

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 829**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2009 PCT/US2009/056770**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2010 WO2010030963**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2009 E 09813730 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2334794**

54 Título: **Modulación de BCL11A para el tratamiento de hemoglobinopatías**

30 Prioridad:

**15.09.2008 US 97017 P**  
**02.07.2009 US 222571 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.06.2017**

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION (50.0%)**  
**55 Shattuck Street**  
**Boston, Massachusetts 02115, US y**  
**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ORKIN, STUART, H. y**  
**SANKARAN, VIJAY, G.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 615 829 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

Modulación de BCL11A para el tratamiento de hemoglobinopatías

Esta invención se realizó con el apoyo gubernamental bajo T32 GM07726, T32 GM07753-27, 5P01 HL32262-26, y 5R01 HL32259-27, todos concedidos por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Antecedentes de la invención

La hemoglobina adulta normal comprende cuatro proteínas de globina, dos de las cuales son proteínas alfa ( $\alpha$ ) y las otras dos son proteínas beta ( $\beta$ ). Durante el desarrollo fetal de mamíferos, particularmente en seres humanos, el feto produce hemoglobina fetal, que comprende dos proteínas gamma ( $\gamma$ )-globina en lugar de las dos proteínas  $\beta$ -globina. En algún momento durante el desarrollo fetal o en la infancia, dependiendo de la especie particular y del individuo, se produce un cambio de globina, denominado "cambio fetal", momento en el que los eritrocitos en el feto cambian de predominantemente  $\gamma$ -globina a predominantemente  $\beta$ -globina. El cambio en el desarrollo de producción de hemoglobina fetal predominantemente o HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) a la producción de hemoglobina adulta o HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) comienza alrededor de las 28 a 34 semanas de gestación y continúa poco después del nacimiento hasta que la HbA se vuelve predominante. Este cambio resulta principalmente de la disminución de la transcripción de los genes de la gamma-globina y aumento de la transcripción de los genes de la beta-globina. En promedio, la sangre de un adulto normal contiene sólo alrededor del 2% de HbF, aunque los niveles residuales de HbF tienen una variación de más de 20 veces en adultos sanos (Atweh, Semin. Hematol 38 (4): 367-73 (2001)).

Las hemoglobinopatías abarcan una serie de anemias de origen genético en las que hay una disminución de la producción y/o una mayor destrucción (hemólisis) de los glóbulos rojos (RBC). Estos también incluyen defectos genéticos que resultan en la producción de hemoglobinas anormales con una capacidad concomitante disminuida para mantener la concentración de oxígeno. Algunos de estos trastornos implican la falta de producción de  $\beta$ -globina normal en cantidades suficientes, mientras que otros implican el fracaso para producir la  $\beta$ -globina normal en su totalidad. Estos trastornos asociados con la proteína  $\beta$ -globina se denominan generalmente  $\beta$ -hemoglobinopatías. Por ejemplo, las  $\beta$ -talasemias resultan de un defecto parcial o completo en la expresión del gen de la  $\beta$ -globina, lo que conduce a HbA deficiente o ausente. La anemia falciforme es el resultado de una mutación puntual en el gen estructural de  $\beta$ -globina, que conduce a la producción de una hemoglobina anormal (falciforme) (HbS). Los glóbulos rojos de HbS son más frágiles que los normales y sufren hemólisis más fácilmente, lo que conduce a la anemia (Atweh, Semin. Hematol., 38: 367-73 (2001)).

Recientemente, la búsqueda de un tratamiento destinado a la reducción del desequilibrio de la cadena de globina en pacientes con  $\beta$ -hemoglobinopatías se ha centrado en la manipulación farmacológica de la hemoglobina fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ; HbF). El potencial terapéutico de tales enfoques es sugerido por observaciones del fenotipo leve de individuos con herencia conjunta tanto de  $\beta$ -talasemia homocigótica como persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH), así como por aquellos pacientes con  $\beta$ -talasemia homocigótica que no sintetizan hemoglobina adulta, pero en quienes se observa una necesidad reducida de transfusiones en presencia de mayores concentraciones de hemoglobina fetal. Además, se ha observado que ciertas poblaciones de pacientes adultos con anomalías de la cadena P tienen niveles de hemoglobina fetal (HbF) superiores a los normales, y se ha observado que presentan un curso clínico más leve de la enfermedad que los pacientes con niveles adultos normales de HbF. Por ejemplo, un grupo de pacientes con anemia falciforme de Arabia Saudita que expresan 20-30% de HbF tienen sólo manifestaciones clínicas leves de la enfermedad (Pembrey y colaboradores, Br. J. Haematol., 40: 415-429 (1978)). Se acepta ahora que los trastornos de la hemoglobina, tales como la anemia falciforme y las  $\beta$ -talasemias, son mejorados por el aumento de la producción de HbF. (Revisado en Jane y Cunningham, H. J. Haematol, 102: 415 - 422 (1998) y Bunn, N. Engl. J. Med. 328: 129 - 131 (1993)). Coleman, y colaboradores, Clinical Pediatrics 46: 396-391 (2007) discute opciones terapéuticas para la enfermedad de células falciformes y el mejoramiento farmacológico y genético de la expresión de HbF. Una revisión de la complejidad genética en la enfermedad de células falciformes se encuentra en Higgs, y colaboradores, PNAS 105: 11595-11596 (2008). Dominique Labie, Hematologie 14: 165-166 (2008) discute la trans-regulación de la producción de hemoglobina fetal. La modificación de la expresión del gen de la globina mediante estrategias de direccionamiento de ARN se discute en Shen y colaboradores, Experimental Hematology 35: 1209-1218 (2007).

Como se mencionó anteriormente, el cambio de la hemoglobina fetal a la hemoglobina adulta ( $\alpha_2\gamma_2$ ; HbA) generalmente se produce dentro de los seis meses después del parto. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con  $\beta$ -hemoglobinopatías, los genes secuencia arriba de la  $\gamma$ -globina están intactos y completamente funcionales, de modo que si estos genes se reactivan, la síntesis funcional de la hemoglobina podría mantenerse durante la edad adulta y así mejorar la gravedad de la enfermedad (Atweh, Semin. Hematol, 38 (4): 367-73 (2001)). Desafortunadamente, los mecanismos moleculares *in vivo* que subyacen en el cambio de globina no se comprenden bien.

La evidencia que apoya la viabilidad de la reactivación de la producción de hemoglobina fetal proviene de experimentos en los que se demostró que la sangre periférica, que contiene células clonogénicas, cuando se le suministra la combinación apropiada de factores de crecimiento, produce colonias eritroides y andanadas en cultivo semisólido. Las

5 células individuales en tales colonias pueden acumular hemoglobina fetal (HbF), hemoglobina adulta (HbA) o una combinación de ambas. En los cultivos de sangre adulta, los glóbulos rojos nucleados acumulan ya sea HbA (F-A+) solamente, o una combinación de HbF y HbA (F+A+) (Papayannopoulou y colaboradores, Science 199: 1349-1350 (1978), Migliaccio, y colaboradores, Blood 76: 1150-1157 (1990)). Es importante destacar, que las colonias individuales  
 10 contienen tanto células F+ como F-, lo que indica que ambos tipos son progenie de las mismas células madre circulantes. Así, durante las primeras etapas de desarrollo en cultivo, las células ejecutan una opción, a través de mecanismos actualmente desconocidos, para expresar o no HbF. La proporción de células F+ adultas que se desarrollan en cultivo no parece estar previamente programadas *in vivo*, sino que parece depender de las condiciones de cultivo: Puede lograrse un cambio en la ruta de expresión combinada de HbF y HbA, por ejemplo, *in vitro* mediante altas concentraciones en suero, debido a la actividad de un compuesto no identificado que puede ser absorbido sobre carbón activado (Bohmer, y colaboradores, Prenatal Diagnosis 19: 628-636 (1999), Migliaccio y colaboradores, Blood 76: 1150 (1990); Rosenblum, y colaboradores, en: Experimental Approaches for the Study of Hemoglobin, 397 (1985)).

15 En general, la identificación de moléculas que juegan un papel en el cambio de globina es importante para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que interfieren con la hemoglobina adulta e inducen la síntesis de hemoglobina fetal. Tales moléculas proporcionarán nuevos objetivos para el desarrollo de intervenciones terapéuticas para una variedad de hemoglobinopatías en las que la reactivación de la síntesis de hemoglobina fetal mejoraría significativamente la gravedad y la morbilidad de la enfermedad.

Sumario de la invención

20 La invención se refiere a métodos y composiciones para uso en la modulación de la expresión de hemoglobina fetal (HbF) a través de BCL11A.

La invención se basa, en parte, en la identificación de una función para la proteína BCL11A, a saber, que la proteína BCL11A actúa como un regulador específico del estado de la expresión de la hemoglobina fetal.

25 Por consiguiente, la invención proporciona un método *ex vivo* o *in vivo* para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula, que comprende las etapas de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética con una cantidad eficaz de una composición que comprende un inhibidor de BCL11A, aumentando así la expresión de hemoglobina fetal en la célula progenitora hematopoyética, o su progenie, con respecto a la célula antes del contacto, en donde el inhibidor de BCL11A es un ácido nucleico específico de BCL11A que inhibe la expresión de BCL11A, y en donde el ácido nucleico específico de BCL11A es un agente de interferencia por ARN específico de BCL11A, un vector que codifica un agente de interferencia por ARN específico de BCL11A, un constructo o molécula antisentido, o una ribozima.  
 30

En una realización preferida, el agente de interferencia por ARN comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1-6.

35 En consecuencia, la invención proporciona una composición que comprende un inhibidor de BCL11A para uso en el tratamiento y/o prevención de una hemoglobinopatía, en donde el inhibidor de BCL11A es un ácido nucleico específico de BCL11A que inhibe la expresión de BCL11A y en donde el ácido nucleico específico de BCL11A es un agente de interferencia por ARN específico de BCL11A, un vector que codifica un agente de interferencia por ARN específico de BCL11A, un constructo o molécula antisentido o una ribozima.

40 En una realización, la hemoglobinopatía es una  $\beta$ -hemoglobinopatía. En otra realización, la hemoglobinopatía es una enfermedad de células falciformes. La enfermedad de células falciformes puede ser la anemia falciforme, la enfermedad de la hemoglobina C falciforme (HbSC), la  $\beta$ -talasemia + falciforme (HbS/ $\beta$ +) y la  $\beta$ -talasemia 0 falciforme (HbS/ $\beta$ 0). En otra realización, la hemoglobinopatía es  $\beta$ -talasemia.

En una realización, el uso comprende poner en contacto una célula progenitora hematopoyética con la composición *ex vivo* o *in vitro*, y la célula o su progenie se administra a un mamífero.

45 En una realización, la composición comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición que comprende un inhibidor de BCL11A se puede administrar mediante inyección, infusión, instilación o ingestión.

En una realización preferida, el agente de interferencia por ARN comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1-6.

Breve descripción de los dibujos

50 Las Figuras 1A-1B muestran la expresión de BCL11A en progenitores eritroides humanos.

- La Figura 1A muestra las principales isoformas BCL11A presentes en extractos nucleares de células eritroides humanas.
- La Figura 1B compara la expresión de BCL11A y la hemoglobina fetal en células eritroides en diferentes etapas de la ontogenia humana.
- 5 La Figura 2A demuestra que la variante común rs4671393 está asociada con la expresión de BCL11A en líneas celulares linfoblastoides humanas de las poblaciones HapMap Europea (CEU) y Africana (YRI).
- La Figura 2B son transferencias de Western de lisados de eritroblastos primarios de médula ósea (BM) humana, eritroblastos de segundo trimestre de hígado fetal (FL), eritroblastos primitivos circulantes de primer trimestre y células K562. Se aislaron los eritroblastos primarios humanos que están de la misma etapa mediante clasificación de la población doblemente positiva CD235 y CD71. Las bandas XL y L migran juntas aquí como resultado de una separación reducida en esta transferencia.
- 10 Las Figuras 3A-3D representan la metodología de cribado de afinidad proteómica usada para identificar proteínas asociadas BCL11A en células eritroides.
- La Figura 3A representa el esquema utilizado para la purificación por afinidad en células de eritroleucemia de ratón (MEL).
- 15 La Figura 3B tabula los resultados de la criba sustractiva.
- La Figura 3C representa los resultados de los análisis de los arreglos Affymetrix.
- La Figura 3D destaca el motivo encontrado en BCL11A y varias otras proteínas sugeridas por mediar las interacciones con el complejo represor de NuRD.
- 20 Las Figuras 4A-4E muestran confirmaciones de las interacciones de BCL11A con GATA-1, FOG-1 y el complejo NuRD en células eritroides.
- La Figura 4A muestra datos de inmunoprecipitación que confirman las interacciones de BCL11A con GATA-1, FOG-1, MTA2 y RBBP7 en células eritroides (MEL).
- 25 La Figura 4B representa las interacciones de BCL11A con MTA2, GATA-1 y FOG-1 usando fracciones de filtración en gel a partir de extractos nucleares eritroides.
- Las Figuras 4C y 4D muestran datos de inmunoprecipitación que confirman las interacciones de BCL11A con GATA-1 y FOG-1 respectivamente por expresión exógena en células Cos7.
- La Figura 4E muestra datos de inmunoprecipitación para mapear la interacción de BCL11A en la molécula de GATA-1.
- Las Figuras 5A-5E demuestran que BCL11A actúa como un represor del gen de la  $\gamma$ -globina.
- 30 La Figura 5A demuestra que la desactivación mediada por ARNpi de BCL11A resulta en elevaciones de los niveles de ARNm de  $\gamma$ -globina en células progenitoras eritroides humanas.
- La Figura 5B representa que la expresión génica global no se modifica grandemente en células detectadas con ARNpi de BCL11A.
- 35 La Figura 5C muestra que la administración de ARNph mediada por lentivirus a progenitores eritroides humanos da como resultado una desactivación de un 60%-97%.
- La Figura 5D muestra que las células objetivo con ARNph son morfológicamente indistinguibles de las células tratadas de control.
- La Figura 5E muestra la inducción del ARNm de la  $\gamma$ -globina en las células que responden a la desactivación de BCL11A.
- 40 La Figura 5F muestra que los hemolizados preparados a partir de células el día 12 de la diferenciación muestran la presencia de HbF madura.

Las Figuras 6A-H muestran que la  $\gamma$ -globina humana se expresa principalmente en células eritroides primitivas de ratones  $\beta$ -locus.

