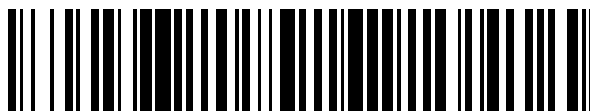


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 028**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2002 E 10185464 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2359868**

54 Título: **Vector que codifica el gen de la globulina humana y uso del mismo en el tratamiento de hemoglobinopatías**

30 Prioridad:

29.06.2001 US 301861 P

02.07.2001 US 302852 P

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

08.09.2016

73 Titular/es:

**SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER
RESEARCH (100.0%)
1275 York Avenue
New York, New York 10021, US**

72 Inventor/es:

**SADELAIN, MICHEL;
MAY, CHAD;
BERTINO, JOSEPH y
RIVELLA, STEFANO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 582 028 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

Vector que codifica el gen de la globulina humana y uso del mismo en el tratamiento de hemoglobinopatías

5 **Antecedentes de la invención**

Esta solicitud se refiere a un vector que comprende un gen de globina de mamífero, particularmente de ser humano, y al uso del mismo en el tratamiento de hemoglobinopatías, incluyendo la α - y β -talasemia y la anemia de células falciformes.

10 Las modalidades de tratamiento actuales para las β -talasemias consisten en la transfusión de glóbulos rojos más quelación del hierro (que prolonga la supervivencia, pero es una terapia molesta, costosa e imperfecta), o trasplante alogénico de médula ósea (que conlleva un riesgo letal y no está disponible para la mayoría de los pacientes). Por lo tanto, existe una necesidad sustancial de mejorar las estrategias terapéuticas. La presente invención proporciona una corrección genética en células madre hematopoyéticas autólogas, utilizando de este modo terapia génica para proporcionar un tratamiento a largo plazo menos arriesgado y más eficaz.

Walsh et al. describen un vector de virus adenoasociado que comprende el gen de la gamma-globulina humana unido operativamente al sitio 2 hipersensible a DNasa I (HS2) desde la región de control del locus del clúster de la beta-globina (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:7257-7261(1992)).

May et al. describen un vector lentiviral recombinante que comprende un gen de β -globina humana y una región de control del locus de la β -globina con un fragmento de HS2 de 840 pb, un fragmento de HS3 de 1.308 pb y un fragmento de HS4 de 1.069 pb (Nature 406:82-86 (2000)).

25 Gatlin et al. describen la selección *in vitro* de células CD34⁺ humanas transducidas al vector lentivirus usando un vector que expresa el gen de resistencia a DHFR_{L22Y}.

Mientras que la terapia génica se ha propuesto durante muchos años, un reto significativo al que se enfrentan los esfuerzos para desarrollar vectores de terapia génica es la capacidad de producir niveles terapéuticamente útiles de una proteína o péptido deseado. La presente invención proporciona un vector que es capaz de proporcionar niveles terapéuticamente significativos de globina humana durante períodos prolongados de tiempo. Esta capacidad se debe a la capacidad de transmitir secuencias reguladoras genómicas grandes que controlan la expresión del gen terapéutico.

35 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra la estructura genómica de un vector oncorRetroviral recombinante.

40 La figura 2 muestra la estructura genómica de un vector oncorRetroviral recombinante.

La figura 3 muestra los resultados experimentales que demuestran un aumento de la expresión media de la β -globina en células MEL transducidas.

45 La figura 4 muestra el número promedio de copias del vector en células de sangre periférica, medido periódicamente durante 24 semanas, lo que confirma la transferencia de genes altamente eficiente en las células transducidas.

50 Las figuras 5A y B muestran la expresión de β -globina humana por alelo endógeno 12 días y 22 semanas después de la introducción de las células transducidas.

La figura 6 muestra el nivel de hematocrito, el recuento de glóbulos rojos, el recuento de reticulocitos y el nivel de hemoglobina quince semanas después del trasplante con médula ósea Hbb^{th3/+} transducida con TNS9 no seleccionada.

55 **Descripción detallada de la invención**

La invención se refiere a un lentivirus recombinante como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, a una célula transducida con este vector como se describe en la reivindicación 9, al uso de esta célula y el vector en la preparación de medicamentos como se describe en las reivindicaciones 10 a 14, y a un método para la fabricación de una composición terapéutica como se describe en la reivindicación 15.

65 Por incorporación de diferentes genes de globina, el vector de la invención puede usarse en el tratamiento de hemoglobinopatías, incluyendo la α - y β -talasemia y la anemia de células falciformes. Por ejemplo, las células progenitoras o madre hematopoyéticas pueden ser transformadas *ex vivo* y luego reintroducirse en el paciente. Los procesos de selección se pueden utilizar para aumentar el porcentaje de células transformadas en la población

retornada. Por ejemplo, un marcador de selección que hace que las células transformadas sean más resistentes a los medicamentos que las células no transformadas permite la selección mediante el tratamiento de las células con el fármaco correspondiente. La selección y/o el enriquecimiento también pueden llevarse a cabo *in vivo*, por ejemplo usando metotrexato o antifolatos similares para seleccionar las células que se han hecho resistentes mediante la expresión del vector de una dihidrofolato reductasa (DHFR).

En el presente documento también se divulga un vector lentiviral recombinante, que comprende:

(a) una región que comprende un gen de globina funcional; y

(b) porciones grandes de las regiones control del locus de la β -globina, que incluyen los sitios hipersensibles a DNasa I HS2, HS3 y HS4, o porciones grandes de estos sitios. Las regiones pueden ser el sitio completo o algún sitio menor que proporciona la misma funcionalidad que las secuencias específicas que se exponen a continuación. Este vector proporciona la expresión de la β -globina cuando se introduce en un mamífero, por ejemplo un ser humano, *in vivo*. Opcionalmente, el vector comprende además una región que codifica una dihidrofolato reductasa.

Tal como se utiliza en la memoria y las reivindicaciones de la misma, la expresión "vector lentiviral recombinante" se refiere a un vector de polinucleótido creado artificialmente ensamblado a partir de un vector lentiviral y una pluralidad de segmentos adicionales como resultado de la intervención y la manipulación humana.

La expresión "gen de globina funcional" se refiere a una secuencia de nucleótidos cuya expresión conduce a una globina que no produce un fenotipo de hemoglobinopatía y que es eficaz para proporcionar beneficios terapéuticos a un individuo con un gen de globina defectuoso. El gen de la globina funcional puede codificar una globina de tipo silvestre adecuada para tratar a un individuo mamífero o puede ser una forma mutante de globina, de preferencia una que proporcione propiedades superiores, por ejemplo, propiedades de transporte de oxígeno superiores. El gen de la globina funcional incluye exones e intrones, así como promotores de la globina y aceptores/donantes de corte y empalme. El gen de la globina codifica γ -globina. Los promotores de β -globina se utilizan con el gen de la globina.

