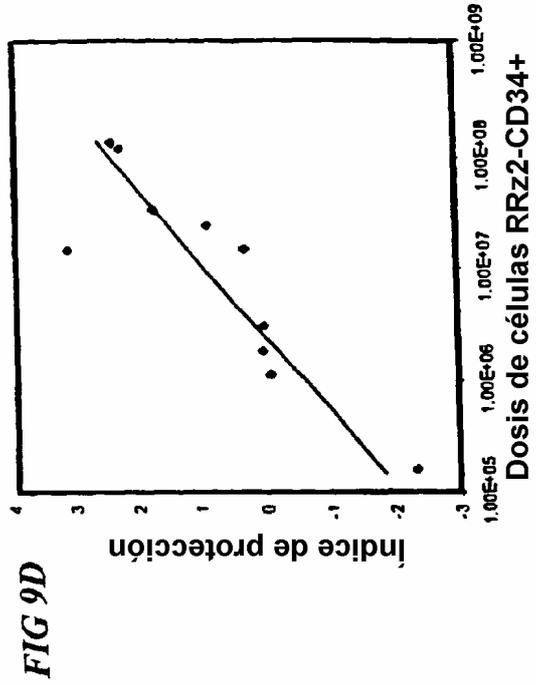
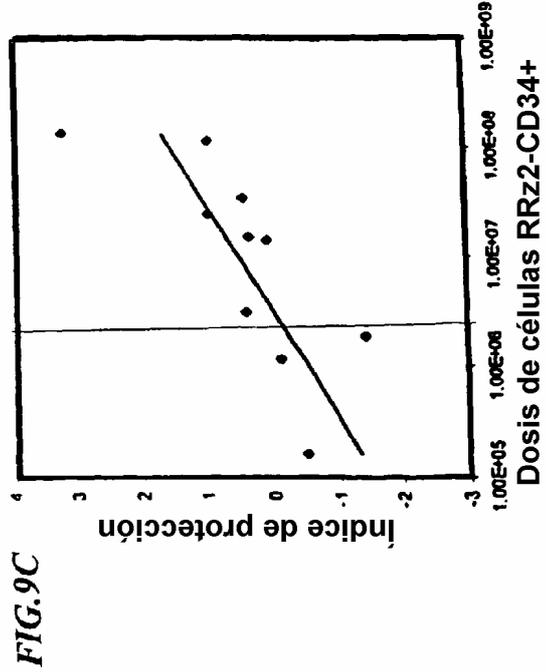
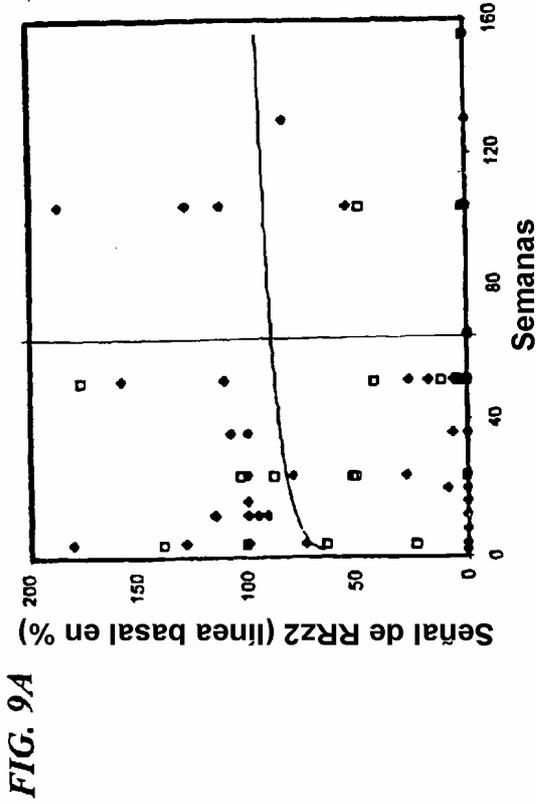
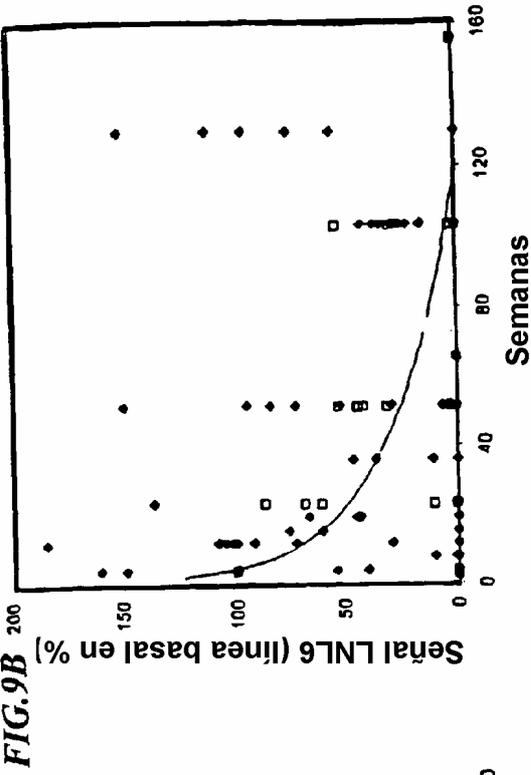
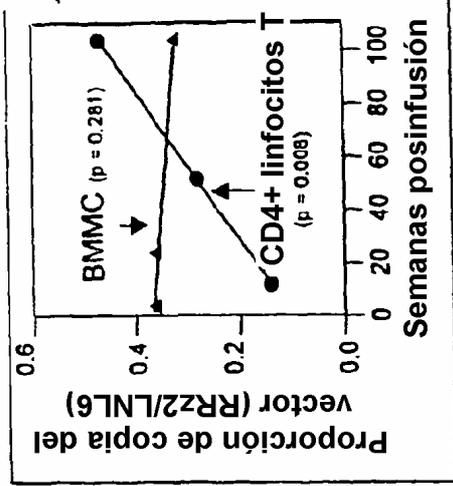