5 La Figura 6A es un gráfico representativo de FACS que muestra FSC (escala lineal) frente a SSC (escala logarítmica) para sangre embrionaria E 13.5. Se muestra que la activación periódica permite el enriquecimiento de linajes primitivos y definitivos.

La Figura 6B es un histograma que muestra la expresión relativa del gen de  $\epsilon\gamma$  globina de murino, del gen de  $\epsilon$  embrionario humano, y genes  $\gamma$ -globina humana en la población primitiva (P), en comparación con la población definitiva (D). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar ( $n > 3$  por grupo).  $P = 0,98$  para una prueba t de dos caras que compara el enriquecimiento relativo de  $\epsilon\gamma$  con  $\gamma$ -globina.

10 Las Figuras 6C-H son representativas de tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-HbF de hígados fetales E13.5 humanos y murinos. Todas las imágenes se toman con un objetivo 60X.

La Figura 6C muestra que los hígados fetales humanos contienen numerosos eritroblastos, todos con tinción positiva para expresión de  $\gamma$ -globina.

15 Las Figuras 6D y 6E muestran que los eritroblastos definitivos de hígado fetal murino no muestran tinción principal de  $\gamma$ -globina y solamente células ocasionales con morfología primitiva megaloblástica muestran tinción (flechas).

Las Figuras 6E y 6F muestran muchas células primitivas megaloblásticas en la circulación que tienen una tinción altamente positiva (puntas de flecha en la figura 6E; flechas en la figura 6F), mientras que los eritrocitos definitivos más pequeños son negativos (en la figura 6F, como círculos gris claro más pequeños).

20 Las Figuras 6G y 6H muestran que la tinción se realizó en la copia única de las líneas A20 de YAC y A858 mostró patrones de tinción similares. La tinción positiva se determinó en comparación con la tinción de fondo de los controles de compañeros de camada negativos para el transgén.

25 Las Figuras 7A-D muestran análisis PT-FISH que revelan que la expresión de  $\gamma$ -globina es paralela a las globinas embrionarias murinas en células eritroides primitivas. Se analizaron dos líneas independientes de ratones YAC transgénicos, A85 (Figuras 7A y 7C) y A20 (Figuras 7B y 7D) utilizando hibridación fluorescente in situ de cuatro colores de un transcrito primario de ARN (PT-FISH). Para el primer grupo de experimentos, se realizaron sondas para  $\alpha$ -globina murina ( $m\alpha$ ),  $\beta$ -globina humana ( $h\beta$ ) y  $\gamma$ -globina humana ( $h\gamma$ ) objetivo. Adicionalmente se usó DAPI para identificar los núcleos de las células.

30 Las Figuras 7A y B muestran que la expresión de  $\gamma$ -globina predomina en las dos líneas en las poblaciones primitivas observadas que circulan en células sanguíneas primitivas (PBC) de los embriones E11.5 y E13.5. Se observa una expresión menor en poblaciones definitivas maduras de hígado fetal (FL) en E13.5. Muchas de estas células pueden representar células primitivas que se encuentran dentro del parénquima de FL.

Las Figuras 7C y 7D muestran una expresión paralela de  $m\gamma$  y  $h\gamma$  para PBC en E13.5 y FL en E13.5, respectivamente. Los gráficos representan el porcentaje de loci activos y se miden para  $\geq 100$  núcleos por sonda fijados en cada punto de tiempo.

35 Las Figuras 8A-8B muestran que la expresión de BCL11A varía entre humanos y ratones, indicando un modelo para la variación de la acción trans en la expresión del gen de  $\beta$ -globina.

La Figura 8A muestra que en células humanas las proteínas de longitud completa de BCL11A (isoformas XL/L) se reducen dentro de las poblaciones celulares que expresan altos niveles de  $\gamma$ -globina, incluyendo células de hígado primitivas y fetales.

40 La Figura 8B es un modelo esquemático que resume la ontogenia de la regulación génica de globina tipo  $\beta$  en humanos, ratones y ratones  $\beta$ -locus. La ontogenia de eritropoyesis de mamíferos y de poblaciones progenitoras se muestra en la parte superior. Se describen poblaciones progenitoras, incluyendo poblaciones eritroides primitivas (EryP-CFC), células madre hematopoyéticas definitivas (HSC) y células unitarias que forman andanadas de eritroides definitivas (BFU-E). La aorta gonado-mesonefros (AGM) y la placenta son sitios de hematopoyesis definitiva. A continuación se muestran los patrones de la globina tipo  $\beta$  y la expresión de BCL11A observada en las dos especies.

45 Las Figuras 9A-9F muestra que los ratones BCL11A  $-/-$  fallan en silenciar la expresión de las globinas tipo  $\beta$  embrionarias de ratón y los genes de  $\beta$ -globina humana.

La Figura 9A muestra que el patrón de expresión de CD71/Ter119 para células de hígado fetal de embriones E14.5, revelan eritropoyesis normal general con estos marcadores fenotípicos. Los porcentajes medios para las poblaciones en cada cuadrante se muestran en rojo (n = 6 para controles fl/+ y n = 4 para mutantes -/-). El P > 0,1 mediante una prueba t bilateral para todas las poblaciones analizadas activadas periódicamente.

5 La Figura 9B muestra la expresión de las globinas embrionarias como un porcentaje del total de globinas tipo  $\beta$  de ratón para ratones de control (fl/+), BCL11A heterocigotos (+/-) y ratones deficientes (-/-) en E14.5 (n = 10, 14, 11 respectivamente).

La Figura 9C muestra la expresión de las globinas embrionarias como porcentaje del total de globinas tipo  $\beta$  de ratón en E18.5 (n = 9, 9, 7 respectivamente).

10 La Figura 9D muestra que la inmunohistoquímica se realizó en FL de E 14.5 de animales BCL11A fl/+ y -/- para la globina embrionaria  $\epsilon\gamma$ . Se muestran secciones representativas a un aumento de 40X con una lente objetivo 10X.

La Figura 9E muestra que se realizó una tinción similar de IHC para globina  $\beta$ h1. En ambos casos se observa una expresión robusta en los eritroblastos dispersos del FL en ratones -/-, pero no en ratones de control.

15 La Figura 9F muestra la expresión de genes de locus de  $\beta$ -globina humana para animales con los diversos genotipos de BCL11A en presencia del transgén YAC de  $\beta$ -locus (YAC+) en E14.5 (n = 4, 6, 4 para los animales fl/+, +/- y -/-, respectivamente) y E18.5 (n = 4, 7, 4). Todos los niveles de  $\gamma$ -globina y  $\beta$ -globina para los diferentes genotipos son significativamente diferentes (P <  $1 \times 10^{-5}$  mediante una prueba t bilateral). Todos los datos se representan como la media  $\pm$  la desviación estándar de la medición.

20 La Figura 10 muestra la incapacidad para recapitular las respuestas de estrés en ratones  $\beta$ -YAC adultos. Se indujeron ratones  $\beta$ -locus adultos con una variedad de respuestas estimuladoras de  $\gamma$ -globina.

La Figura 11 muestra que el ARN de BCL11A se expresa en células definitivas de ratón, pero no en células primitivas.

La Figura 12 muestra que los ratones BCL11A -/- son morfológicamente normales y carecen completamente de la expresión de la proteína BCL11A en el hígado fetal.

25 La Figura 12A son ejemplos de ratones de control (fl/+) y mutantes (-/-) de la misma camada en E18.5. Los ratones se obtuvieron en las proporciones Mendelianas esperadas en E18,5 y los mutantes eran morfológicamente indistinguibles de los compañeros de camada de control.

La Figura 12B son expresión de proteína de datos de BCL11A evaluados en hígados fetales E18.5 y mostraron expresión reducida en animales heterocigóticos, con expresión ausente en animales deficientes. Se analizó GAPDH como un control de carga.

30 La Figura 13 muestra que los ratones BCL11A -/- tienen eritropoyesis fenotípica normal en E18.5. La maduración de eritroides se evaluó utilizando los marcadores CD71 y Ter-119 en los hígados fetales de animales E18.5 (Sankaran, V.G. y colaboradores, 2008, Genes Dev 22, 463-475). Se muestran los valores medios en cada cuadrante (n=9 para los controles y 7 para los animales deficientes).

35 La Figura 14 muestra que los ratones BCL11A -/- tienen morfología eritroide normal. Se muestran ejemplos de preparaciones de citospina a partir de suspensiones de células individuales del hígado fetal teñidas con colorante de May-Grunwald-Giemsa de E14.5 y E18.5. Todas las imágenes se observaron con un objetivo 10X y con las ampliaciones de lente mostradas.

Las Figuras 15A y B son análisis histológicos de hígados fetales de ratones BCL11A -/- que revelan histología general normal y eritropoyesis morfológica.

40 La Figura 15A muestra secciones sagitales mostradas con baja resolución y muestra que no hay anomalías histológicas macroscópicas observadas en estos ratones (con un aumento de 5X).

La Figura 15B muestra secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina (H & E) observadas con dos aumentos (objetivo 10X con una lente 40X) de hígados fetales E14.5 y E18.5. Estas secciones revelan grupos de eritroblastos dentro del hígado fetal que parecen ser similares en cantidad y morfológicamente normales.

45 Las Figuras 16A y 16B muestran que BCL11A -/- tienen una sobrerregulación de las globinas embrionarias en el hígado fetal.

5 La Figura 16A muestra la expresión relativa de ARN de los genes de la globina tipo  $\beta$  para animales de control (BCL11A fl/+), heterocigotos (BCL11A +/-) y animales deficientes (BCL11A -/-) en E14.5 (n = 10, 14, 11 para estos grupos, respectivamente). Adicionalmente se muestra la expresión relativa del ARN de BCL11A. La expresión relativa se normaliza con respecto a GAPDH (con GAPDH ajustado a un valor de 1). Todos los datos se muestran como la media  $\pm$  del error estándar de la medición.

La Figura 16B muestra la expresión relativa de ARN (normalizada para GAPDH) de los genes de globina tipo  $\beta$  para animales de control, animales heterocigotos y animales deficientes en E18.5 (n=9, 9, 7 para estos grupos, respectivamente). Todos los datos se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar.

10 La Figura 17 es la inmunohistoquímica de ratones BCL11A -/- que muestran una sobrerregulación de globinas embrionarias en el hígado fetal. La inmunohistoquímica se realizó en FL E18.5 de animales BCL11A fl/+ y -/- para la globina embrionaria  $\beta$ h1. Se muestran secciones representativas con un aumento de 40X con una lente objetivo 10X. Se realizó una tinción similar de IHC para la globina  $\epsilon$  y marcada en la figura.

La Figura 18A muestra los porcentajes para todos los genes de globina tipo  $\beta$  humana  $\pm$  la desviación estándar en E14.5 en ratones  $\beta$ -Locus cruzados con ratones mutantes BCL11A.

15 La Figura 18A muestra los porcentajes para todos los genes de globina tipo  $\beta$  humana  $\pm$  la desviación estándar en E18.5, en ratones  $\beta$ -Locus cruzados con ratones mutantes BCL11A. Todos los niveles de  $\gamma$ -globina y  $\beta$ -globina para los diferentes genotipos son significativamente diferentes ( $P < 1 \times 10^{-5}$  mediante una prueba t bilateral).

20 La Figura 19 muestra que BCL11A ocupa regiones discretas en el locus de  $\beta$ -globina humana en progenitores eritroides adultos. El locus de  $\beta$ -globina humana se representa en la parte superior con regiones que muestran una unión significativa sombreada en gris en el histograma de la parte de abajo. Los resultados se representan como la media con la desviación estándar como barras de error (n = 3 por grupo).

#### Descripción detallada de la invención

Se describen aquí métodos para la regulación de la síntesis de hemoglobina fetal (HbF) para el tratamiento de  $\beta$ -hemoglobinopatías y métodos de cribado.

25 Los inventores han identificado una nueva función para la proteína BCL11A, a saber, que la proteína BCL11A actúa como un regulador específico de la etapa de la expresión de hemoglobina fetal y que la expresión de BCL11A reprime la inducción de  $\gamma$ -globina. Por consiguiente, se describen métodos para la regulación de la expresión de  $\gamma$ -globina en células eritroides. Más específicamente, estas actividades pueden aprovecharse en métodos para el tratamiento de  $\beta$ -hemoglobinopatías mediante la inducción de  $\gamma$ -globina a través de la inhibición del producto del gen de BCL11A.

30 La hemoglobina fetal (HbF) es un tetrámero de dos polipéptidos de  $\alpha$ -globina adulta y dos polipéptidos de  $\gamma$ -globina tipo  $\beta$  fetal. Durante la gestación, los genes duplicados de  $\gamma$ -globina constituyen los genes predominantes transcritos del locus de la  $\beta$ -globina. Después del nacimiento, la  $\gamma$ -globina se reemplaza progresivamente por  $\beta$ -globina adulta, un proceso denominado como "cambio fetal" (3). Los mecanismos moleculares subyacentes a este cambio han permanecido por largo tiempo indefinidos y han sido objeto de intensas investigaciones. El cambio de desarrollo de la producción de hemoglobina fetal predominantemente a HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) a la producción de hemoglobina adulta o HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) comienza alrededor de las 28 a 34 semanas de gestación y continúa poco después del nacimiento, momento en el cual la HbA se vuelve predominante. Este cambio resulta principalmente de la disminución de la transcripción de los genes de gamma-globina y aumento de la transcripción de los genes de beta-globina. En promedio, la sangre de un adulto normal contiene sólo alrededor del 2% de HbF, aunque los niveles residuales de HbF tienen una variación de más de 20 veces en adultos sanos (Atweh, Semin. Hematol 38 (4): 367-73 (2001)).

45 Las hemoglobinopatías abarcan una serie de anemias de origen genético en las que existen una disminución de la producción y/o una mayor destrucción (hemólisis) de los glóbulos rojos (RBC). Estos trastornos también incluyen defectos genéticos que resultan en la producción de hemoglobinas anormales con una capacidad concomitante disminuida para mantener la concentración de oxígeno. Algunos de estos trastornos implican la falta de producción de  $\beta$ -globina normal en cantidades suficientes, mientras que otros implican el fracaso para producir totalmente  $\beta$ -globina normal. Estos trastornos específicamente asociados con la proteína  $\beta$ -globina se denominan generalmente  $\beta$ -hemoglobinopatías. Por ejemplo, las  $\beta$ -talasemias resultan de un defecto parcial o completo en la expresión del gen de la  $\beta$ -globina, lo que conduce a una HbA deficiente o ausente. La anemia falciforme es el resultado de una mutación puntual en el gen estructural de  $\beta$ -globina, que conduce a la producción de una hemoglobina anormal (falciforme) (HbS).  
50 Los glóbulos rojos de HbS son más frágiles que los normales y experimentan hemólisis más fácilmente, lo que conduce eventualmente a anemia (Atweh, Semin. Hematol., 38: 367-73 (2001)). Además, la presencia de una variante genética BCL11A, variación de HBS1L-MYB, mejora la gravedad clínica en beta-talasemia. Se ha demostrado que esta variante está asociada con los niveles de HbF. Aquí, se demostró que existe una relación impar de 5 para tener una forma menos grave de beta-talasemia con la variante de HbF alta (Galanello S. y colaboradores, 2009, Blood, en impresión).