Los vectores recombinantes de la invención también incluyen grandes porciones de la región de control del locus (LCR), que incluyen los sitios hipersensibles a DNasa I HS2, HS3 y HS4. En estudios previos, se han utilizado fragmentos de nucleótidos más pequeños que abarcan las porciones del núcleo de HS2, HS3 y HS4. Sadelain et al. Proc. Nat'l Acad Sci. (USA)92: 6728-6732 (1995); Lebouich et al., EMBO J. 13: 3065-3076 (1994). La expresión "porciones grandes" se refiere a porciones de la región de control del locus que abarcan porciones más grandes de los sitios hipersensibles frente a los fragmentos previamente analizados que incluyen solo los elementos del núcleo. Las regiones pueden ser el sitio completo o algún sitio menor que proporciona la misma funcionalidad que las secuencias específicas que se exponen a continuación. En realizaciones preferidas de la invención, las porciones grandes de las regiones de control de locus se ensamblan a partir de múltiples fragmentos, abarcando cada uno los sitios hipersensibles a DNasa I. Además, la región de control del locus tiene dos sitios de unión a GATA-1 introducidos en la unión entre HS3 y HS4. Aunque sin pretender quedar ligado a ningún mecanismo específico, se cree que la incorporación de estos sitios de unión al factor de transcripción aumenta la eficacia del vector.

La estructura genómica de un vector de ejemplo (TNS9) se muestra en la Figura 1. A pesar de que este vector de ejemplo no es un vector de acuerdo con la invención, sigue ilustrando la estructura del vector de acuerdo con la invención. El TNS9 incorpora el gen de la β -globina humana (de la posición -618 a +2484) que incluye una secuencia de promotora extendida y un elemento potenciador en 3'. Opcionalmente, una parte de la región U3 en 3' de la estructura básica lentiviral se puede eliminar para aumentar la seguridad. En la figura 1, los exones e intrones del gen de la γ -globina humana están representados por recuadros llenos y abiertos, las localizaciones se indican para el donante de corte y empalme (SD), el aceptor de corte y empalme (SA), una región de empaquetamiento (ψ), el elemento de respuesta a rev (RRE), el promotor de la β -globina humana (P) y el potenciador de la 3'- β -globina (E). Así, en el vector TNS9, un gen de la β -globina funcional, que incluye tanto los exones como los intrones del gen y las secuencias de control relevantes del locus de la β -globina humana. Estos se combinan con los fragmentos grandes de la región de control del locus. La LCR de 3,2 kb ensamblada en el dTNS9 consiste en un fragmento de HS2 de 840 pb (*SnaBI-BstXI*), un fragmento de HS3 de 1.308 pb (*HindIII-BamHI*) un fragmento de HS4 de 1.069 pb (*BamHI-BanII*).

En un aspecto de la invención, la secuencia de codificación del gen de la β -globina se intercambia y se reemplaza por el gen de la gamma globina (para la enfermedad de la anemia de células falciformes). En una estrategia, un fragmento de NcoI-PstI del gen de la β -globina es sustituido por el correspondiente fragmento de NcoI-HindIII del gen de la gamma globina. En el presente documento también se divulga el intercambio y la sustitución de la secuencia de codificación del gen de la β -globina con el gen de la alfa globina (para las alfa-talasemias). Por ejemplo, un fragmento de NcoI-PstI del gen de la β -globina se sustituye por el fragmento de NcoI-PstI del gen de la alfa globina humana. Estos fragmentos comienzan en el de la traducción de cada gen de globina (que abarca el sitio NcoI) y terminan más allá de sus respectivas señales de poliadenilación.

En la segunda estrategia, los genes quiméricos pueden generarse únicamente intercambiando la secuencia de codificación de cada uno de los tres exones de estos genes. Por lo tanto, para el gen de la gamma globina, el resultado es un vector que comprende el promotor de la beta globina, la región no traducida en 5' de la beta globina, la región de codificación del exón 1 gamma, el intrón 1 gamma y el exón 2 gamma, el intrón 2 beta, el exón 3 gamma, y la región no traducida en 3' de la beta globina. Por tanto, todos los elementos del vector TNS9 permanecen en su lugar (promotor, potenciadores, regiones no traducidas en 5' en 3', los elementos LCR, los 2 sitios de unión a GATA-1 adicionales y los intrones del gen de la beta globina (por lo menos el intrón 2, que es el más importante). En una tercera estrategia, el uso de codones dentro del exón 3 del gen de la gamma globina se puede modificar, de modo que su secuencia se asemejará lo más posible a la del gen de la beta globina. La razón de analizar esto es que el gen de la beta globina es siempre el que mejor se expresa.

Se pueden incluir elementos adicionales en los vectores de la invención para facilitar la utilización del vector en la terapia. Por ejemplo, el vector puede incluir marcadores seleccionables, para confirmar la expresión del vector o para proporcionar una base para la selección de células transformadas frente a células no transformadas, o marcadores de control que permiten la alteración dirigida de las células transformadas, y, por lo tanto, la eliminación selectiva de dichas células si fuera necesaria la interrupción del tratamiento.

En una realización específica adicional, el vector de la invención incluye el promotor PGK de ratón y el ADNc de la dihidrofolato reductasa humana (DHFR) como una unidad transcripcional. Adecuadamente se usan formas mutantes de la DHFR que aumentan la capacidad de la DHFR para conferir resistencia a fármacos tales como el metotrexato. Por ejemplo, ventajosamente se pueden usar mutantes individuales y dobles de la DHFR con mutaciones en los aminoácidos 22 y 31 como se describe en la publicación de PCT asignada n.º WO 97/33988, que se incorpora en el presente documento por referencia.

La figura 2 muestra la estructura genómica del vector específico. A pesar de que este vector de ejemplo no es un vector de acuerdo con la invención, sigue ilustrando la estructura del vector de acuerdo con la invención. El vector incluye una LTR delecionada, de -456 a -9 de la LTR del VIH y el promotor de PGK (530 pb) del gen de la fosfoglicerato quinasa 1 murina. También incluye una región de codificación de la DHFR que codifica la DHFR humana con la mutación s/f en el aminoácido 22. La región de control del locus y la región de la β -globina son las mismas que en TNS9. Este vector se designa dTNS9-PD. Esta incorporación de DHFR en este vector proporciona células transformadas con un fenotipo de resistencia a metotrexato. Como resultado, se pueden usar metotrexato y otros antifolatos, tanto *in vitro* como *in vivo* como una herramienta de selección para mejorar los niveles de la hemoglobina funcional. Cuando las células madre hematopoyéticas se transformaron usando dTNS9-PD y se reintrodujeron en ratones que se trataron después con NMBPR-P (0,5 mg/dosis) y TMTX (dosis de 0,5 mg) durante cinco días, los niveles observados de la β -globina humana fueron mucho más altos en los ratones transducidos con los vectores dTNS9-PD después del tratamiento con TMTX y NMBPR-P para la selección de células transducidas.