FIGURA 8



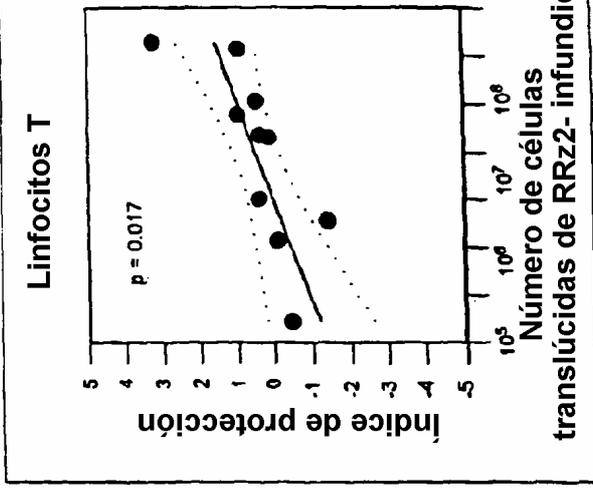


**FIG. 9F**

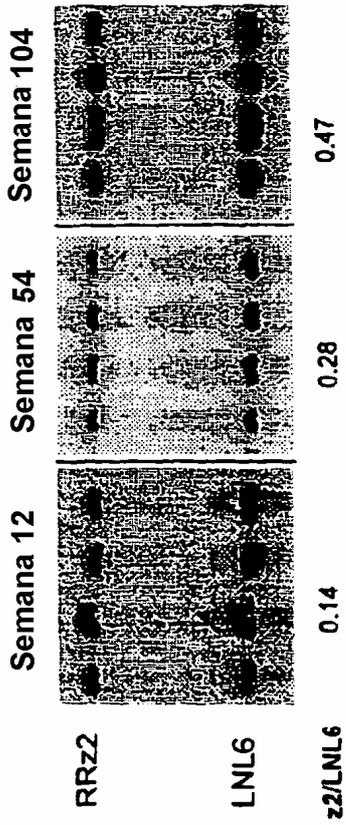


(H)