Recientemente, la búsqueda de un tratamiento dirigido a la reducción del desequilibrio de la cadena de globina en pacientes con  $\beta$ -hemoglobinopatías se ha centrado en la manipulación farmacológica de la hemoglobina fetal ( $\alpha_2\gamma_2$  y HbF). El potencial terapéutico importante de estos enfoques es sugerido por observaciones del fenotipo leve de individuos con herencia conjunta tanto de  $\beta$ -talasemia homocigótica como de persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH), así como por aquellos pacientes con  $\beta$ -talasemia homocigótica que no sintetizan hemoglobina adulta, pero en los que se observa una necesidad reducida de transfusiones en presencia de mayores concentraciones de hemoglobina fetal. Además, se ha observado que ciertas poblaciones de pacientes adultos con anomalías de la cadena P tienen niveles de hemoglobina fetal (HbF) superiores a las normales, y se ha observado que tienen un curso clínico más leve de la enfermedad que los pacientes con niveles adultos normales de HbF. Por ejemplo, un grupo de pacientes de Arabia Saudita con anemia falciforme que expresan 20-30% de HbF tienen sólo manifestaciones clínicas leves de la enfermedad (Pembrey y colaboradores, Br. J. Haematol., 40: 415-429 (1978)). Se acepta ahora que las  $\beta$ -hemoglobinopatías, tales como la anemia falciforme y las  $\beta$ -talasemias, se mejoran por la mayor producción de HbF. (Revisado en Jane y Cunningham, H. J. Haematol, 102: 415-422 (1998) y Bunn, N. Engl. J. Med. 328: 129-131 (1993)).

Aunque actualmente se desconocen los mecanismos moleculares que controlan el cambio de desarrollo *in vivo* de la expresión génica de  $\gamma$ -globina en  $\beta$ -globina, hay acumulación de evidencia de que factores externos pueden influir en la expresión génica de  $\gamma$ -globina. El primer grupo de compuestos descubiertos que tenían actividad de reactivación de HbF eran fármacos citotóxicos. La capacidad para provocar nuevas síntesis de HbF mediante manipulación farmacológica se mostró primero usando 5-azacitidina en animales de experimentación (DeSimone, Proc Natl Acad Sci USA 79 (14): 4428-31 (1982)). Los estudios subsiguientes confirmaron la capacidad de la 5-azacitidina para aumentar la HbF en pacientes con  $\beta$ -talasemia y enfermedad de células falciformes (Ley, y colaboradores, N. Engl. J. Medicine, 307: 1469-1475 (1982) y Ley, y colaboradores, Blood 62: 370-380 (1983)). Experimentos adicionales demostraron que los babuinos tratados con dosis citotóxicas de arabinosilcitosina (ara-C) respondieron con elevaciones sorprendentes de los reticulocitos F (Papayannopoulou y colaboradores, Science 224 (4649): 617-9 (1984)), y que el tratamiento con hidroxurea condujo a la inducción de  $\gamma$ -globina en monos o babuinos (Letvin y colaboradores, N Engl J Med. 310 (14): 869-73 (1984)).

El segundo grupo de compuestos investigados por la capacidad para provocar la actividad de reactivación de HbF fueron ácidos grasos de cadena corta. La observación inicial en las células progenitoras de la sangre del cordón umbilical condujo al descubrimiento de que el ácido  $\gamma$ -aminobutírico puede actuar como un inductor de hemoglobina fetal (Perrine y colaboradores, Biochem Biophys Res Commun. 148 (2): 694-700 (1987)). Estudios posteriores mostraron que el butirato estimulaba la producción de globina en babuinos adultos (Constantoulakis y colaboradores, Blood. Dic., 72 (6): 1961-7 (1988)) e indujo  $\gamma$ -globina en progenitores eritroides en animales o pacientes adultos con anemia falciforme (Perrine y colaboradores, Blood. 74 (1): 454-9 (1989)). Los derivados de ácidos grasos de cadena corta tales como fenilbutirato (Dover y colaboradores, Br J Haematol. 88 (3): 555-61 (1994)) y ácido valproico (Liakopoulou y colaboradores, 1: Blood. 186 (8): 3227-35 (1995)) también han demostrado que inducen HbF *in vivo*. Dado el gran número de análogos de ácidos grasos de cadena corta o derivados de esta familia, hay una serie de compuestos potenciales de esta familia más potentes que el butirato. Los ácidos fenilacéticos y fenilalquilicos (Torkelson y colaboradores, Blood Cells Mol Dis., 22 (2): 150-8 (1996)), que se descubrieron durante estudios posteriores, se consideraron inductores potenciales de HbF ya que pertenecían a esta familia de compuestos. En la actualidad, sin embargo, el uso de butirato o sus análogos en la anemia falciforme y  $\beta$ -talasemia sigue siendo experimental y no puede ser recomendado para el tratamiento fuera de los ensayos clínicos.

Los ensayos clínicos dirigidos a la reactivación de la síntesis de hemoglobina fetal en anemia falciforme y  $\beta$ -talasemia han incluido la administración a corto y largo plazo de compuestos tales como 5-azacitidina, hidroxurea, eritropoyetina humana recombinante y análogos de ácido butírico, así como combinaciones de estos agentes. Después de estos estudios, la hidroxurea se usó para la inducción de HbF en seres humanos y más tarde se convirtió en el primer y único fármaco aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) para el tratamiento de hemoglobinopatías. Sin embargo, diversos inconvenientes han contraindicado el uso a largo plazo de tales agentes o terapias, incluyendo efectos secundarios no deseados y variabilidad en las respuestas de los pacientes. Por ejemplo, mientras que la hidroxurea estimula la producción de HbF y se ha demostrado que reduce clínicamente la crisis falciforme, está potencialmente limitada por la mielotoxicidad y el riesgo de carcinogénesis. También podría existir una posible carcinogenicidad a largo plazo en terapias basadas en 5-azacitidinas. Las terapias basadas en la eritropoyetina no han demostrado ser consistentes entre un rango de poblaciones de pacientes. La semivida corta del ácido butírico *in vivo* ha sido vista como un obstáculo potencial en la adaptación de estos compuestos para su uso en intervenciones terapéuticas. Además, son necesarias dosis muy elevadas de ácido butírico para inducir la expresión génica de la  $\gamma$ -globina, requiriendo una cateterización para la infusión continua del compuesto. Además, estas altas dosificaciones de ácido butírico pueden estar asociadas con neurotoxicidad y daño multiorgánico (Blau, y colaboradores, Blood 81: 529-537 (1993)). Aunque incluso los aumentos mínimos en los niveles de HbF son útiles en la enfermedad de células falciformes, las  $\beta$ -talasemias requieren un aumento mucho mayor que no se consigue de forma fiable o segura por ninguno de los agentes utilizados actualmente (Olivieri, Seminars in Hematology 33: 24-42 1996)).

La identificación de reguladores naturales de la inducción y producción de HbF podría proporcionar un medio para idear intervenciones terapéuticas que superen los diversos inconvenientes de los compuestos descritos anteriormente. Los recientes estudios de asociación a nivel genómico han dado una idea de la base genética de numerosas enfermedades

5 y rasgos complejos (McCarthy y colaboradores, Nat Rev Genet 9, 356 (2008) y Manolio et al J Clin Invest 118, 1590 (2008). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos, el vínculo funcional entre una asociación genética y la fisiopatología subyacente sigue sin ser descubierta. El nivel de hemoglobina fetal (HbF) se hereda como rasgo  
 10 de las  $\beta$ -hemoglobinopatías principales, la anemia falciforme y la  $\beta$ -talasemia (Nathan y colaboradores, Nathan and Oski's, hematology of infancy and childhood, sexta edición, página. 2 (Xiv, 1864, xli p.) 2003)). Dos estudios de asociación en todo el genoma han identificado tres loci principales que contienen un conjunto de cinco polimorfismos comunes de un solo nucleótido (SNP) que representan aproximadamente el 20% de la variación en los niveles de HbF (Lettre y colaboradores, Proc Natl Acad Sci EE.UU, 2008; Uda y colaboradores, Proc Natl Acad Sci EE.UU, 105, 1620 (2008), Menzel y colaboradores, Nat Genet 39, 1197 (2007)). Por otra parte, varias de estas variantes parecen predecir la gravedad clínica de la anemia falciforme (Lettre y colaboradores, Proc Natl Acad Sci EE.UU, 2008) y al menos uno de estos SNP también puede afectar el resultado clínico en  $\beta$ -talasemia (Uda y colaboradores, Proc Natl Acad Sci EE.UU, 105, 1620 (2008)). El SNP con el mayor efecto, que explica más del 10% de la variación en HbF, se encuentra en el  
 15 segundo intrón de un gen en el cromosoma 2, BCL11A. Mientras que se ha investigado BCL11A, un factor de transcripción de dedos de zinc de tipo  $C_2H_2$ , por su papel en el desarrollo de linfocitos (Liu y colaboradores, Nat Immunol 4, 525 (2003) y Liu y colaboradores, Mol Cancer 5, 18 (2006)), su papel en la producción de glóbulos rojos o la regulación de los genes de la globina no se ha evaluado previamente.

20 Al comienzo de la era del ADN recombinante, los estudios de la estructura del gen de la globina proporcionaron una base molecular fuerte para cuestionar el cambio de la globina fetal. Un esfuerzo considerable se ha centrado en la delineación de los elementos cis en el locus  $\beta$ -globina necesaria para la regulación adecuada de los genes dentro de la agrupación de la globina tipo  $\beta$ . Estos estudios se basaron en mutaciones naturales y supresiones que influyen drásticamente en los niveles de HbF en adultos y se han complementado con la generación de ratones transgénicos que albergan porciones de la agrupación (Nathan y colaboradores, Nathan y Oski's, hematology of infancy and childhood sexta edición, página. 2 v. (Xiv, 1864, xli p.) 2003) y G. Stamatoyannopoulos, Exp Hematol 33, 259 (2005)). Aunque los elementos cis precisos requeridos para el cambio de globina siguen siendo mal definidos, los hallazgos en ratones transgénicos han indicado fuertemente que los genes de la  $\gamma$ -globina son silenciados de forma autónoma en la etapa adulta, un hallazgo que es más compatible con la ausencia de activadores específicos de la etapa fetal o la presencia de un represor específico de la etapa. Los resultados de estudios recientes de asociación genética proporcionan genes candidatos para cuestionar su participación en el control de los genes de la  $\gamma$ -globina, tales como BCL11A.

Se identificó un nuevo represor específico de la etapa de los genes de  $\gamma$ -globina, a saber BCL11A, en donde la expresión de la proteína BCL11A actúa como un regulador negativo de la expresión de los genes de  $\gamma$ -globina.

#### Métodos para aumentar la hemoglobina fetal en una célula

35 La presente invención proporciona métodos mejorados para aumentar la producción de hemoglobina fetal en una célula, mediante la administración de composiciones que contienen inhibidores de BCL11A. Los datos demuestran que la inhibición de BCL11A conduce a una mayor expresión de los genes de  $\gamma$ -globina, y agentes en los cuales lograr esta inhibición.

Como se describe aquí, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula.

40 Se describe un procedimiento para aumentar los niveles de hemoglobina fetal expresados por una célula, que comprende las etapas de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética con una cantidad eficaz de una composición que comprende un inhibidor de BCL11A, por lo que la expresión de hemoglobina fetal se incrementa en la célula o su progenie, con respecto a la célula antes de tal contacto.

45 En relación con el contacto de una célula con un inhibidor de BCL11A, el "aumento de los niveles de hemoglobina fetal" en una célula indica que la hemoglobina fetal es al menos 5% mayor en poblaciones tratadas con un inhibidor de BCL11A, que en una población de control comparable, en donde no está presente ningún inhibidor de BCL11A. Se prefiere que el porcentaje de expresión de hemoglobina fetal en una población tratada con inhibidor de BCL11A sea al menos 10% mayor, al menos 20% mayor, al menos 30% mayor, al menos 40% mayor, al menos 50% mayor, al menos 60% al menos un 70% mayor, al menos un 80% mayor, al menos un 90% mayor, al menos 1 vez mayor, al menos 2 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 100 veces mayor, al menos 1000 veces mayor, o más que una población tratada de control de tamaño y condiciones de cultivo comparables. El término "población tratada de control" se usa aquí para describir una población de células que ha sido tratada con medios idénticos, inducción vírica, secuencias de ácido nucleico, temperatura, confluencia, tamaño del matraz, pH, etc., con la excepción de la adición del inhibidor BCL11A.

55 Un "inhibidor" de BCL11A, tal como se utiliza aquí el término, puede funcionar de una manera competitiva o no competitiva, y puede funcionar interfiriendo con la expresión de la proteína BCL11A. Cualquiera de una serie de enfoques diferentes se pueden tomar para inhibir la expresión o actividad de BCL11A. Un inhibidor de BCL11A incluye

cualquier entidad química o biológica que, tras el tratamiento de una célula, da como resultado la inhibición de la actividad biológica causada por la activación de BCL11A en respuesta a señales celulares. Los inhibidores de BCL11A como se describen aquí, incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, intracuerpos, aptámeros, constructos antisentido, agentes de ARN de interferencia y ribozimas.