Los vectores de la invención se usan en la terapia para el tratamiento de individuos que sufren hemoglobinopatías. En una realización de la invención, las células progenitoras hematopoyéticas de células madre para restaurar al paciente se transforman *ex vivo*. Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones de la misma, la expresión "células progenitoras hematopoyéticas y madre" abarca las células hematopoyéticas y las células madre no hematopoyéticas, por ejemplo, las células madre embrionarias, los precursores de las células madre hematopoyéticas, con la condición de que dichas células no procedan de un embrión humano. En la técnica se sabe que la transferencia de genes eficiente en células madre embrionarias humanos se puede lograr usando vectores de lentivirus.

Los procesos de selección se pueden utilizar para aumentar el porcentaje de células transformadas en la población retornada. Por ejemplo, un marcador de selección que hace que las células transformadas sean más resistentes a los medicamentos que las células no transformadas permite la selección mediante el tratamiento de las células con el fármaco correspondiente. Cuando se utiliza DHFR como marcador de selección, se puede utilizar para el enriquecimiento de las células transducidas *in vitro*, o para la selección *in vivo* selección para mantener la eficacia del vector.

A continuación, la invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1 (Ejemplo de Referencia)

Para producir el vector TNS9, el gen de la β -globina humana se subclonó a partir de M β 6L (Sadelain et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)92: 6728–6732 (1995)) en el vector lentiviral pHR'LacZ (Zuffery et al., Nature 15: 871–875 (1997)) sustituyendo la secuencia de CMV–LacZ. El pHR'eGFP se construyó seleccionando LacZ por la secuencia de eGFP (Clontech). Las reservas virales se generaron mediante transfección triple de los vectores recombinantes pCMV Δ R8.9 (Zuffrey et al.) y PMD.G en las células 293T, como se ha descrito anteriormente en Dull, et al., J. Virol. 72: 8463–8471 (1998). Los viriones seudotipados se concentraron mediante ultracentrifugación, se resuspendieron y se titularon como se describe en Gallardo et al., Blood 90: 952–957 (1997). Para la comparación, se utilizó RSN1 que tiene una estructura similar, excepto que la LCR contiene solo la parte central de HS2, HS3 y HS4. El análisis de transferencia Northern mostró transcritos de ARN de longitud completa, lo que indica que los genomas lentivirales

recombinantes son estables. El análisis de transferencia Southern en el ADN genómico de células transducidas, digerido una vez en cada repetición terminal larga (LTR), da lugar a una única banda correspondiente al tamaño esperado para el vector, lo que indica que la estructura proviral no se reordena.

5 **Ejemplo 2** (Ejemplo de Referencia)

Para investigar la especificidad de tejido, la especificidad de etapa y el nivel de expresión del gen de la β -globina humana codificada en el vector, los inventores transdujeron RNS 1 y TNS9 en células MEL, células Jurkat linfoides y células HL-60 mieloides. Se utilizó el sobrenadante viral sin células para infectar las células C88 MEL en presencia de polibreno ($8 \mu\text{g ml}^{-1}$). Las células MEL transducidas se subclonaron mediante dilución limitante y se cribaron mediante PCR para la transducción³⁰ usando cebadores que hibridan en la secuencia del promotor de la β -globina humana (β iPS, 5'-GTCTAAGTGATGACAGCCGTACCTG-3') y en HS2 (C2A, 5'-TCAGCCTAGAGT GATGACTCC TATCTG-3'). El número de copias del vector y el análisis del sitio de integración se determinaron mediante análisis de transferencia Southern⁹. Se indujo la maduración de las células MEL transducidas mediante cultivo de 5 días en N, N'-hexametileno bisacetamida 5 mM (HMBA, Sigma).

Para inducir la transcripción de la β -globina, los conjuntos de células MEL transducidas se diferenciaron usando hexametileno bisacetamida HMBA). La β -globina humana (β^A) y los transcritos de la β -globina de ratón se midieron mediante la extensión cuantitativa del cebador. Después de la normalización con el número de copias del vector y con la expresión de β -globina endógena por alelo, los niveles de β -globina humana fueron $14,2 \pm 4,7\%$ para RNS1 y $71,3 \pm 2,3\%$ para TNS9 en células MEL combinadas (Figura 2a). Las células MEL, Jurkat y HL-60 se transdujeron con lentivirus recombinante RNS1, TNS9 o GFP control. La expresión del ARN de la β -globina humana en células MEL inducidas por HMBA (barras grises) se midieron mediante extensión cuantitativa del cebador y se normalizó con la expresión de la β -globina de ratón por locus. Después, la expresión se normalizó con el número de copias del vector determinado mediante transferencia Southern. No se detectó expresión de ARN de β -globina humana en células MEL no inducidas (barras negras), Jurkat (barras blancas) o HL-60 (barras rayadas), lo que indica que expresión de la globina era específica de eritroide y de diferenciación. No se detectó expresión de β -globina humana en células MEL, Jurkat y HL-60 no inducidas (Fig. 3), lo que indica que la expresión de β -globina humana estaba regulada adecuadamente en términos de especificidad de tejido y el estado de diferenciación. Los inventores generaron un panel de clones de células MEL portadores de una única copia de cualquier vector para distinguir si la expresión incrementada obtenida en células Mel tratadas con HMBA transducidas con TNS9 en lugar de RNS1 era el resultado de un incremento de la expresión de β^A por célula o de un incremento de la fracción de células que expresan la β -globina humana. Las células MEL transducidas se subclonaron mediante dilución límite inmediatamente después de la transducción, evitando cualquier sesgo hacia los sitios de integración cromosómica favorables, como lo producidos por la selección de medicamentos⁵. La proporción de clones que expresan β -globina humana varió significativamente entre los dos vectores. Uno de cada diez clones positivos para RNS1 produjo transcritos de β -globina humana mensurables, en contraste con 12 de 12 para TNS9 también expresaron niveles más altos de β -globina humana que aquellos que tienen RNS1 ($P < 0,01$, prueba exacta de Fisher). Las células portadoras de TNS9 también expresaron niveles más altos de β -globina humana que las portadoras de RNS1 cojinete ($P < 0,01$, prueba de la suma de rangos de Wilcoxon). Estos resultados establecen que tanto el nivel como la probabilidad de expresión en los sitios de integración aleatorios se incrementaron con el vector TNS9.