**FIG. 9H**



**FIG. 9E**



**FIG. 9G**

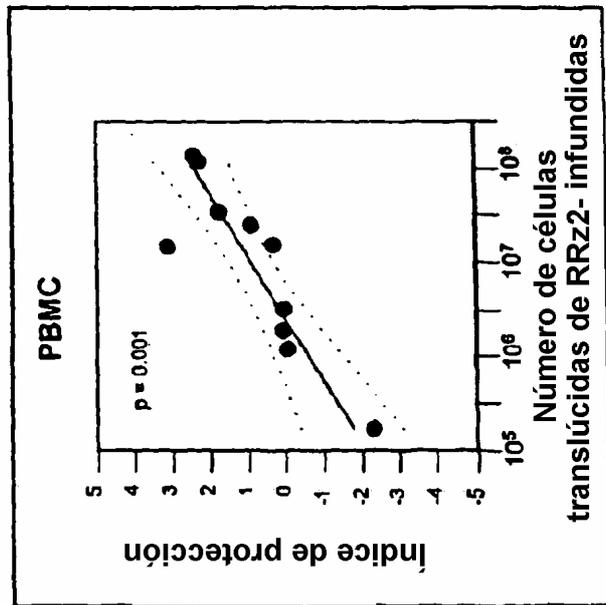


FIGURA 10A

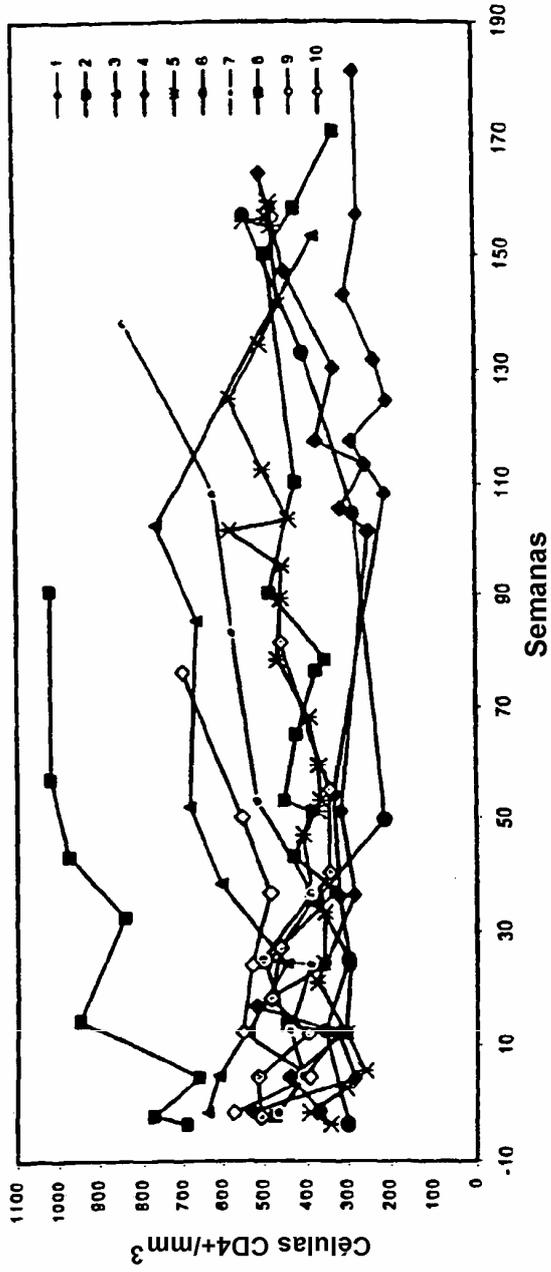
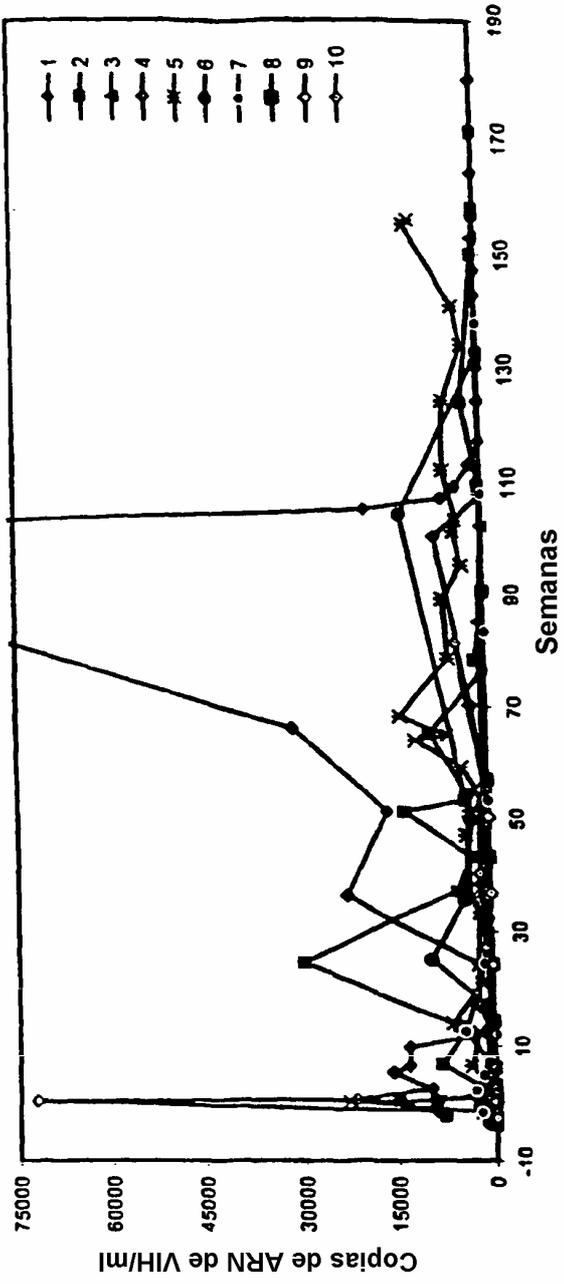
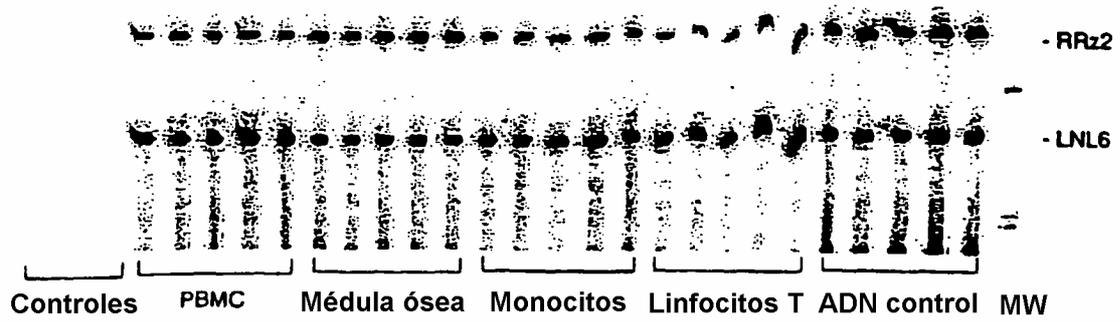