## 5 Inhibidores de anticuerpos de BCL11A

Los anticuerpos que se unen específicamente a BCL11A se pueden usar para la inhibición del factor *in vivo*. Los anticuerpos para BCL11A están disponibles comercialmente y pueden ser obtenidos por un experto en la técnica usando métodos bien conocidos. La actividad inhibidora de BCL11A de un anticuerpo dado o, para este caso, cualquier inhibidor de BCL11A, se puede evaluar usando métodos conocidos en la técnica o descritos en la presente memoria, para evitar dudas, un anticuerpo que inhibe BCL11A causará un aumento en la expresión de hemoglobina fetal. Los inhibidores de anticuerpo de BCL11A pueden incluir anticuerpos policlonales y monoclonales y derivados de unión a antígenos o fragmentos de los mismos. Los fragmentos de unión al antígeno bien conocidos incluyen, por ejemplo, anticuerpos de dominio único (dAb; que consisten esencialmente en dominios de anticuerpo VL o VH individuales), fragmento Fv, incluyendo fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), fragmento Fab, y fragmento F(ab')<sub>2</sub>. Los métodos para la construcción de tales moléculas de anticuerpo son bien conocidos en la técnica.

## Inhibidores de ácidos nucleicos de la expresión de BCL11A

Un enfoque poderoso para inhibir la expresión de polipéptidos objetivo seleccionados es a través del uso de agentes de ARN de interferencia. El ARN de interferencia (ARNi) utiliza dúplex de ARN pequeño de interferencia (ARNpi) que dirigen al ARN mensajero que codifica al polipéptido objetivo para degradación selectiva. El silenciamiento postranscripcional que depende de ARNpi de la expresión del gen implica escisión de la molécula de ARN mensajero objetivo en un sitio guiado por el ARNpi. El "ARN de interferencia (ARNi)" es un proceso conservado evolutivamente mediante el cual la expresión o introducción de ARN de una secuencia que es idéntica o muy similar a un gen objetivo da como resultado la degradación específica de la secuencia o silenciamiento génico postranscripcional específico (PTGS) de ARN mensajero (ARNm) transcrito a partir de ese gen objetivo (véase Coburn, G. y Cullen, B. (2002) *J. of Virology* 76 (18): 9225), que inhibe de este modo la expresión del gen objetivo. El ARN puede ser ARN bicatenario (ARNbc). Este proceso se ha descrito en células de plantas, invertebrados y mamíferos. En la naturaleza, el ARNi es iniciado por la endonucleasa Dicer específica de ARNbc, que promueve la escisión procesiva de ARNbc largo en fragmentos bicatenarios llamados ARNpi. Los ARNpi se incorporan en un complejo de proteína (denominado "complejo de silenciamiento inducido por ARN", o "RISC") que reconoce y escinde los ARNm objetivo. El ARNi también puede iniciarse mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, ARNpi sintético o agentes de ARN de interferencia, para inhibir o silenciar la expresión de genes objetivo. Como se usa en la presente memoria, "inhibición de la expresión del gen objetivo" incluye cualquier disminución en la expresión o actividad de la proteína o nivel del gen objetivo o proteína codificada por el gen objetivo en comparación con una situación en donde no se ha inducido ARN de interferencia. La disminución será de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% o más en comparación con la expresión de un gen objetivo o la actividad o nivel de la proteína codificada por un gen objetivo que no ha sido dirigido por un agente de ARN de interferencia.

Los términos "agente de ARN de interferencia" y "ARN de interferencia", tal como se usan en la presente memoria, pretenden abarcar aquellas formas de silenciamiento de genes mediadas por ARN bicatenario, independientemente de si el agente de ARN de interferencia comprende un ARNpi, ARNmi, ARNph u otra molécula de ARN bicatenario. El "ARN corto de interferencia" (ARNpi), también denominado en la presente memoria como "ARN pequeño de interferencia", se define como un agente de ARN que funciona para inhibir la expresión de un gen objetivo, por ejemplo, por ARNi. Un ARNpi puede ser sintetizado químicamente, puede ser producido por transcripción *in vitro* o puede producirse dentro de una célula huésped. El ARNpi puede ser una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) de aproximadamente 15 hasta aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 15 hasta aproximadamente 28 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 19 hasta aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente de aproximadamente 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos de longitud, y puede contener una saliente 3' y/o 5' en cada hebra que tiene una longitud de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos. La longitud de la saliente es independiente entre las dos hebras, es decir, la longitud de la saliente en una hebra no depende de la longitud de la saliente en la segunda hebra. Preferiblemente, el ARNpi es capaz de promover ARN de interferencia a través de degradación o silenciamiento génico postranscripcional específico (PTGS) del ARN mensajero objetivo (ARNm).

Los ARNpi también incluyen ARN pequeño de horquilla (también llamado bucle madre) (ARNph). Estos ARNph pueden estar compuestos de una cadena antisentido corta (por ejemplo, de aproximadamente 19 hasta aproximadamente 25 nucleótidos), seguida por un bucle de nucleótidos de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 9 nucleótidos, y la cadena sentido análoga. Alternativamente, la cadena sentido puede preceder a la estructura de bucle de nucleótidos y la cadena puede seguir antisentido. Estos ARNph pueden estar contenidos en plásmidos, retrovirus y lentivirus y expresados, por ejemplo, a partir del promotor pol III U6, u otro promotor (véase, por ejemplo, Stewart y colaboradores, (2003) *RNA* Abr. 9 (4): 493-501). El gen o secuencia objetivo del agente de ARN de interferencia puede ser un gen celular o una secuencia genómica, por ejemplo, la secuencia BCL11A. Un ARNpi puede ser sustancialmente homólogo

al gen o secuencia genómica objetivo, o un fragmento del mismo. Tal como se utiliza en este contexto, el término "homólogo" se define por ser sustancialmente idéntico, suficientemente complementario o similar al ARNm objetivo, o un fragmento del mismo, para efectuar la interferencia de ARN del objetivo. Además de las moléculas de ARN nativo, el ARN adecuado para inhibir o interferir con la expresión de una secuencia objetivo incluye derivados y análogos de ARN. Preferiblemente, el ARNpi es idéntico a su objetivo. Preferiblemente, el ARNpi dirige solamente una secuencia. Cada uno de los agentes de ARN de interferencia, tales como ARNpi, pueden ser seleccionados para efectos potenciales fuera del objetivo, por ejemplo, perfiles de expresión. Tales métodos son conocidos por un experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Jackson y colaboradores Nature Biotechnology 6: 635-637, 2003. Además del perfil de expresión, se puede seleccionar también las secuencias objetivo potenciales para secuencias similares en las bases de datos de secuencias para identificar secuencias potenciales que pueden tener efectos fuera del objetivo. Por ejemplo, de acuerdo con Jackson y colaboradores (Id.), 15 o tal vez tan pocos como 11 nucleótidos contiguos, de identidad de secuencia son suficientes para dirigir el silenciamiento de transcritos no dirigidos. Por lo tanto, se puede seleccionar inicialmente los ARNpi propuestos para evitar el silenciamiento potencial fuera del objetivo utilizando el análisis de identidad de secuencia por cualquier método conocido de comparación de secuencias, tal como BLAST. Se seleccionan las secuencias de ARNpi para maximizar la incorporación de la cadena antisentido (guía) del ARNpi en RISC y por lo tanto maximizar la capacidad de RISC para dirigir el ARNm del GGT humano para degradación. Esto puede conseguirse explorando secuencias que tienen la energía libre más baja de unión en el extremo terminal 5' de la cadena antisentido. La menor energía libre conduce a una mejora del desenrollamiento del extremo 5' de la cadena antisentido del dúplex de ARNpi, asegurando así que la cadena antisentido será absorbida por RISC y dirigirá la escisión específica de secuencia del ARNm de BCL11A humana. Las moléculas de ARNpi no necesitan estar limitadas a aquellas moléculas que contienen sólo ARN, sino, por ejemplo, abarcan además nucleótidos y no nucleótidos químicamente modificados, y también incluyen moléculas en las que una molécula de azúcar de ribosa se sustituye por otra molécula de azúcar o una molécula que realiza una función similar. Además, se puede usar un enlace no natural entre los residuos de nucleótidos, tal como un enlace fosforotioato. La cadena de ARN puede derivarse con un grupo funcional reactivo de un grupo indicador, tal como un fluoróforo. Derivados particularmente útiles se modifican en un extremo terminal o terminales de una cadena de ARN, típicamente el extremo terminal 3' de la cadena sentido. Por ejemplo, el 2'-hidroxilo en el extremo terminal 3' puede formar derivados fácil y selectivamente con una variedad de grupos. Otros derivados útiles de ARN incorporan nucleótidos que tienen unidades funcionales carbohidrato modificados, tales como residuos de 2'-O-alquilados o derivados de 2'-O-metil ribosilo y derivados de 2'-O-fluoro ribosilo. También pueden ser modificadas las bases de ARN. Puede utilizarse cualquier base modificada útil para inhibir o interferir con la expresión de una secuencia objetivo. Por ejemplo, se pueden incorporar bases halogenadas, tales como 5-bromouracilo y 5-yodouracilo. Las bases también pueden alquilarse, por ejemplo, se puede incorporar 7-metilguanosa en lugar de un residuo de guanosa. También se pueden incorporar bases no naturales que producen una inhibición exitosa. Las modificaciones de ARNpi más preferidas incluyen 2'-desoxi-2'-fluorouridina o nucleótidos de ácido nucleico bloqueados (LAN) y dúplex de ARN que contienen ya sea fosfodiéster o un número variable de enlaces fosforotioato. Dichas modificaciones son conocidas por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Braasch y colaboradores, Biochemistry, 42: 7967-7975, 2003. La mayoría de las modificaciones útiles de las moléculas de ARNpi pueden ser introducidas utilizando química establecidas para la tecnología de oligonucleótidos antisentido. Preferiblemente, las modificaciones implican una modificación mínima de 2'-O-metilo, preferiblemente excluyendo dicha modificación. Las modificaciones también excluyen preferiblemente las modificaciones de los grupos 5'-hidroxilo libres del ARNpi. Los ejemplos de la presente memoria proporcionan ejemplos específicos de agentes de ARN de interferencia, tales como moléculas de ARNph que dirigen eficazmente el ARNm de BCL11A.

En una realización preferida, el agente de ARN de interferencia se suministra o administra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Pueden añadirse agentes portadores adicionales, tales como liposomas, al vehículo farmacéuticamente aceptable. El agente de ARN de interferencia puede ser suministrado mediante un vector que codifica ARN pequeño de horquilla (ARNph) en un portador farmacéuticamente aceptable a las células en un órgano de un individuo. El ARNph es convertido por las células después de la transcripción en ARNpi capaz de dirigir, por ejemplo, BCL11A.

El vector puede ser un vector regulable, tal como vector inducible de tetraciclina. Se pueden utilizar los métodos descritos, por ejemplo, en Wang y colaboradores Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5103-5106, que usan vectores pTet-On (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Los agentes de ARN de interferencia usados en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser absorbidos activamente por células *in vivo* después de inyección intravenosa, por ejemplo, inyección hidrodinámica, sin el uso de un vector, que ilustra la administración eficiente *in vivo* de los agentes de ARN de interferencia. Un método para administrar los ARNpi es el cateterismo del vaso sanguíneo de suministro del órgano objetivo. También se pueden emplear otras estrategias para el suministro de los agentes de ARN de interferencia, por ejemplo, los ARNpi o los ARNph usados en los métodos descritos aquí, tales como, por ejemplo, suministro por un vector, por ejemplo, un vector plasmídico o viral, por ejemplo, un vector lentiviral. Tales vectores pueden usarse como se describe, por ejemplo, en Xiao-Feng Qin y colaboradores Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 100: 183-188. Otros métodos de administración incluyen el suministro de los agentes de ARN de interferencia, por ejemplo, los ARNpi o los ARNph descritos aquí, usando un péptido básico conjugando o mezclando el agente de ARN de interferencia de con un péptido básico, por ejemplo un fragmento de un péptido TAT, mezclando con lípidos catiónicos o formulación en partículas. Los agentes de ARN de interferencia, por ejemplo, los ARNsi dirigidos al ARNm de BCL11A, pueden administrarse individualmente, o en combinación con otros agentes de ARN de interferencia, por ejemplo

ARNpi, tales como, por ejemplo, ARNpi dirigidos a otros genes celulares. Los ARNpi de BCL11A también se pueden administrar en combinación con otros agentes farmacéuticos que se usan para tratar o prevenir enfermedades o trastornos asociados con estrés oxidativo, especialmente enfermedades respiratorias, y más especialmente asma. Las moléculas de ARNpi sintéticas, incluyendo las moléculas de ARNph, se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la molécula de ARNpi puede ser sintetizada químicamente o producida en forma recombinante usando métodos conocidos en la técnica, tales como usando fosforamidas ribonucleósidas adecuadamente protegidas y un sintetizador de ADN/ARN convencional (véase, por ejemplo, Elbashir, S.M. y colaboradores (2001) *Nature* 411: 494-498; Elbashir, SM, W. Lendeckel y T. Tuschl (2001) *Genes & Development* 15: 188-200; Harborth, J. y colaboradores, (2001) *J. Cell Science* 114: 4557-4565; Masters, JR y colaboradores (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 98: 8012-8017, y Tuschl, T. y colaboradores (1999) *Genes & Development* 13: 3191-3197). Alternativamente, están disponibles varios proveedores comerciales de síntesis de ARN, incluyendo pero sin limitarse a, Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE.UU.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, EE.UU.) Glen Research (Sterling, VA, EE.UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE.UU.) y Cruachem (Glasgow, RU). Como tal, las moléculas de ARNpi no son demasiado difíciles de sintetizar y se proporcionan fácilmente en una calidad adecuada para ARNi. Además, los ARNbc pueden SER expresados como estructuras de bucle de vástago codificadas por vectores plasmídicos, retrovirus y lentivirus (Paddison, PJ y colaboradores (2002) *Genes Dev.* 16: 948-958, McManus, MT y colaboradores (2002) *RNA* 8: 842-850, Paul, CP y colaboradores (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20: 505-508, Miyagishi, M. y colaboradores (2002) *Nat. Biotechnol.* 20: 497-500 Sui, G. y colaboradores (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 99: 5515-5520; Brummelkamp, T. y colaboradores (2002) *Cancer Cell* 2: 243; Lee, NS y colaboradores (2002) *Nat. Biotechnol.* 20: 500-505; Yu, J.Y., y colaboradores (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 99:6047-6052; Zeng, Y., y colaboradores (2002) *Mol. Cell* 9:1327-1333; Rubinson, D.A., y colaboradores (2003) *Nat. Genet.* 33:401-406; Stewart, S.A., y colaboradores (2003) *RNA* 9:493-501). Estos vectores tienen generalmente un promotor polIII secuencia arriba del ARNbc y pueden expresar cadenas de ARN sentido y antisentido por separado y/o como estructuras de horquilla. Dentro de las células, Dicer procesa el ARN corto de horquilla (ARNph) en ARNpi efectivo. La región objetivo de la molécula de ARNpi puede seleccionarse de una secuencia génica objetivo dada, por ejemplo, una secuencia que codifica BCL11A, comenzando desde aproximadamente 25 a 50 nucleótidos, de aproximadamente 50 hasta 75 nucleótidos o de aproximadamente 75 hasta 100 nucleótidos secuencia abajo del codón de inicio. Las secuencias de nucleótidos pueden contener UTR 5' o 3' y regiones próximas al codón de inicio. Un método para diseñar una molécula de ARNpi implica identificar el motivo de la secuencia de 23 nucleótidos AA(N19)TT (SEQ ID NO: 21) (donde N puede ser cualquier nucleótido) y seleccionar éxitos con al menos 25%, 30%, 35% , 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75% de contenido G/C. La porción "TT" de la secuencia es opcional. Alternativamente, si no se encuentra tal secuencia, la búsqueda se puede extender usando el motivo NA(N21), donde N puede ser cualquier nucleótido. En esta situación, el extremo 3' del ARNpi sentido se puede convertir en TT para permitir la generación de un dúplex simétrico con respecto a la composición de secuencia de las salientes 3' sentido y antisentido. La molécula de ARNpi antisentido puede sintetizarse entonces como el complemento para las posiciones de nucleótidos 1 a 21 del motivo de la secuencia de 23 nucleótidos. El uso de salientes simétricas 3' TT puede ser ventajosa para garantizar que se formen las pequeñas partículas de ribonucleoproteína de interferencia (RNPPi) con relaciones aproximadamente iguales de RNPPi que escinde ARN objetivo sentido y antisentido (Elbashir y colaboradores, (2001) citado más arriba y Elbashir y colaboradores, 2001 citado más arriba). El análisis de bases de datos de secuencia, que incluye, pero no se limita a, NCBI, BLAST, Derwent y GenSeq, así como las compañías de oligosíntesis comercialmente disponibles tales como OLIGOENGINE®, también se pueden usar para seleccionar secuencias de ARNpi contra bibliotecas de EST para asegurar que sólo un gen sea dirigido.