Ejemplo 3 (Ejemplo de Referencia)

45 **Cuantificación del ARNm de la β -globina humana**

El ARN total se extrajo de células MEL, Jurkat y HL-60, o de bazo y sangre de ratón usando TRIzol. Los ensayos de extensión cuantitativa con cebadores se realizaron usando el kit de transcriptasa inversa AMV-sistema de extensión con cebadores (Promega) con cebadores marcados en los extremos con [³²P] dATP específicos de β -globina humana derivada de retrovirus (5'-CAGTAACGGCAGACTTCTCCTC -3') y de la β -globina de ratón (5'-TGATGTCTGTTTCTGGGGTT GTG -3'), con los productos de extensión predichos de 90 pb y 53 pb, respectivamente. Las sondas dan productos de longitud idéntica para β^{maj} , β^{min} , β^{s} y β^{t} . Los cebadores se hibridaron a $4 \mu\text{g}$ de ARN y las reacciones se realizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las bandas radiactivas se cuantificaron mediante análisis Phosphorimager (BioRad). Como control positivo se utilizó ARN aislado de ratones A85.68²⁰. Después de la corrección para el marcaje de cebadores, el la señal de ARN de ser humano a ratón fue de $29 \pm 1\%$ por copia del gen en experimentos repetidos ($n > 8$), de acuerdo con resultados previos basados en RT-PCR²⁰. Los valores medidos en las quimeras de médula ósea obtenidas en ciclos separados se normalizaron con el valor obtenido en la muestra de ARN A85.68. En las figuras 2 y 3c, d, expresión de β -globina humana se expresa por cada copia del vector y se normalizó con los transcritos endógenos (que representan dos alelos endógenos). En la Figura 3b, los transcritos humanos se notifican como la fracción de ARN total de la β -globina ($\text{Hu}\beta/\text{Hu}\beta + \text{Mu}\beta$) para reflejar la contribución absoluta de los transcritos codificados en el vector.

Ejemplo 4 (Ejemplo de Referencia)

65 Para investigar la función de los vectores *in vivo*, los inventores transdujeron y trasplantaron células de médula ósea murina sin selección alguna en ratones singeneicos receptores irradiados letalmente. La médula ósea del donante

se extrajo de los fémures de ratones C57BL/6 o Hbb^{th/+} macho de 8 a 16 semanas de edad (Jackson Laboratories) a los que se había inyectado por vía intravenosa (i.v.) 6 días antes 5-fluorouracilo (5-FU, Pharmacia; 150 mg kg⁻¹ de peso corporal). Las células de la médula ósea se resuspendieron en medio sin suero y se suplementaron con IL-1 α (10 ng ml⁻¹), IL-3 (100 U ml⁻¹), IL-6 (150 U ml⁻¹), ligando de Kit (10 ng ml⁻¹) (Genzyme), β -mercaptoetanol (0,5 mM; Sigma), L-glutamina (200 mM), penicilina (100 UI ml⁻¹) y estreptomina (100 μ g ml⁻¹), y se cultivaron durante 18 horas. Los ratones receptores (ratones C57/BL6 o Hbb^{th3/+} de 11 a 14 semanas de edad) se irradiaron con 10,5 Gy (dosis dividida 2 x 5,25 Gy) el día de trasplante. Las células de médula ósea se sedimentaron y se resuspendieron en medio sin suero que contiene sobrenadante lentiviral concentrado y se suplementaron con polibreno (8 μ g ml⁻¹), L-glutamina (200 mM), penicilina (100 UI ml⁻¹) y estreptomina (100 μ g ml⁻¹) y se cultivaron durante 6 horas. A continuación, las células de médula ósea transducidas (1 x 10⁵ o 5 x 10⁵) se inyectaron i.v. en cada uno de los receptores hembra irradiados para establecer quimeras de médula ósea de corto plazo y de largo plazo, respectivamente.

En los estudios a corto plazo, se extrajeron los bazo 12 días después del trasplante para extraer el ARN total y el ADN genómico. Para supervisar las quimeras a largo plazo, se recogieron dos o tres tubos capilares de sangre cada 4-6 semanas, de la que se extrajeron el ADN genómico, el ARN total y la hemoglobina. Para examinar la función de vector de forma fiable en animales a largo plazo, las poblaciones de células eritroides se purificaron a partir del bazo. Las suspensiones de una sola célula se incubaron con el anticuerpo monoclonal TER-119 anti-ratón de rata (PharMingen). A las células del bazo recubiertas con anticuerpo se añadieron Dynabeads de IgG anti-rata de oveja (M-450, Dynal Inc.) y se purificaron según lo recomendado por el fabricante. El número de copias del vector, el patrón de integración y el quimerismo se determinaron mediante análisis de transferencia Southern. La fracción del ADN del donante con respecto al receptor se determinó por extracción y volviendo a aplicar la sonda en la transferencia con una sonda marcada con [³²P] dCTP específica del cromosoma Y y normalizando con respecto a una banda de ratón endógena. Las bandas radiactivas se cuantificaron mediante análisis Phosphorimager. Los sueros de cinco quimeras de médula ósea a largo plazo seleccionadas al azar (30 semanas después del trasplante) dieron negativo para *gag* de HTV-1 mediante RT-PCR usando el kit monitor Amplicor HIV-1 (Roche).

Se midieron el número de copias del vector y los transcritos de ARN de la β -globina humana durante un período de 24 semanas en ratones trasplantados con médula ósea transducida con RNS 1 (n = 8) o TNS9 (n = 10). El número de copias del vector se evaluó mediante análisis de transferencia Southern del ADN genómico aislado de la sangre periférica en las semanas 6, 10, 16 y 24. El número de copias promedio del vector en células de sangre periférica, medido periódicamente durante 24 semanas (Figura 4), mostró transferencia de genes altamente eficiente con ambos vectores (1,8 \pm 0,6 y 0,8 \pm 0,6 copias promedio del vector por célula para los niveles de transcritos de la β -globina en el intervalo del 10-20 % durante el mismo período de tiempo. Para evaluar la actividad transcripcional por copia del vector, los transcritos de ARN en el equilibrio y el número de copias del vector se cuantificaron en conjuntos de CFU-S₁₂ y en células de bazo TER-119 eritroides. Doce días después del trasplante, expresión de β -globina humana por alelo endógeno, (Figura 5a). Veinte semanas después, estos valores fueron de 0,5 \pm 0,1 % (significativamente menor que el día 12, P = 0,02) y 15,8 \pm 0,9 %, respectivamente (Figura 5b). Estos resultados establecen que los fragmentos de LCR más grandes aumentaron la expresión de globina *in vivo* y, además, sugiere que TNS9 es más resistente al silenciamiento transcripcional de lo que lo es RNS1.

Los niveles de β -globina humana codificada TNS9 podían producirse. Los tetrámeros de hemoglobina que incorporan β^A humana codificada por el vector y α -globina murina endógena (designada Hbb^{hu}) se cuantificaron en lisados de glóbulos rojos de sangre periférica después del fraccionamiento en gel de acetato de celulosa. Se encontraron niveles de Hbb^{hu} que representan hasta el 13 % de la hemoglobina total 24 semanas después del trasplante (Figura 3e, Tabla 1 en la información complementaria). En los mismos ensayos, los ratones transgénicos portadores de una copia de un cromosoma artificial de levadura de 230 kb (YAC) que abarca la totalidad del clúster del gen de tipo β -globina humana²⁰ mostraron que un 14% de su hemoglobina total incorporaba β^A humana. No hubo tetrámeros de hemoglobina con β^A humana mensurables en ninguno de los ratones portadores de RNS1 (tabla 1 en la información complementaria). La proporción de glóbulos rojos de sangre periférica madura que expresan β^A humana fue elevada en la mayoría de las quimeras de médula ósea TNS9, como se muestra por la doble tinción de β^A humana y TER-119. Por el contrario, las quimeras injertadas con médula ósea transducida con RNS1 mostraron fracciones altamente variables de eritrocitos positivos para β^A de tinción débil. Normalizados con la fracción de glóbulos rojos maduros positivos para β^A en circulación, los niveles de β^A codificada en lentivirus que contienen hemoglobina fueron, de media, el 64 % de los obtenidos en los ratones transgénicos YAC.