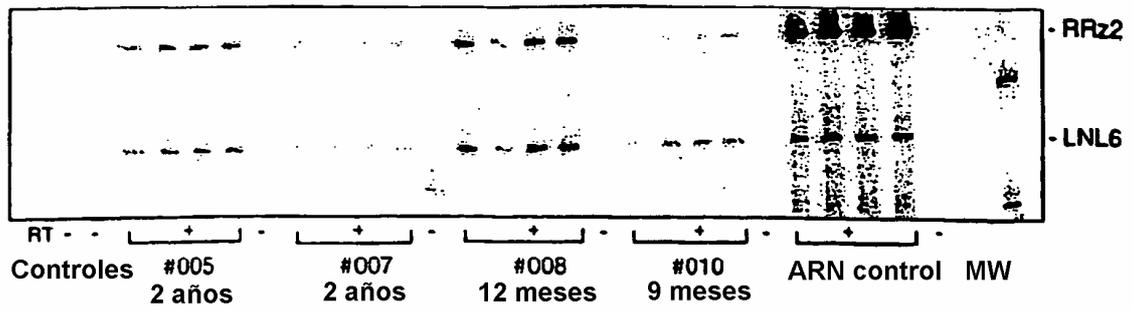
FIGURA 10B



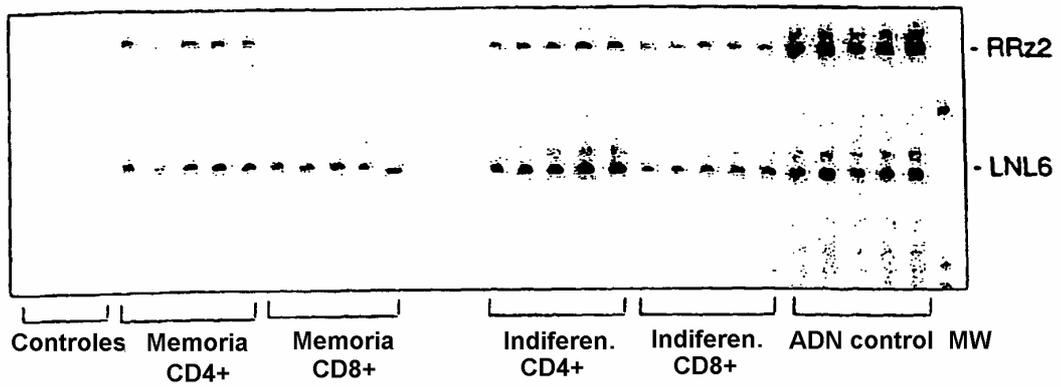
**FIGURA 11**



**FIGURA 12**



**FIGURA 13**



**FIGURA 14**

Construeto de ARNi de autoescisión con capacidad de direccionamiento múltiple