#### Suministro de agentes de ARN de interferencia

Los métodos de suministro de agentes ARN de interferencia, por ejemplo, un ARNpi, o vectores que contienen un agente ARN de interferencia, a las células objetivo, por ejemplo, linfocitos u otras células objetivo deseadas, para captación incluyen inyección de una composición que contiene el agente de ARN de interferencia, por ejemplo, un ARNpi, o poniendo en contacto directamente la célula, por ejemplo, un linfocito, con una composición que comprende un agente de ARN de interferencia, por ejemplo, un ARNpi. El agente ARN de interferencia, por ejemplo, un ARNpi puede inyectarse directamente en cualquier vaso sanguíneo, tal como una vena, arteria, vénula o arteriola, a través, por ejemplo, de inyección hidrodinámica o cateterización. La administración puede ser por una sola inyección o por dos o más inyecciones. El agente ARN de interferencia puede ser suministrado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden usar simultáneamente uno o más agentes ARN de interferencia. Únicamente se puede usar un ARNpi que se dirige BCL11A humana. Las células específicas pueden ser dirigidas con ARN de interferencia, limitando los efectos secundarios potenciales de ARN de interferencia causados por la direccionamiento no específico de ARN de interferencia. El método puede utilizar, por ejemplo, un complejo o una molécula de fusión que comprende una unidad funcional de direccionamiento celular y una unidad funcional de unión a ARN de interferencia que se utiliza para suministrar eficazmente ARN de interferencia en células. Por ejemplo, una proteína de fusión anticuerpo-protamina cuando se mezcla con ARNpi, se une a ARNpi y suministra selectivamente el ARNpi en células que expresan un antígeno reconocido por el anticuerpo, dando como resultado el silenciamiento de la expresión génica solamente en aquellas células que expresan el antígeno. El ARNpi o la molécula inductora de ARN de interferencia que se une a la unidad funcional puede ser una proteína o un dominio de unión a ácido nucleico o fragmento de una proteína, y la unidad funcional de unión puede fusionarse a una porción de la unidad funcional objetivo. La ubicación de la unidad funcional objetivo puede estar ya sea en el extremo terminal carboxilo o en el extremo terminal amino del constructo o

en el medio de la proteína de fusión. También se puede emplear un mecanismo de suministro mediado por virus para administrar ARNpi a células *in vitro* e *in vivo* como se describe en Xia, H. y colaboradores (2002) Nat Biotechnol 20 (10): 1006). También se pueden emplear mecanismos de suministro mediados por plásmidos o vectores de ARNph para suministrar ARNph a células *in vitro* e *in vivo* como se describe en Rubinson, D.A. y colaboradores ((2003) Nat. Genet. 33: 401-406) y Stewart, S.A., y colaboradores ((2003) RNA 9: 493-501). Los agentes de ARN de interferencia, por ejemplo los ARNpi o los ARNph, pueden ser introducidos junto con los componentes que realizan una o más de las siguientes actividades: mejora la incorporación de los agentes ARN de interferencia, por ejemplo, ARNpi, por la célula, por ejemplo, linfocitos u otras células, inhiben la hibridación de cadenas individuales, estabilizan las cadenas sencillas, o bien facilitan el suministro a la célula objetivo y aumentan la inhibición del gen objetivo, por ejemplo, BCL11A. La dosis del agente particular de ARN de interferencia estará en una cantidad necesaria para efectuar la interferencia de ARN, por ejemplo, silenciamiento génico postraduccional (PTGS), del gen objetivo particular, conduciendo de este modo a la inhibición de la expresión génica objetivo o inhibición de actividad o nivel de la proteína codificada por el gen objetivo.

De acuerdo con la invención, la célula progenitora hematopoyética se pone en contacto *ex vivo* o *in vitro*. En una realización específica, la célula que se pone en contacto es una célula del linaje eritroide. De acuerdo con la invención, la composición inhibe la expresión de BCL11A.

Como se usa aquí la expresión "célula progenitora hematopoyética", se refiere a células de un linaje celular madre que da lugar a todos los tipos de células sanguíneas incluyendo los linajes mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas), y linfoides (células T, células B, células NK). Una "célula del linaje eritroide" indica que la célula que se pone en contacto es una célula que experimenta eritropoyesis de tal manera que tras la diferenciación final forma un eritrocito o glóbulo rojo (RBC). Tales células pertenecen a uno de los tres linajes, eritroide, linfoide y mieloides, que se originan a partir de células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea. Tras la exposición a factores de crecimiento específicos y otros componentes del microambiente hematopoyético, las células progenitoras hematopoyéticas pueden madurar a través de una serie de tipos celulares de diferenciación intermedia, todos intermediarios del linaje eritroide, en RBC. Por lo tanto, las células del "linaje eritroide", tal como se utiliza el término aquí, comprenden células progenitoras hematopoyéticas, rubriblastos, prorubricitas, eritroblastos, metarrubricitos, reticulocitos y eritrocitos.

La célula progenitora hematopoyética puede tener al menos uno de los marcadores de superficie celular característicos de las células progenitoras hematopoyéticas: CD34+, CD59+, Thy1/CD90+, CD38<sup>lo</sup>- y C-kit /CD117+. Preferiblemente, las células progenitoras hematopoyéticas tienen varios de estos marcadores.

Las células progenitoras hematopoyéticas del linaje eritroide pueden tener el marcador de superficie celular característico del linaje eritroide: CD71 y Ter119.

Las células madre, tales como las células progenitoras hematopoyéticas, son capaces de proliferación y dan lugar a más células progenitoras que tienen la capacidad de generar un gran número de células madre que a su vez pueden dar lugar a células hijas diferenciadas o diferenciables. Las propias células hijas pueden ser inducidas para proliferar y producir progenie que posteriormente se diferencian en uno o más tipos de células maduras, al mismo tiempo que conservan una o más células con potencial de desarrollo parental. El término "célula madre" se refiere entonces, a una célula con la capacidad o potencial, bajo circunstancias particulares, para diferenciarse en un fenotipo más especializado o diferenciado, y que conserva la capacidad, en ciertas circunstancias, de proliferar sin diferenciarse sustancialmente. En una realización, el término progenitor o célula madre se refiere a una célula madre generalizada cuyos descendientes (progenie) se especializan, a menudo en direcciones diferentes, por diferenciación, por ejemplo, adquiriendo caracteres completamente individuales, como ocurre en la diversificación progresiva de células y tejidos embrionarios. La diferenciación celular es un proceso complejo que ocurre típicamente a través de muchas divisiones de la célula. Una célula diferenciada puede derivar de una célula multipotente que a su vez se deriva de una célula multipotente, y así sucesivamente. Aunque cada una de estas células multipotentes puede considerarse células madre, el rango de tipos de células que cada una puede dar lugar puede variar considerablemente. Algunas células diferenciadas también tienen la capacidad de dar lugar a células de mayor potencial de desarrollo. Dicha capacidad puede ser natural o puede ser inducida artificialmente tras el tratamiento con diversos factores. En muchos casos biológicos, las células madre son también "multipotentes" porque pueden producir progenie de más de un tipo de célula distinta, pero esto no es necesario para "pluripotencialidad". La autorrenovación es la otra parte clásica de la definición de célula madre, y es esencial como se usa en este documento. En teoría, la autorrenovación puede ocurrir por cualquiera de los dos mecanismos principales. Las células madre pueden dividirse asimétricamente, con una hija reteniendo el estado madre y la otra hija expresando alguna otra función y fenotipo específicos. Alternativamente, algunas de las células madre de una población pueden dividirse simétricamente en dos vástagos, manteniendo así algunas células madre en la población como un todo, mientras que otras células de la población dan lugar a progenie diferenciada solamente. Generalmente, las "células progenitoras" tienen un fenotipo celular que es más primitivo (es decir, está en un paso anterior a lo largo de una vía de desarrollo o progresión que una célula completamente diferenciada). A menudo, las células progenitoras también tienen potencial proliferativo significativo o muy alto. Las células progenitoras pueden dar lugar a múltiples tipos diferenciados de células o a un único tipo celular diferenciado, dependiendo de la vía de desarrollo y del entorno en el que las células se desarrollan y se diferencian.

5 En el contexto de la ontogenia celular, el adjetivo "diferenciado" o "que se diferencia" es un término relativo. Una "célula diferenciada" es una célula que ha progresado aún más en la ruta de desarrollo que la célula con la que se está comparando. Por lo tanto, las células madre pueden diferenciarse a células precursoras de linaje restringido (tal como una célula progenitora hematopoyética), que a su vez puede diferenciarse en otros tipos de células precursoras más adelante en el proceso (tal como un precursor de eritrocitos) y luego hasta una célula completamente diferenciada, tal como un eritrocito, que desempeña un papel característico en un cierto tipo de tejido, y puede o no conservar la capacidad de proliferar aún más.

10 El inhibidor de la expresión de BCL11A puede ser una molécula pequeña o, de acuerdo con la invención, es un ácido nucleico. Preferiblemente, el inhibidor de la expresión de BCL11A es un agente de ARN de interferencia específico de BCL11A, o un vector que codifica dicho agente de ARN de interferencia específico de BCL11A. En una realización específica, el agente de ARN de interferencia comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1-6.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "molécula pequeña" se refiere a un agente químico que incluye, pero no se limita a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, aptámeros, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, que incluyen compuestos heterorgánicos y organometálicos) que tienen un peso molecular aproximadamente inferior a 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular aproximadamente inferior a 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular aproximadamente inferior a 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular aproximadamente inferior a 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

20 Un "ácido nucleico", tal como se describe en el presente documento, puede ser ARN o ADN, y puede ser monocatenario o bicatenario y puede seleccionarse, por ejemplo, de un grupo que incluye: ácido nucleico que codifica una proteína de interés, oligonucleótidos, análogos de ácidos nucleicos, por ejemplo ácido peptidonucleico (PNA), PNA pseudo-complementario (pc-PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA) etc. Tales secuencias de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas, por ejemplo que actúan como represores transcripcionales, moléculas antisentido, ribozimas, secuencias de ácido nucleico pequeñas inhibitorias, por ejemplo pero no se limitan a ARNi, ARNi-ph, ARNpi, micro ARNi (mARN), oligonucleótidos antisentido, etc.

También se describe aquí un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero.

30 Por lo tanto, se describe un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que requiera del mismo, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética en el mamífero con una cantidad efectiva de una composición que comprende un inhibidor de BCL11A, por lo cual aumenta la expresión de hemoglobina fetal, con relación a la expresión previa a dicho contacto.

35 En relación con el contacto de una célula en un mamífero con un inhibidor de BCL11A, "el aumento de los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero" indica que la hemoglobina fetal en el mamífero es al menos 5% más alta en poblaciones tratadas con un inhibidor de BCL11A, que una población de control comparable, en donde no está presente el inhibidor de BCL11A. Se prefiere que la expresión de la hemoglobina fetal en un mamífero tratado con inhibidor de BCL11A sea al menos un 10% mayor, al menos un 20% mayor, al menos un 30% mayor, al menos un 40% mayor, al menos un 50% mayor, al menos un 70% mayor, al menos un 80% mayor, al menos un 90% mayor, al menos 1 vez mayor, al menos 2 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 1000 veces mayor, o más que un mamífero comparable tratado de control. El término "mamífero comparable tratado de control" se utiliza aquí para describir un mamífero que ha sido tratado de manera idéntica, con la excepción de la adición del inhibidor de BCL11A.

45 El término "mamífero" pretende abarcar un "mamífero" singular y "mamíferos" plural, e incluye, pero no se limita a seres humanos; primates tales como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; felinos tales como gatos, leones y tigres; equinos tales como caballos, burros y cebras; animales para fines alimentarios tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados tales como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; y osos. El mamífero puede ser un ser humano.

50 Por consiguiente, el mamífero ha sido diagnosticado con una hemoglobinopatía. La hemoglobinopatía puede ser una  $\beta$ -hemoglobinopatía. La hemoglobinopatía puede ser una enfermedad de células falciformes. Tal como se usa en el presente documento, la "enfermedad de células falciformes" puede ser anemia falciforme, enfermedad falciforme de hemoglobina C (HbSC), la  $\beta$ -talasemia + falciforme (HbS/ $\beta$ +) y la  $\beta$ -talasemia 0 falciforme (HbS/ $\beta$ 0). La hemoglobinopatía puede ser una  $\beta$ -talasemia

55 Como se usa en la presente memoria, el término "hemoglobinopatía" significa cualquier defecto en la estructura o función de cualquier hemoglobina de un individuo e incluye defectos en la estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la hemoglobina causados por cualquier mutación, tal como mutaciones por supresión o mutaciones por

5 sustitución en las regiones de codificación del gen de  $\beta$ -globina, o mutaciones en, o supresiones de, los promotores o reforzadores de tales genes que causan una reducción en la cantidad de hemoglobina producida en comparación con una condición normal o estándar. El término incluye además cualquier disminución en la cantidad o efectividad de la hemoglobina, ya sea normal o anormal, causada por factores externos tales como enfermedad, quimioterapia, toxinas, venenos o similares.