Ejemplo 5 (Ejemplo de Referencia)

Para comprobar que las CMH verdaderos se habían transducido, los vectores llevaron a cabo trasplantes secundarios utilizando la médula de los receptores primarios recogida 24 semanas después del trasplante. Los vectores TNS9 y RNS1 se detectaron fácilmente en todos los receptores secundarios 13 semanas después del trasplante. La expresión de β -globina humana se mantuvo en todos los receptores de médula transducida con TNS9. El éxito de la transducción de las CMH se confirmó mediante análisis del sitio de integración. El análisis de transferencia Southern se realizó en el ADN genómico aislado de la médula ósea, el bazo y el timo de los receptores de trasplante de médula ósea secundarios recogidos 13 semanas después del trasplante (se muestran un receptor

de trasplante secundario de RNS1 representativo y dos de TNS9). En el ADN genómico de ratones C57BL/6 (B6) se encuentran dos bandas endógenas.

Ejemplo 6 (Ejemplo de Referencia)

En vista de los altos niveles de expresión, los inventores han analizado la medida en que el vector TNS9 podría corregir el fenotipo de las células talasémicas utilizando ratones heterocigotos β^0 -talasémicos que carecen de una copia de sus genes b1 y b2 de la β -globina ($Hbb^{th3/+}$)²¹. Estos heterocigotos tienen un fenotipo clínico similar al intermedio de talasemia intermedia humana y presentan anemia crónica (hematocrito 28-30%, hemoglobina 8-9 g d1⁻¹) y anomalías en el tamaño (anisocitosis) y la forma (poiquilocitosis) de los glóbulos rojos. Quince semanas después del trasplante con médula ósea $Hbb^{th3/+}$ transducida con TNS9 no seleccionada, el nivel de hematocrito, el recuento de glóbulos rojos, el recuento de reticulocitos y el nivel de hemoglobina mejoraron notablemente en cinco de cinco ratones receptores (Figura 6). La anisocitosis y la poiquilocitosis se redujeron notablemente en los frotis de sangre periférica de quimeras portadoras del vector TNS9. Los ratones control transplantados con células de médula ósea $Hbb^{th3/+}$ transducidas con un vector que codifica la proteína verde fluorescente (eGFP) mejorada permanecieron todos gravemente anémicos (n = 5, Figura 6) y mantuvieron la morfología anormal de los glóbulos rojos. Estos resultados establecen que los niveles de hemoglobina circulante obtenida con TNS9 eran, de hecho, terapéuticamente relevantes.

El efecto combinado de la alta eficiencia de la transferencia de genes y la ausencia de reordenamientos del vector proporcionado por el lentivirus recombinante portador del gen de la β -globina y la configuración de la LCR adoptada en TNS9 produjo niveles de expresión de β^A en el intervalo terapéutico. La expresión más alta obtenida con TNS9 en comparación con RNS1 se asoció con una mayor fracción de sitios de integración permisivos en las células MEL y una mayor fracción de glóbulos rojos que contenían β^A humana en las quimeras de médula ósea. RNS1, portador de un potenciador más débil, estaba silenciado a lo largo del tiempo mientras que TNS9 retuvo la actividad transcripcional sin disminuir durante el mismo período de tiempo y en receptores de trasplante secundarios.

Se obtuvieron niveles más altos de tetrámeros de α_2 murina: β^A_2 humana en muestras de sangre periférica de receptores de médula ósea $Hbb^{th3/+}$ transducida con TNS9 (21 ± 3 % de hemoglobina total, n = 5, que con médula ósea $Hbb^{+/+}$ (6 ± 4 %, n + 10). Los dos grupos mostraron un número de copias del vector en sangre periférica y niveles de ARN de β -globina humana ($0,8 \pm 0,2$ en comparación con $0,8 \pm 0,6$, y $16,8 \pm 6$ % en comparación con $10,8 \pm 7$ %, respectivamente) comparables. Esta observación es consistente con una ventaja competitiva de la β -globina murina sobre la β -globina humana en asociación con α -globina murina²². En los pacientes talasémicos, la síntesis de la cadena β humana añadida mejoraría el desequilibrio de la cadena α : β y, por lo tanto, aumentaría la supervivencia de los glóbulos rojos y mejoraría la eritropoyesis ineficaz en estos pacientes. En los pacientes con anemia de las células falciformes, cabe esperar que las cadenas β^A transducidas tengan una ventaja sobre las cadenas β^S producidas por ambos genes endógenos en la competencia por las cadenas α disponibles²³. Dado que los pacientes con S/ β -talasemia cuya HbA representa el 10-30 % de su hemoglobina total están muy levemente afectados^{1,24}, el beneficio clínico de tal intervención sería muy significativo.

Ejemplo 7 (Ejemplo de Referencia)

Para investigar la expresión a largo plazo de los genes de β -globina humana y su eficacia terapéutica, se generaron quimeras de médula ósea injertadas con células de médula ósea $Hbb^{th3/+}$ transducidas con TNS9 (n = 5) y se estudiaron durante un período de 40 semanas.

La médula ósea del donante se extrajo de los fémures de ratones²³ c57/BL6 o $Hbb^{th3/+}$ macho de 8 a 16 semanas de edad obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME), a los que se había inyectado por vía intravenosa (i.v.) 6 días antes 5-fluorouracilo (5-FU) 150 mg/kg de peso corporal obtenido de Pharmacia (Piscataway, NJ). Las células de médula ósea se resuspendieron en medio X-VIVO-15 sin suero y suplementado con 10 ng/ml de interleucina-1 a (IL-1 α) 100 U/ml de IL-3, 150 U/ml de IL-6, 10 ng/ml del ligando Kit obtenido de Genzyme (Cambridge, MA), β -mercaptoetanol 0,5mM obtenido de Sigma (St. Louis, MO), L-glutamina 200-mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Las células de médula ósea se sedimentaron después y se resuspendieron en medio libre de suero que contiene sobrenadante lentiviral concentrado y suplementado con 8 mg/ml de polibreno (Sigma), L-glutamina 200 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina y citocinas como anteriormente, y se cultivaron durante 8 horas. Después, las células de médula ósea transducidas (5×10^5) se inyectaron i.v. en cada uno de los receptores hembra irradiadas para establecer quimeras de médula ósea. Los ratones receptores (ratones C57/BL6 o $Hbb^{th3/+}$ de 11 a 14 semanas de edad) se irradiaron con 10,5 Gy (dosis dividida 2 x 5,25 Gy) en el día del trasplante.

Como control sirvieron quimeras de la misma edad injertadas con células de médula ósea $Hbb^{th3/+}$ (n=5) y $Hbb^{+/+}$ (n=5) transducidas con eGFP. El número de copias del vector se controló en la sangre periférica mediante análisis de transferencia Southern cuantitativo y se encontró que permanecía estable, entre 0,5 y 1,0 copias/célula de media (datos no mostrados). La expresión de proteínas se evaluó mediante análisis cuantitativo de la hemoglobina, para medir la proporción de los tetrámeros de hemoglobina que incorporan β^A (Hbb^{hu} , $\mu\alpha_2$: $hu\beta^A_2$) humana o β -globina murina (Hbb^{mu} , $\mu\alpha_2$: $m\beta_2$), e inmunofluorescencia, para determinar la fracción de glóbulos rojos

maduros que contienen la proteína β^A humana. Los ratones transgénicos portadores de copia de un cromosoma artificial de levadura de 230 kb que abarca la totalidad del clúster génico de tipo β -globina humana²⁸ sirvieron como referencia, lo que muestra que el 14 % de su hemoglobina total que incorpora β^A humana y el 100 % de β^A + RBC^{19,28} hbb^{hu} representó el 19 % y el 22 % de la hemoglobina total en las quimeras TNS9. Estos niveles se mantuvieron estables hasta 40 semanas después del trasplante. Durante este mismo período, la proporción de glóbulos rojos periféricos maduros que expresan β^A humana también se mantuvo elevada y estable (aproximadamente del 70 % al 80 %), como se muestra por la doble tinción de β^A humana y TER-119.

Ejemplo 8 (Ejemplo de Referencia)

Mejora a largo plazo de la anemia

La estabilidad de la expresión de β^A codificada por TNS9 detectada en la sangre periférica sugirió que se podían obtener beneficios terapéuticos sistémicos y hematológicos a largo plazo. Para investigar si la producción e Hbb^{hu} sería suficiente para tratar la anemia, se controlaron estrechamente los parámetros de hemoglobina durante 40 semanas. El marcado aumento en la concentración de hemoglobina, el recuento de glóbulos rojos y el hematocrito se mantuvo durante este período de tiempo. Los ratones control que recibieron trasplantes de células de médula ósea Hbb^{th3/+} transducidas con eGFP se mantuvieron en anemia grave, lo que indica que el propio procedimiento de trasplante no alteró el estado anémico. Los recuentos de reticulocitos disminuyeron de un 5 % a un 8 % en las quimeras tratadas con TNS9, en comparación con del 19 % al 21 % en las quimeras Hbb^{th3/+} tratadas con eGFP los ratones Hbb^{th3/+} de la misma edad, lo que sugiere un aumento de la duración de la vida de los glóbulos rojos y una disminución de la actividad eritropoyética.

Ejemplo 9 (Ejemplo de Referencia)

Para determinar el impacto de la expresión del gen de la β -globina humana sostenida en la hematopoyesis, se estudió el grado de esplenomegalia (aumento de tamaño del bazo) y EMH en quimeras de 1 año de edad y ratones control de la misma edad. Los pesos del bazo medidos en quimeras Hbb^{th3/+} tratadas con Tns9 fueron indistinguibles de los receptores de médula ósea normal transducida con eGFP, al igual que el número total de células por bazo. En contraste, los ratones a los que se injertaron células de médula ósea Hbb^{th3/+} transducidas con eGFP mostraron pesos del bazo y un número de células totales que eran aproximadamente 3 veces mayores. La corrección del peso del bazo en quimeras de médula ósea TNS9 correspondió a una normalización concomitante en el contenido de células progenitoras hematopoyéticas totales. CFU-E, BFUE y CFUs-GM de bazo se redujeron a niveles medidos en los receptores de médula ósea Hbb^{th+/+} transducida con eGFP, mientras que se mantuvieron elevados en las quimeras de control a las que se habían injertado células de la médula ósea Hbb^{th3/+} transducidas con eGFP y en ratones Hbb^{th3/+} de la misma edad, como se ha observado anteriormente en otro modelo murino de β -talasemia.²⁹

La regresión de la EMH se corroboró mediante el análisis morfológico del bazo y el hígado en quimeras a largo plazo en controles de la misma edad. La histopatología de los bazos de ratones que recibieron trasplantes de médula Hbb^{th3/+} transducida con eGFP fue prácticamente idéntica a la del bazo de los ratones Hbb^{th3/+} control. Específicamente, la pulpa roja se amplió de manera significativa, lo que representa del 80 % al 90 % del área transversal y densamente ocupada por precursores eritroides nucleados. La pulpa blanca, basada en el área transversal, estaba relativamente disminuida y las zonas marginales se oscurecieron por el gran número de glóbulos rojos nucleados, lo que refleja una mayor expansión de la pulpa roja y de precursores eritroides. En quimeras tratadas con TNS9, la cantidad de pulpa roja se redujo considerablemente, lo que representa únicamente aproximadamente del 50 % al 60 % del área transversal. Además, se redujo el número de precursores eritroides nucleados en la pulpa roja. Otras células hematopoyéticas inmaduras estaban presentes en la pulpa roja, pero con mucha menos frecuencia que en los bazos de ratones Hbb^{th3/+} talasémicos control. Los hígados de quimeras tratadas con TNS9 fueron similares a los de los ratones control normales en que no se detectó EMH. Por el contrario, los hígados de los ratones a los que se han injertados células de médula ósea Hbb^{th3/4} transducidas eGFP mostraron pequeños focos en serie de EMH intrasinusoidal.

Ejemplo 10 (Ejemplo de Referencia)

La acumulación de hierro tóxico en los órganos de pacientes talasémicos es una consecuencia de la destrucción de glóbulos rojos y el aumento de la absorción de hierro gastrointestinal. Para determinar si la expresión sostenida del vector TNS9 reducía la sobrecarga de hierro, los inventores estudiaron secciones de tejido de hígado y de corazón, teñidas utilizando la tinción de hierro Gomori. No se observaron depósitos de hierro en los hígados de los ratones control Hbb^{+/+} normales, mientras que los ratones Hbb^{th3/+} mostraron cantidades variables de hierro, incluidos algunos agregados grandes. Las quimeras tratadas transducidas con TNS9 demostraron niveles de bajos a indetectables de hierro en el hígado, mientras que el hierro se detectó fácilmente en los hígados de todos los ratones que recibieron trasplantes de células de médula ósea Hbb^{th3/+} transducidas con eGFP. No se encontró acumulación de hierro en el corazón de los ratones tratados o control, como se observó previamente en otro modelo murino de β -talasemia,³⁰ en contraste con lo observado en la enfermedad humana.¹⁻³

Ejemplo 11 (Ejemplo de Referencia)