10 El término "cantidad efectiva", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la cantidad que es segura y suficiente para tratar, evaluar la probabilidad de, o retrasar el desarrollo de una hemoglobinopatía. La cantidad puede por lo tanto curar o resultar en la mejoría de los síntomas de la hemoglobinopatía, ralentizar el curso del avance de la enfermedad de hemoglobinopatía, retardar o inhibir un síntoma de una hemoglobinopatía, retardar o inhibir el establecimiento de síntomas secundarios de una hemoglobinopatía o inhibir el desarrollo de un síntoma secundario de una hemoglobinopatía. La cantidad eficaz para el tratamiento de la hemoglobinopatía depende del tipo de hemoglobinopatía que va a ser tratada, la severidad de los síntomas, del sujeto que va a ser tratado, la edad y condición general del sujeto, el modo de administración, etc. Por lo tanto, no es posible o prudente especificar una "cantidad efectiva" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, una "cantidad efectiva" apropiada puede ser determinada por un experto en la técnica usando sólo experimentación rutinaria.

15 El tratamiento según se describe en la presente memoria, mejora uno o más síntomas asociados con el trastorno aumentando la cantidad de hemoglobina fetal en el individuo. Los síntomas típicamente asociados con una hemoglobinopatía incluyen, por ejemplo, anemia, hipoxia tisular, disfunción orgánica, valores anormales del hematocrito, eritropoyesis ineficaz, conteo anormal de reticulocitos (eritrocitos), carga anormal de hierro, presencia de sideroblastos anulares, esplenomegalia, hepatomegalia, alteración del flujo de sangre periférica, disnea, aumento de la hemólisis, ictericia, crisis de dolor anémico, síndrome torácico agudo, secuestro esplénico, priapismo, ataque fulminante, síndrome mano-pie y dolor tal como angina de pecho.

20 La célula progenitora hematopoyética puede ser puesta en contacto *ex vivo* o *in vitro*, y la célula o su progenie se administra a dicho mamífero. La célula progenitora hematopoyética puede ser una célula del linaje eritroide.

25 La célula progenitora hematopoyética puede ponerse en contacto con una composición que comprende un inhibidor de BCL11A y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición puede administrarse por inyección, infusión, instilación o ingestión.

30 Tal como se usa en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" y las variaciones gramaticales del mismo, cuando se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales son capaces de administrarse a o sobre un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos indeseables tales como náuseas, mareos, alteraciones gástricas y similares. Cada vehículo también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Un vehículo farmacéuticamente aceptable no promoverá la elevación de una respuesta inmune a un agente con el que se mezcla, a menos que se desee. La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersos en la misma se entiende bien en la técnica y no necesita limitarse en base a la formulación. La formulación farmacéutica contiene un compuesto de la invención en combinación con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables. El vehículo puede estar en forma de un diluyente sólido, semisólido o líquido, crema o una cápsula. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensiones, en líquido antes de su uso. La preparación también puede emulsionarse o presentarse como una composición de liposomas. El ingrediente activo puede mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores de pH y similares que mejoran la eficacia del ingrediente activo. La composición terapéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes en la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares. Los vehículos fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de vehículos líquidos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los ingredientes activos y agua, o contienen un regulador tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina regulada con fosfato. Aún más, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal reguladora, así como sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y con exclusión de agua. Ejemplos de tales fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón, y emulsiones agua - aceite. La cantidad de un agente activo utilizado en la invención que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o condición y puede determinarse mediante técnicas

clínicas estándar. La frase "vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en el acarreo o transporte de los agentes objetivo de un órgano o porción del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, "administrado" se refiere a la colocación de un inhibidor de BCL11A en un sujeto por un método o ruta que da lugar a al menos una localización parcial del inhibidor en un sitio deseado. Un agente que inhibe BCL11A se puede administrar por cualquier ruta apropiada que da como resultado un tratamiento eficaz en el sujeto, es decir, la administración da como resultado el suministro a una ubicación deseada en el sujeto donde al menos una porción de la composición suministrada, es decir, al menos un agente que inhibe BCL11A, está activo en el sitio deseado durante un periodo de tiempo. El periodo de tiempo que el inhibidor está activo depende de la semivida *in vivo* después de la administración a un sujeto, y puede ser tan corto como unas pocas horas, por ejemplo, veinticuatro horas, hasta unos pocos días, o tan largo como varios años. Los modos de administración incluyen inyección, infusión, instilación o ingestión. La "inyección" incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebro espinal e inyección intraesternal e infusión.

En una realización, la célula progenitora hematopoyética de un mamífero que necesita tratamiento se pone en contacto con una composición que inhibe la expresión de BCL11A.

20 Por "inhibe la expresión de BCL11A" se quiere significar que la cantidad de expresión de BCL11A es al menos 5% menor en poblaciones tratadas con un inhibidor de BCL11A, que una población de control comparable, en la que no está presente ningún inhibidor de BCL11A. Se prefiere que el porcentaje de expresión de BCL11A en una población tratada con inhibidor de BCL11A sea al menos 10% menor, al menos 20% menor, al menos 30% menor, al menos 40% menor, al menos 50% menor, al menos un 60% menor, al menos un 70% menor, al menos un 80% menor, al menos un 90% menor, al menos 1 vez menor, al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor, o más que una población comparable tratada de control en la que no se añade ningún inhibidor de BCL11A.

30 El inhibidor de la expresión de BCL11A puede ser una molécula pequeña o, de acuerdo con la invención, es un ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser un agente de ARN de interferencia específico de BCL11A o un vector que codifica dicho agente de ARN de interferencia, o un aptámero que se une a BCL11A. En una realización preferida, dicho agente de ARN de interferencia comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1-6.

Tal como se describe en el presente documento, la célula progenitora hematopoyética de un mamífero que necesita tratamiento puede ponerse en contacto con una composición que inhiba la actividad de BCL11A.

35 Por "inhibe la actividad de BCL11A" se entiende que la cantidad de actividad funcional de BCL11A es al menos 5% menor en poblaciones tratadas con un inhibidor de BCL11A, que una población de control comparable, en la que no está presente ningún inhibidor de BCL11A. Se prefiere que el porcentaje de actividad de BCL11A en una población tratada con inhibidor de BCL11A sea al menos 10% menor, al menos 20% menor, al menos 30% menor, al menos 40% menor, al menos 50% menor, al menos 60% menor, al menos un 70% menor, al menos un 80% menor, al menos un 90% menor, al menos 1 vez menor, al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor, o más que una población tratada de control comparable en la que no se añade ningún inhibidor de BCL11A. Como mínimo, la actividad de BCL11A se puede evaluar determinando la cantidad de expresión de BCL11A en los niveles de proteína o ARNm, usando técnicas estándar en la técnica. Alternativamente, o además, la actividad de BCL11A se puede determinar usando un constructo indicador, en donde el constructo indicador es sensible a la actividad de BCL11A. La secuencia de locus de  $\gamma$ -globina es reconocible por el motivo de unión a ácido nucleico del constructo e BCL11A. Alternativamente, o además, la actividad de BCL11A se puede evaluar midiendo la expresión de hemoglobina fetal a nivel de ARNm o proteína después del tratamiento con un inhibidor de BCL11A candidato. Un aumento en la expresión de hemoglobina fetal de al menos 10% es indicativo de un compuesto que es candidato a inhibidor de BCL11A.

50 El inhibidor de la actividad de BCL11A se puede seleccionar del grupo que consiste en un anticuerpo contra BCL11A o un fragmento de unión a antígeno del mismo, una molécula pequeña y un ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser un agente ARN de interferencia específico de BCL11A, un vector que codifica el agente ARN de interferencia, o un aptámero que se une a BCL11A. El agente ARN de interferencia puede comprender una o más de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1-6.

55 Un "anticuerpo" que puede usarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluye inmunoglobulinas completas, fragmentos de inmunoglobulinas que se unen a antígenos, así como proteínas de unión a antígenos que comprenden dominios de unión a antígenos de inmunoglobulinas. Los fragmentos de inmunoglobulinas de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv y dAb. Se han desarrollado formatos de anticuerpo modificados que retienen la especificidad de unión, pero tienen otras características que pueden ser deseables,

incluyendo por ejemplo, biespecificidad, multivalencia (más de dos sitios de unión) y tamaño compacto (por ejemplo, dominios de unión solos). Los anticuerpos de cadena única carecen de algunos o todos los dominios constantes de los anticuerpos completos de los que se derivan. Por lo tanto, pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos enteros. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla tienden a estar libres de ciertas interacciones no deseadas entre regiones constantes de cadena pesada y otras moléculas biológicas. Además, los anticuerpos de cadena sencilla son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y pueden tener una permeabilidad mayor que los anticuerpos completos, permitiendo que los anticuerpos de cadena sencilla se localicen y unan a los sitios de unión al antígeno objetivo más eficientemente. Además, el tamaño relativamente pequeño de anticuerpos monocatenarios hace menos probable que provoquen una respuesta inmune no deseada en un receptor que los anticuerpos completos. Los anticuerpos monocatenarios múltiples, cada cadena simple que tiene un dominio VH y un dominio VL unidos covalentemente por un primer enlazador peptídico, pueden estar unidos covalentemente por al menos uno o más enlazadores peptídicos para formar anticuerpos monocatenarios multivalentes, que pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos. Cada cadena de un anticuerpo de cadena sencilla multivalente incluye un fragmento de cadena ligera variable y un fragmento de cadena pesada variable, y está unido por un enlazador peptídico a al menos otra cadena. El enlazador peptídico está compuesto por al menos quince residuos de aminoácidos. El número máximo de residuos de aminoácidos enlazadores es aproximadamente de cien. Dos anticuerpos de cadena sencilla pueden combinarse para formar un diacuerpo, también conocido como dímero bivalente. Los diacuerpos tienen dos cadenas y dos sitios de unión, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Cada cadena del diacuerpo incluye un dominio VH conectado a un dominio VL. Los dominios están conectados con enlazadores que son lo suficientemente cortos para evitar el emparejamiento entre dominios en la misma cadena, impulsando así el emparejamiento entre dominios complementarios en cadenas diferentes para recrear los dos sitios de unión a antígeno. Se pueden combinar tres anticuerpos de cadena sencilla para formar triacuerpos, también conocidos como trímeros trivalentes. Se construyen los triacuerpos con el extremo terminal aminoácido de un dominio VL o VH directamente fusionado con el extremo terminal carboxilo de un dominio VL o VH, es decir, sin ninguna secuencia enlazadora. El triacuerpo tiene tres cabezas de Fv con los polipéptidos dispuestos de una manera cíclica, de cabeza a cola. Una posible conformación del triacuerpo es plana con los tres sitios de unión situados en un plano con un ángulo de 120 grados entre sí. Los triacuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o trispecíficos. Por lo tanto, los anticuerpos útiles en los métodos descritos en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos naturales, fragmentos bivalentes tales como F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos monovalentes tales como Fab, anticuerpos de cadena sencilla, Fv de cadena sencilla (scFv) anticuerpos de dominio único, anticuerpos de cadena sencilla multivalentes, diacuerpos, triacuerpos y similares que se unen específicamente con un antígeno.

También pueden producirse anticuerpos frente a un polipéptido o porción de un polipéptido por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos se elevan fácilmente en animales tales como conejos o ratones por inmunización con el producto génico, o un fragmento del mismo. Los ratones inmunizados son particularmente útiles para proporcionar fuentes de células B para la fabricación de hibridomas, que a su vez se cultivan para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales. Los métodos de fabricación de anticuerpos se describen en detalle, por ejemplo, en Harlow y colaboradores, 1988. Aunque tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria, se prefiere que se use un anticuerpo monoclonal cuando las condiciones requieren una mayor especificidad para una proteína particular.

El inhibidor de la actividad de BCL11A puede interferir con las interacciones de BCL11A con los compañeros de unión de BCL11A. Los compañeros de unión pueden ser GATA-1, FOG-1 y componentes del complejo NuRD. Alternativamente, los compañeros de unión pueden ser matrin-3, MTA2 y RBBP7.

Por "interfiere con las interacciones de BCL11A con los compañeros de unión a BCL11A" se entiende que la cantidad de interacción de BCL11A con el compañero de unión a BCL11A es al menos 5% menor en poblaciones tratadas con un inhibidor de BCL11A que una población de control comparable, en donde no está presente ningún inhibidor de BCL11A. Se prefiere que la cantidad de interacción de BCL11A con el compañero de unión de BCL11A en una población tratada con inhibidor de BCL11A sea al menos 10% menor, al menos 20% menor, al menos 30% menor, al menos 40% menor, al menos 50% menor, al menos 60% menor, al menos 70% menor, al menos 80% menor, al menos 90% menor, al menos 1 vez menor, al menos 2 veces menor, al menos 5 veces menor, al menos 10 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor, o más que una población tratada de control comparable en la que no se añade ningún inhibidor de BCL11A. Como mínimo, la interacción de BCL11A se puede evaluar determinando la cantidad de unión de BCL11A al compañero de unión a BCL11A usando técnicas estándar en el arte, incluyendo, pero sin limitarse a, espectrometría de masas, inmunoprecipitación o ensayos de filtración en gel. Alternativamente, o además, la actividad de BCL11A se puede evaluar midiendo la expresión de hemoglobina fetal a nivel de ARNm o proteína después del tratamiento con un inhibidor de BCL11A candidato.

La actividad de BCL11A puede ser la interacción de BCL11A con sus compañeros de unión: GATA-1, FOG-1, componentes del complejo NuRD, matrin-3, MTA2 y RBBP7.

Por consiguiente, cualquier anticuerpo o fragmento del mismo, molécula pequeña, producto químico o compuesto que pueda bloquear esta interacción, se considera un inhibidor de la actividad de BCL11A.

Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para medir un aumento en la expresión de la hemoglobina fetal, por ejemplo, análisis de transferencia de Western de la proteína fetal  $\gamma$ -globina y la cuantificación de ARNm  $\gamma$ -globina de fetal.

5 También se describen aquí métodos para cribar moduladores de la actividad o expresión de BCL11A para la identificación de inhibidores de BCL11A.

10 Por lo tanto, se describe un método para identificar un modulador de actividad o expresión de BCL11A, comprendiendo el método poner en contacto una célula progenitora hematopoyética con una composición que comprende un compuesto de ensayo, y medir el nivel de hemoglobina fetal o ARNm de hemoglobina fetal en dicha célula o su progenie, en donde un aumento de la hemoglobina fetal es indicativo de que dicho compuesto de ensayo es un inhibidor candidato de la actividad o expresión de BCL11A.

La célula progenitora hematopoyética puede ponerse en contacto *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. La célula puede ser de primates humanos, no humanos o de mamíferos. El compuesto de ensayo puede ser una molécula pequeña, un anticuerpo o un ácido nucleico. La composición puede provocar un aumento en la expresión de la hemoglobina fetal.

#### Definiciones

15 Por conveniencia, se presentan aquí ciertos términos empleados en toda la solicitud (incluyendo la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas). A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece esta invención.

20 Como se usa en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el cual se pueden ligar segmentos adicionales de ácido nucleico. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar los segmentos adicionales de ácido nucleico en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y por lo tanto se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan aquí "vectores de expresión recombinantes", o más simplemente "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, lentivirus, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven funciones equivalentes. Los lentivirus se pueden utilizar para administrar una o más moléculas de ARNpi a una célula.

35 Dentro de un vector de expresión, "operativamente enlazado" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está enlazada a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula objetivo cuando el vector se introduce en la célula objetivo). El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, reforzadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejidos). Además, los agentes de ARN de interferencia pueden administrarse por medio de un vector que comprende una secuencia reguladora para dirigir la síntesis de los ARNpi a intervalos específicos, o durante un período de tiempo específico. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula objetivo, el nivel de expresión del ARNpi deseado y similares.

50 Los vectores de expresión se pueden introducir en células objetivo para producir así moléculas de ARNpi. Una plantilla de ADN, por ejemplo, una plantilla de ADN que codifica la molécula de ARNpi dirigida contra el alelo mutante, puede ligarse a un vector de expresión bajo el control de ARN polimerasa III (Pol III) y suministrarse a una célula objetivo. Pol III dirige la síntesis de pequeños transcritos no codificantes, cuyos extremos 3' se definen por terminación dentro de un tramo de 4-5 timidinas. Por consiguiente, se pueden usar plantillas de ADN para sintetizar, *in vivo*, tanto las cadenas sensitivas como antisentido de ARNpi que afectan a ARNi (Sui, y colaboradores, (2002) PNAS 99 (8): 5515).

55 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referencias a los plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en la presente memoria y/o que

resultarán evidentes para las personas expertas en la técnica al leer esta descripción y así sucesivamente. Se entiende que la descripción detallada anterior y los siguientes ejemplos son sólo ilustrativos y no deben tomarse como limitaciones del alcance de la invención. Se pueden hacer varios cambios y modificaciones a las realizaciones descritas, que serán evidentes para los expertos en la técnica, sin apartarse del alcance de la presente invención. Además, todas las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones identificadas se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este sentido debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anticipar tal revelación en virtud de la invención anterior o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones relativas a la fecha o representación del contenido de estos documentos se basan en la información de que disponen los solicitantes y no constituyen ninguna admisión sobre la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

Se describe en este documento mediante cualquiera de los siguientes párrafos en orden alfabético:

[A] Un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula, comprendiendo el método las etapas de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética con una cantidad eficaz de una composición que comprende un inhibidor de BCL11A, por lo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en dicha célula, o su progenie, con respecto a la célula antes de dicha puesta en contacto.

[B] El método del párrafo [A], en el que la célula progenitora hematopoyética es una célula del linaje eritroide.

[C] El método del párrafo [A], en el que la célula progenitora hematopoyética se pone en contacto *ex vivo* o *in vitro*.

[D] El método del párrafo [A], en el que la composición que comprende un inhibidor de BCL11A inhibe la expresión de BCL11A.

[E] El método del párrafo [D], en el que el inhibidor de la expresión de BCL11A se selecciona de una molécula pequeña y un ácido nucleico.

[F] El método del párrafo [E], en el que el ácido nucleico es un agente de ARN de interferencia específico de BCL11A, o un vector que codifica un agente de ARN de interferencia específico de BCL11A.

[G] El método del párrafo [F], en el que el agente de ARN de interferencia comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1-6.

[H] El método del párrafo [A], en el que la composición que comprende un inhibidor de BCL11A inhibe la actividad de BCL11A.

[I] El método del párrafo [H], en el que el inhibidor de la actividad de BCL11A se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo contra BCL11A o un fragmento del mismo de unión al antígeno, una molécula pequeña y un ácido nucleico.

[J] El método del párrafo [I], en el que el ácido nucleico es un agente de ARN de interferencia específico de BCL11A, un vector que codifica un agente de ARN de interferencia, o un represor que se une a BCL11A.

[K] El método del párrafo [J], en el que el agente de ARN de interferencia comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1-6.

[L] Un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un mamífero que lo requiera, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética en dicho mamífero con una cantidad eficaz de una composición que comprende un inhibidor de BCL11A, por lo que la expresión de hemoglobina fetal se incrementa en dicho mamífero, con relación a la expresión anterior a dicha puesta en contacto.

[M] El método del párrafo [L], en el que el mamífero ha sido diagnosticado con una hemoglobinopatía.

[N] El método del párrafo [M], en el que la hemoglobinopatía es una  $\beta$ -hemoglobinopatía.

[O] El método del párrafo [M], en el que la hemoglobinopatía es una enfermedad de células falciformes.

[P] El método del párrafo [M], en el que la hemoglobinopatía es  $\beta$ -talasemia.

[Q] El método del párrafo [L], en el que la célula progenitora hematopoyética se pone en contacto *ex vivo* o *in vitro*, y dicha célula o su progenie se administra a dicho mamífero.

- [R] El método del párrafo [L], en el que el contacto comprende poner en contacto dicha célula con una composición que comprende un inhibidor de BCL11A y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- [S] El método del párrafo [L], en el que la composición se administra por inyección, infusión, instilación o ingestión.
- 5 [T] El método del párrafo [L], en el que la composición que comprende un inhibidor de BCL11A inhibe la expresión de BCL11A.
- [U] El método del párrafo [T], en el que el inhibidor de la expresión de BCL11A se selecciona de una molécula pequeña y un ácido nucleico.
- [V] El método del párrafo [U], en el que el ácido nucleico es un agente de ARN de interferencia específico de BCL11A o un vector que codifica un agente de ARN de interferencia, o un represor que se une a BCL11A.
- 10 [W] El método del párrafo [V], en el que el agente de ARN de interferencia comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1-6.
- [X] El método del párrafo [L], en el que la composición que comprende un inhibidor de BCL11A inhibe la actividad de BCL11A.
- 15 [Y] El método del párrafo [X], en el que el inhibidor de la actividad de BCL11A se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo contra BCL11A o un fragmento del mismo de unión al antígeno, una molécula pequeña y un ácido nucleico.
- [Z] El método del párrafo [Y], en el que el ácido nucleico es un agente de ARN de interferencia específico de BCL11A, un vector que codifica dicho agente de ARN de interferencia, o un represor que se une a BCL11A.
- 20 [AA] El método del párrafo [Z], en el que el agente de ARN de interferencia comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1-6.
- [BB] Un método para identificar un modulador de actividad o expresión de BCL11A, comprendiendo el método poner en contacto una célula progenitora hematopoyética con una composición que comprende un compuesto de ensayo, y medir el nivel de ARNm de hemoglobina fetal o de hemoglobina fetal en dicha célula o su progenie, en donde un aumento de la hemoglobina fetal es indicativo de que dicho compuesto de ensayo es un inhibidor candidato de la actividad o expresión de BCL11A.
- 25 [CC] El método del párrafo [AA], en el que la célula progenitora hematopoyética se pone en contacto *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.
- [DD] El método del párrafo [AA], en el que la célula es de primates humanos, no humanos o de mamíferos.
- [EE] El método del párrafo [AA], en el que el compuesto de ensayo es una molécula pequeña, un anticuerpo o un ácido nucleico.
- 30 [FF] El método del párrafo [AA], en el que la composición provoca un aumento en la expresión de ARNm de hemoglobina fetal o de proteína.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo que no debe ser interpretado como limitativo.

#### Ejemplo 1

#### 35 Materiales y métodos

##### Cultivo de células

40 Se cultivaron células de eritroleucemia de ratón (MEL) y se crearon subclones que portaban la enzima BirA y versiones marcadas de BCL11A como se describió anteriormente (Woo y colaboradores, Mol Cell Biol 28, 2675 (2008)). Todos los constructos se crearon usando técnicas de ADN recombinante estándar. Las células MEL se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con suero fetal de ternera (FCS) al 10% y penicilina-estreptomina al 2% (P/S). Se añadieron antibióticos apropiados al medio según fuera necesario para la selección o mantenimiento de los clones, como se describe (Woo y colaboradores, Mol Cell Biol 28, 2675 (2008)).

Las células COS-7 y 293T se mantuvieron en DMEM con FCS al 10%. Estas células se transfectaron con el reactivo FuGene 6 (Roche) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5 Se obtuvieron células primarias CD34+ humanas a partir de muestras mononucleares clasificadas magnéticamente de sangre periférica movilizada por G-CSF de donantes y se congelaron después del aislamiento. Las células se obtuvieron del Centro Yale de Excelencia en Hematología Molecular (YCEMH). Las células se descongelaron y se lavaron en RPMI 1640 con FCS al 10%, y luego se sembraron en medio StemSpan SFEM (StemCell Technologies Inc.) con una mezcla de citoquina 1X CC100 (StemCell Technologies Inc.) y P/S al 2%. Las células se mantuvieron en este medio de expansión a una densidad de  $0,1-1 \times 10^6$  células/ml con cambios de medio un día sí otro no o cada tercer día según fuera necesario. Las células se mantuvieron en medio de expansión durante un total de 6 días. El día 6, las células se sembraron nuevamente en medio StemSpan SFEM con P/S al 2%, 20 ng/ml de SCF, 1 U/ml de Epo, 5 ng/ml de IL-3, dexametasona 2 micromolar y  $\beta$ -estradiol 1 micromolar. Las células se mantuvieron en medio de diferenciación, con cambios en los medios un día sí otro no o cada tercer día según fuera necesario. Las células se mantuvieron a una densidad de  $0,1-1 \times 10^6$  células/ml. Al día 3 de diferenciación, estaban presentes blastos homogéneos mayores en el cultivo. Al día 5, la mayoría de las células tenían morfología proeritroblástica y el día 7 la mayoría de las células tenían morfología eritroblástica de basófilo. Al día 12 de diferenciación, la mayoría de las células eran de morfología ortocromatofílica y policromatofílica de eritroblastos.

20 Se prepararon hemolizados a partir de células el día 12 de diferenciación, como se ha descrito (Sankaran y colaboradores, *Genes Dev.* 22: 463 (2008)), usando lisis osmótica en agua y tres ciclos rápidos de congelación-descongelación. Los residuos se eliminaron por centrifugación y los lisados se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  o durante algunos días a  $4^\circ\text{C}$ . Se realizaron electroforesis de hemoglobina con acetato de celulosa y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en los laboratorios clínicos del Hospital Brigham y de Mujeres utilizando estándares clínicamente calibrados para las hemoglobinas humanas.

#### Extracción de ARN y qRT-PCR

25 El aislamiento de ARN se realizó utilizando el reactivo Trizol (Sigma) o con el mini kit RNeasy (Qiagen). El ARN obtenido utilizando el método del reactivo de Trizol se trató posteriormente con la ADNasa RQ1 (Promega) antes de que se produjera la síntesis de ADNc. Se realizó una digestión en la columna DNasa (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el mini kit RNeasy. El ADNc se sintetizó con el kit de síntesis de ADNc de iScript (Bio-Rad). La PCR en tiempo real se realizó utilizando la mezcla maestra verde iQ SYBR (Bio-Rad), como se describió anteriormente (Sankaran y colaboradores, *Genes Dev.* 22: 463 (2008)). La expresión relativa se cuantificó usando el método de  $\Delta\Delta\text{Ct}$  como se describió anteriormente (Sankaran y colaboradores, *Genes Dev.* 22, 463 (2008)). Las secuencias de cebadores utilizados para RT-PCR están disponibles bajo petición. La preparación de muestras para el análisis de microarreglos de expresión se realizó como se describió previamente (Sankaran y colaboradores, *Genes Dev.* 22, 463 (2008)) y los microarreglos fueron procesados por el Dana-Farber Cancer Institute Microarray Core Facility. El procesamiento de datos se realizó usando dChip en el laboratorio de computo del sitio web de la Universidad de Harvard y en el sitio web de la organización del proyecto r), con filtrado realizado como se describió anteriormente (Sankaran y colaboradores, *Genes Dev.* 22, 463 (2008); Mootha y colaboradores, *Nat Genet.* 34, 267 (2003), Su y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101: 6062 (2004) y Su y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 99: 4465 (2002)). Dado que el trabajo anterior había sugerido que los niveles de diferencia promedio de Affymetrix de  $< 100$  para al menos una muestra que representa los ARN que es poco probable que se expresen (Su y colaboradores, *Proc. Nat. Ac. Sci. EE.UU.* 99: 4465 (2002)), se utilizó como criterio de filtración para todos los análisis realizados aquí.

#### Análisis proteómico

45 El análisis de los compañeros de interacción de proteínas usando versiones marcadas por afinidad de BCL11A se realizó como se describió anteriormente (Woo y colaboradores, *Mol. Cell. Biol.* 28: 2675 (2008)). El análisis de espectrometría de masas se realizó en la Taplin Biological Mass Spectrometry Facility en la Escuela de Medicina de Harvard. Después de la identificación de péptidos en muestras individuales (con tres muestras presentadas por carril de gel), colapsó la redundancia. A continuación se utilizó un enfoque sustractivo para identificar las proteínas que se purificaron específicamente en las disminuciones de BCL11A y no en las disminuciones de control en las líneas celulares parentales MEL que contenían la enzima BirA. A continuación, se consolidaron los datos mediante la identificación de proteínas que eran comunes en experimentos independientes. Se llevaron a cabo todas las preparaciones de extractos nucleares (NE), inmunoprecipitaciones candidatas (IP), filtración en gel de NE, expresión exógena transitoria con IP y estudios de mapeo usando métodos que se han descrito previamente (Woo y colaboradores, *Mol Cell Biol* 28, 2675 (2008)).