Para evaluar la eficacia de la selección *in vivo* de células transducidas con vectores que codifican globina y DHFR, utilizando antifolatos se utilizan los siguientes protocolos alternativos. En el protocolo 1, los ratones receptores se tratan diariamente durante 5 días con MTX (25 mg/kg) y NBMPR-P (20 mg/kg), comenzando a las 6 semanas de la administración de células de médula ósea transducidas. En el protocolo 2, los ratones receptores se tratan diariamente durante 5 días con TMTX (40mg/kg) y NBMPR-P (20 mg/kg), comenzando a las 6 semanas de la administración de células de médula ósea transducidas. En el protocolo 3, los ratones receptores, acondicionado con busulfán en lugar de con irradiación gamma, se tratan diariamente durante 5 días con TMTX (40mg/kg) y NBMPR-P (20 mg/kg), comenzando a las 4 semanas de la administración de células de médula ósea transducidas. (TMTX (Neutrexina; US Bioscience); >MTX (Metotrexato LPF Sodium; Immunex); NBMPR-P (sal disódica de nitrobeniltioinosina 5'-monofosfato; Alberta nucleoside therapeutics). El protocolo 3 es, en principio, el protocolo más atractivo, dado que los receptores no se han irradiado y, además, no se han tratado con un "régimen de acondicionamiento mieloablativo". Se tratan con un tratamiento de acondicionamiento relativamente más suave que consiste en una dosis "no mieloablativa" de busulfán. Se espera que, en combinación con la "selección *in vivo*" mediada por DHFR/TMTX, se podría injertar satisfactoriamente a los receptores sin que recibieran un duro tratamiento previo al trasplante. Este sería el camino a seguir para el tratamiento de sujetos con hemoglobinopatías graves.

En el presente documento también se describen:

1. Un lentivector recombinante que comprende:

- a. una región que codifica un gen de globina funcional;
- b. grandes porciones de la región de control del locus de la β -globina,

que incluyen sitios hipersensibles a DNasa I HS2, HS3 y HS4, proporcionando dicho vector la expresión de β -globina cuando se introduce en un mamífero *in vivo*; y

c. una región que codifica una dihidrofolato reductasa.

2. El vector de la realización 1, que comprende además un promotor de PGK de ratón, en el que el promotor de PGK de ratón controla la expresión de la región que codifica una dihidrofolato reductasa.

3. El vector de la realización 1 o 2, en el que el gen de la globina codifica la β -globina humana.

4. El vector de cualquiera de las realizaciones 1-3, en el que la dihidrofolato reductasa es una dihidrofolato reductasa humana.

5. El vector de la realización 4, en el que la dihidrofolato reductasa humana es una forma mutante que tiene una mayor resistencia a los antifolatos, en comparación con la dihidrofolato reductasa humana de tipo silvestre, difiriendo dicha forma mutante en la secuencia de aminoácidos de la dihidrofolato reductasa humana de tipo silvestre como resultado de una conjunto de mutaciones.

6. El vector de la realización 5, en el que el conjunto de mutaciones comprende una mutación en un aminoácido correspondiente al aminoácido 22 de la secuencia de tipo silvestre y una mutación en un aminoácido correspondiente al aminoácido 31 de la secuencia de tipo silvestre.

7. Uso de un vector de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-6 para transducir células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas para el tratamiento de una hemoglobinopatía en un individuo mamífero que sufre una hemoglobinopatía.

8. El uso de la realización 7, en el que una etapa de selección utilizando un antifolato se realiza *ex vivo* para producir una población de células con aumento del número de células transducidas.

9. El uso de la realización 8, en el que el antifolato es metotrexato.

10. Una célula progenitora hematopoyética o madre de mamífero transducida con un vector recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-6.

11. Un método para preparar una composición terapéutica para el tratamiento de hemoglobinopatías en un individuo mamífero, que comprende las etapas de preparar un recombinante de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-6, obteniendo células progenitoras hematopoyéticas o células madre del individuo mamífero y transduciendo las células con el vector recombinante.

12. El método de la realización 11, que comprende además la etapa de realizar una selección *ex vivo* usando un antifolato.

REIVINDICACIONES

1. Un lentivector recombinante que comprende:

- 5 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica una γ -globina funcional; y
 (b) una porción de 3,2 kb de una región de control del locus (LCR) de la β -globina humana, que consiste esencialmente en un fragmento de nucleótidos que abarca el sitio de HS2 y que se extiende entre los sitios de restricción SnaBI y BstXI de dicha LCR, un fragmento de nucleótidos que abarca el sitio HS3 y que se extiende entre los sitios de restricción HindIII y BamHI de dicha LCR y un fragmento de nucleótidos que abarca el sitio de HS4 y que se extiende entre los sitios de restricción BamHI y BanII de dicha LCR;
- 10

proporcionando dicho lentivector la expresión de dicha γ -globina funcional cuando se introduce *in vivo* en un mamífero y que es eficaz para proporcionar beneficios terapéuticos a un individuo con un gen de globina defectuoso.

15 2. Un lentivector recombinante que comprende:

- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica una globina quimérica funcional; y
 (b) una porción de 3,2 kb de una región de control del locus (LCR) de la β -globina humana, que consiste esencialmente en un fragmento de nucleótidos que abarca el sitio HS2 y que se extiende entre los sitios de restricción SnaBI y BstXI de dicha LCR, un fragmento de nucleótidos que abarca el sitio HS3 y que se extiende entre los sitios de restricción HindIII y BamHI de dicha LCR y un fragmento de nucleótidos que abarca el sitio de HS4 y que se extiende entre los sitios de restricción BamHI y BanII de dicha LCR;
- 20

en el que dicho gen de la globina quimérica comprende una región no traducida en 5' de β -globina, una región codificante del exón 1 de la γ -globina, un intrón 1 de la γ -globina 1, una región de codificación del exón 2 de la γ -globina 2, un intrón 2 de la β -globina, una región de codificación del exón 3 de la γ -globina y una región no traducida en 3' de la β -globina; y

25

en donde dicho lentivector proporciona la expresión de una γ -globina funcional cuando se introduce *in vivo* en un mamífero y que es eficaz para proporcionar beneficios terapéuticos a un individuo con un gen de globina defectuoso.

30

3. El lentivector de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el uso de codones dentro de la región de codificación del exón 3 de la γ -globina tiene una secuencia modificada para parecerse al uso de codones de un gen de la β -globina.

35 4. El lentivector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que codifica además una dihidrofolato reductasa.

5. El lentivector de la reivindicación 4, en el que la dihidrofolato reductasa es una dihidrofolato reductasa humana.

6. El lentivector de la reivindicación 5, en el que la dihidrofolato reductasa humana es una forma mutante que tiene una mayor resistencia a los antifolatos, en comparación con la dihidrofolato reductasa humana de tipo silvestre, difiriendo dicha forma mutante en la secuencia de aminoácidos de la dihidrofolato reductasa humana de tipo silvestre como resultado de un conjunto de mutaciones.

40

7. El lentivector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho gen de la γ -globina está unido operativamente a un promotor de β -globina.

45

8. El lentivector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la γ -globina es una γ -globina humana.

9. Una célula hematopoyética de mamífero, un precursor hematopoyético de mamífero o una célula madre, transducidas con un lentivector recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, con la condición de que la célula hematopoyética de mamífero, el precursor hematopoyético de mamífero o la célula madre no procedan de un embrión humano.

50

10. Uso de una célula de acuerdo con la reivindicación 9 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una hemoglobinopatía en un individuo mamífero que sufre una hemoglobinopatía.

55

11. Uso de un lentivirus recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una hemoglobinopatía en un individuo mamífero que sufre una hemoglobinopatía, en donde el lentivector se utiliza para transducir células progenitoras hematopoyéticas autólogas o células madre hematopoyéticas, con la condición de que dichas células no sean de un embrión humano.

60

12. El uso de las reivindicaciones 10 u 11, en el que dicha hemoglobinopatía es anemia de células falciformes.

13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que la célula o las células se transducen *ex vivo*.

65 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que, cuando el lentivector codifica una dihidrofolato reductasa, se lleva a cabo adicionalmente una etapa de selección utilizando un antifolato.

- 5 15. Un método para preparar una composición terapéutica para el tratamiento de una hemoglobinopatía en un mamífero, que comprende las etapas de preparar un lentivector recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y la transducción de células progenitoras hematopoyéticas o células madre con el lentivector recombinante, con la condición de que dichas células progenitoras hematopoyéticas o células madre no sean de un embrión humano.

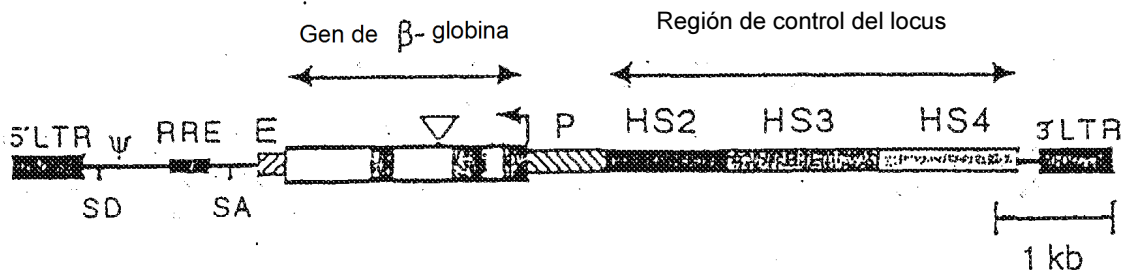


Fig. 1

Uso clínico de la resistencia a medicamentos

Selección in vivo de células madre modificadas genéticamente

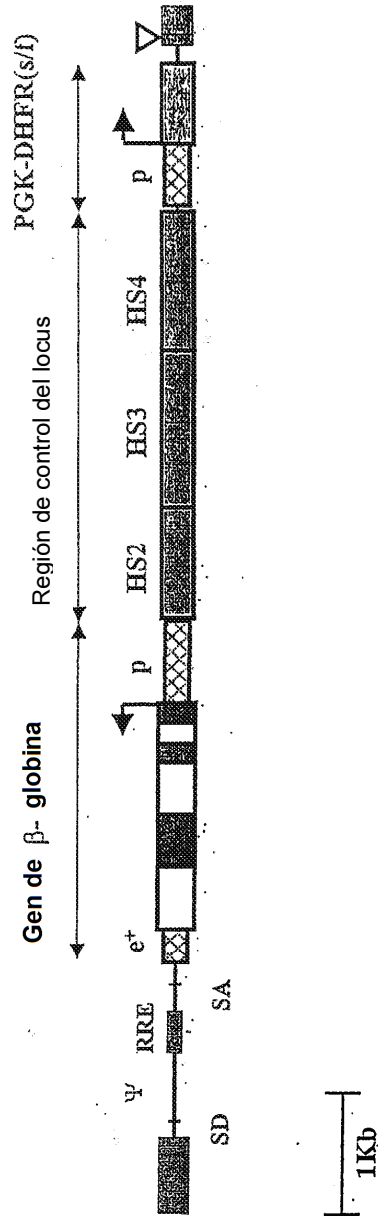


Fig. 2

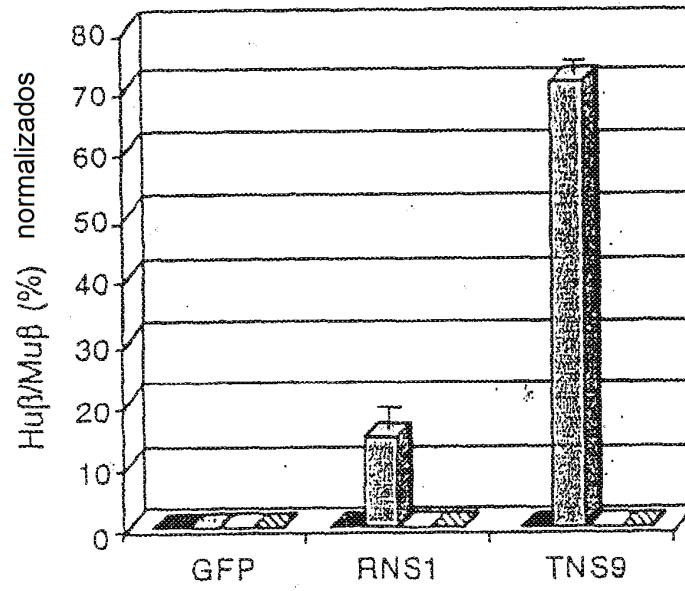


Fig. 3

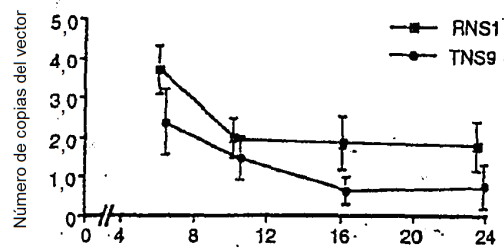


Fig. 4

Fig. 5 A



Fig. 5 B

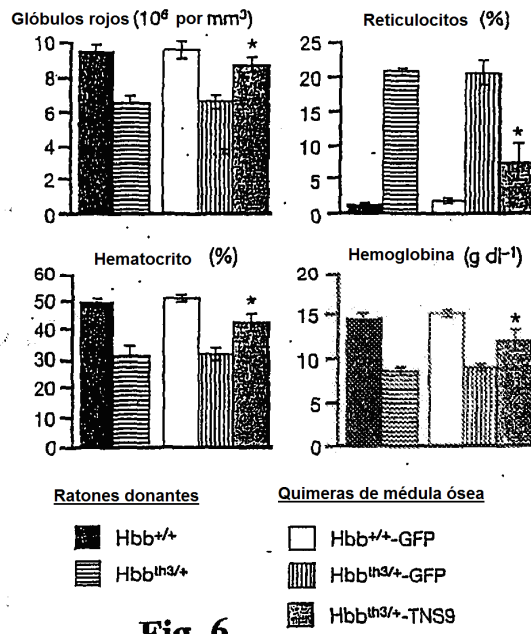
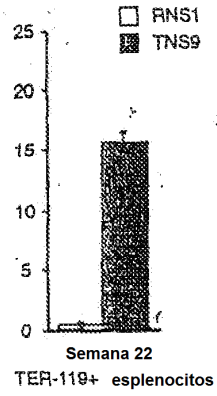


Fig. 6