#### Desactivación de ARNpi y ARNph

55 Se obtuvieron muestras combinadas de ARNpi de Dharmacon. Esto incluyó una combinación sin direccionamiento (D-001810-10) y una combinación de direccionamiento BCL11A (L-006996-00). Las secuencias objetivo de ARNpi de BCL11A utilizadas se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1:

SEQ ID NO 1	GAGCACAAACGGAAACAAU
SEQ ID NO 2	GCCACAGGAUGACGAUUGU
SEQ ID NO 3	GCACUUAAGCAAACGGGAA
SEQ ID NO 4	ACAGAACACUCAUGGAUUA

5 Estos ARNpi se prepararon como patrones 100 µM, según lo recomendado por el fabricante. Las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se introdujeron los ARNpi en células CD34 expandidas y de diferenciación usando el Microporator-Mini (Digital Bio Technology). Se siguieron los protocolos del fabricante y después de cribar una serie de condiciones, se encontró que con un solo pulso de 1800 V (usando un ancho de pulso de 20 ms) se obtuvo la mejor eficiencia de transducción, según se evaluó usando un plásmido indicador GFP. Se estimó que la eficiencia de transducción era ~50-60% de células viables. Típicamente, se transdujeron ~250.000 células con 4 µl de ARNpi en un volumen de ~15 µl. Se sembraron luego las células en medio de diferenciación fresco.

10 Los clones de ARNph en el vector pLKO se obtuvieron a partir de una gran colección de ARNph que se han descrito previamente (Moffat y colaboradores, Cell 124: 1283 (2006)). Se obtuvieron dos ARNph dirigidos a BCL11A con las secuencias presentadas Tabla 2:

SEQ ID NO: 5	CCGGCGCACAGAACACTCATGGATTCTCGAGAATCCATGAGTGTT
	CTGTGCGTTTTTG
SEQ ID NO: 6	CCGGCCAGAGGATGACGATTGTTTACTCGAGTAAACAATCGTCAT
	CCTCTGGTTTTTG

15 Estos ARNph fueron elegidos, ya que se dirigen a ambas de las principales isoformas de BCL11A encontradas en las células eritroides. Se prepararon lentivirus y se llevó a cabo la infección de las células tal como se ha descrito (Moffat y colaboradores, Cell 124: 1283 (2006)). Las células se lavaron dos veces con PBS y se cambió el medio 24 horas después de la infección. La selección con puomicina se inició a las 48 horas después de la infección, que generalmente correspondía al momento en que las células se sembraron en medio de diferenciación.

20 Resultados

Correlación inversa de los niveles de BCL11A y HbF

25 Como primer paso en la búsqueda de cómo la variación en el locus de BCL11A podría relacionarse con la expresión de globina, se examinó la expresión de BCL11A en células eritroides. En las células eritroides humanas adultas primarias, BCL11A se expresa como dos isoformas principales a los niveles de proteína y ARN (Figura 1A). Estas isoformas han sido previamente designadas isoformas 1 y 2 o XL y L (Liu y colaboradores, Mol Cancer 5, 18 (2006)). Las isoformas XL y L difieren sólo en el uso del exón del terminal 3' y parecen unirse entre sí y funcionar de manera similar en otros entornos (Liu y colaboradores, Mol. Cancer 5, 18 (2006)). Una transferencia de western muestra las principales isoformas, XL y L, a partir de extractos nucleares de células eritroides humanas (A). Estas dos isoformas, que también podrían ser confirmadas por RT-PCR de todos los exones conocidos y previstos, se representan en el lado derecho de este panel con los números de exón apropiados mostrados encima del diagrama. El cuestionamiento del patrón de expresión de BCL11A en una colección de datos de expresión de células humanas (Su y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 101: 6062 (2004)) revela una correlación inversa entre la expresión de BCL11A y la del gen de β-globina en las células del linaje eritroide (Figura 1B). Se muestra la expresión de BCL11A en células eritroides en diferentes etapas de ontogenia humana y con diversos patrones de expresión de genes de globina (Figura 1B), según se evaluó a partir de una gran colección de datos de expresión en tejidos humanos y tipos de células (Su y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 101: 6062 (2004)). El panel superior muestra la expresión normalizada (a

través de un panel de 79 tipos de células humanas, realizada al menos por duplicado para cada tipo de célula) de BCL11A en los diferentes tipos de células eritroides y las etapas enumeradas en la parte inferior de la sonda 219497\_s\_at. Se observaron resultados similares con las sondas de BCL11A, 219498\_s\_at y 210347\_s\_at. El panel inferior muestra los niveles normalizados de globinas humanas fetales y embrionarias de este conjunto de datos. Los datos se normalizaron como para el panel superior y luego se calcularon los porcentajes relativos con base en todos los genes de la  $\beta$ -globina humana (incluyendo los genes de  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$ -globina). En particular, la expresión de BCL11A es muy baja en las células eritroides de hígado fetal y en la línea de células eritroides embrionarias K562. La correlación inversa indica que la expresión de BCL11A está restringida a la etapa de desarrollo. Además, el patrón temporal es consistente con BCL11A actuando como un represor potencial de la expresión de  $\gamma$ -globina.

Las variantes genéticas en el intrón 2 del gen de BCL11A se asocian significativamente con los niveles de HbF en individuos normales y pacientes con trastornos de hemoglobina (Lette y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (2008); Uda y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 105: 1620 (2008) y Menzel y colaboradores, Nat. Genet. 39, 1197 (2007)). La señal de asociación ha sido recientemente mapeada finamente con una única variante que está en estrecho desequilibrio de enlace (LD) con el SNP rs4671393 (Lette y colaboradores, citado más arriba (2008)). Dado que esta asociación se ha confirmado en múltiples poblaciones diaspóricas europeas y africanas independientes, se examinó la expresión de BCL11A en función del genotipo en rs4671393 en líneas celulares linfoblastoides de los grupos HapMap europeo (CEU) y africano (YRI). Como se muestra en la Fig. 2A, la variante común rs4671393 está asociada con la expresión de BCL11A en líneas celulares linfoblastoides humanas de las poblaciones HapMap europea (CEU) y africana (YRI). Se llevó a cabo una qRT-PCR en el ARN de estas líneas celulares y se normalizó al nivel de  $\beta$ -actina humana. Se realizaron dos reacciones PCR separadas que podían individualmente evaluar los niveles de las isoformas XL (parte superior) y L (parte inferior) con base en diferencias en el extremo 3' de estos genes. Se obtuvieron resultados similares analizando secuencias 5' comunes usando qRT-PCR. Los resultados se representan como la media con el error estándar mostrado por las barras de error. Las diferencias entre los genotipos se calcularon utilizando la prueba t de Student. El patrón de aumento en los niveles de HbF para cada uno de estos genotipos se muestra en la parte superior (Lette y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (2008)).

Se observó una diferencia sorprendente en la expresión tanto para las isoformas XL como L entre individuos homocigóticos para el alelo HbF bajo (GG), heterocigotos para ambos alelos, u homocigotos para el alelo menor asociado con niveles altos de HbF (AA) (Fig. 2A). Las células homocigotas para los alelos de "HbF alta" expresaron un nivel más bajo de transcritos de BCL11A que aquellos homocigotos para alelos de "HbF baja" o heterocigotos para ambos alelos. Por tanto, la expresión de BCL11A en las diferentes variantes humanas está inversamente correlacionada con los niveles de HbF asociados. La diferencia en la expresión entre los alelos de BCL11A asociados con HbF "alta" y "baja" es aproximadamente de 3 veces. Por lo tanto, las diferencias relativamente modestas en la expresión de BCL11A parecen asociarse con cambios en la expresión de HbF. Tomados junto con el patrón de desarrollo de la expresión de BCL11A, estos resultados proporcionan un apoyo independiente, aunque indirecto, para un modelo en el que BCL11A podría actuar como un represor de la expresión de  $\gamma$ -globina.

Sorprendentemente, se observó que la línea celular de eritroleucemia embrionaria K562 expresaba muy poca, si acaso, de las isoformas XL y L, pero en su lugar expresaba proteínas variantes más cortas (Figura 2B). Para evaluar si la diferencia entre los eritroblastos adultos y las células K562 reflejaba el control específico de la etapa de desarrollo de BCL11A o la naturaleza maligna de estas células, se examinaron eritroblastos CD71+/CD235+, de la misma etapa, de médula ósea de adulto, de células de hígado fetal del segundo trimestre (FL), y primitivas circulantes del primer trimestre. FL y eritroblastos primitivos, que expresan ambos fuertemente  $\gamma$ -globina (C. Peschle y colaboradores, 1985, Nature 313, 235), expresaron predominantemente variantes más cortas de BCL11A (Figura 2B). Aunque actualmente estamos investigando la estructura de estas variantes de proteínas, los hallazgos indican que el locus de BCL11A está regulado por desarrollo, de modo que las isoformas XL y L de longitud completa se expresan casi exclusivamente en eritroblastos en etapa adulta. Independientemente, los datos genéticos sostienen fuertemente que el nivel de las isoformas XL y L está influenciado por variantes de secuencia en el gen de BCL11A.

BCL11A se une al complejo represor NuRD, GATA-1, y FOG-1 en células eritroides.

Para comprender mejor el mecanismo de acción de BCL11A en células eritroides, se caracterizaron las proteínas con las que interacciona BCL11A. En primer lugar, se prepararon versiones marcadas por afinidad de BCL11A en células de eritroleucemia de ratón (MEL) (Fig. 3A). Estas células representan un modelo conveniente de células eritroides de tipo adulto que expresan exclusivamente globinas adultas (Papayannopoulou y colaboradores, Cell 46: 469 (1986)). El esquema utilizado para la purificación por afinidad en células de eritroleucemia de ratón (MEL) se representa en este diagrama. Una vez que se llevó a cabo la elución del péptido FLAG, se realizó la espectrometría de masas de carril completo a partir de geles de acrilamida como se describió anteriormente. Para identificar las interacciones específicas, se utilizó un enfoque sustractivo que implicaba una disminución simultánea en las células parentales Mel-BirA (MB). Los resultados de esta selección sustractiva se muestran (Figura 3B) con el número de péptidos obtenidos en cada ensayo enumerados en forma adyacente a la proteína identificada. Los diferentes componentes del complejo NuRD se muestran en azul en esta tabla. (Fig. 3D).

No se observaron cambios transcripcionales globales importantes por análisis de microarreglos tras la expresión de las versiones marcadas de BCL11A en estas células (Fig. 3C). La intensidad normalizada  $\log_2$  de las sondas filtradas de arreglos Affymetrix 430 2.0 sobre las células parentales MB y una colección de cuatro clones que contenían las versiones FLAG-Biotag de BCL11A (clones FBB) se muestran en rojo. Una regresión lineal se muestra como una línea negra ( $r^2 = 0,9753$ ). El análisis de microarreglos y el filtrado se realizaron como se describe en el presente documento. El coeficiente de correlación total ( $r^2$ ) fue de 0,9753 para la intensidad normalizada  $\log_2$  de las sondas de la línea celular parental en comparación con una colección de clones que expresan BCL11A marcada, lo que indica una estrecha similitud en la actividad transcripcional de estas células (con valores de  $r^2$  de 0,9678, 0,9445, 0,9667 y 0,9736 para clones individuales que muestran, respectivamente, 1, 1,4 y 9 veces la expresión de BCL11A marcada en comparación con niveles endógenos). Después de la purificación por afinidad de complejos de proteínas que contienen BCL11A marcada y la secuenciación de péptidos por espectrometría de masas, se identificaron numerosos péptidos de BCL11A, en consonancia con la observación de que BCL11A puede asociarse por sí misma y estos complejos parecen implicar múltiples isoformas (Liu y colaboradores, Mol Cancer 5, 18 (2006)) (Figura 3B). Todos los componentes de la remodelación del nucleosoma y el complejo represivo de histona desacetilasa (NuRD) se recuperaron, lo que sugiere una asociación física entre BCL11A y el complejo en las células eritroides (Fig. 3B, azul), consistente con las observaciones anteriores de BCL11A en las células B y la BCL11B homóloga en células T (Cismasiu y colaboradores, Oncogene 24: 6753 (2005)). Compatible con esta interacción observada, BCL11A contiene un motivo en el extremo terminal N que se cree que en otras proteínas recluta el complejo NuRD (Fig. 3D) (Lauberth y colaboradores, J. Biol. Chem. 281: 23922 (2006) y Hong Y colaboradores, Embo J. 24: 2367 (2005)).

También se encontró que la proteína de matriz nuclear, matrin-3 (Nakayasu y colaboradores, Proc. Natl. Ac. Sci. EE.UU. 88: 10312 (1991)), consistentemente purificada conjuntamente con BCL11A, que puede ser responsable en parte por la localización de BCL11A en la matriz nuclear (Liu y colaboradores, Mol. Cancer 5, 18 (2006)) (Figura 3B). Trabajos previos han demostrado que el locus de  $\beta$  globina está estrechamente asociado con la matriz nuclear hasta etapas posteriores de la eritropoyesis cuando se produce la transcripción del gen de globina de alto nivel (Ragoczy y colaboradores, Genes Dev. 20: 1447 (2006)). Además, los complejos de BCL11A contienen péptidos derivados de GATA-1, el principal factor de transcripción eritroide (Martin, Nature 338: 435 (1989)) (Figura 3B).

Esta interacción se caracterizó adicionalmente y se validó. Por inmunoprecipitación (IP), se confirmó que GATA-1 se asocia específicamente con BCL11A en células eritroides (Figura 4A). Las inmunoprecipitaciones (IP) se realizaron con perlas de M2-agarosa. Además, se encontró que el cofactor FOG-1 de GATA-1 (Tsang y colaboradores, Cell 90: 109 (1997)) también se asocia específicamente con BCL11A y la interacción con componentes de NuRD en células eritroides se confirmó adicionalmente (Figura 4A). Trabajos previos han demostrado que FOG-1 también se une al complejo NuRD (Hong y colaboradores, Embo J. 24: 2367 (2005)) y estos resultados sugieren que BCL11A puede sinergizar con esta interacción en el contexto de loci específicos.

Se muestran las fracciones de filtración en gel (cada cuarta fracción de fracciones de 1 ml se muestra en la transferencia) de extractos nucleares eritroides y se realizan transferencias de BCL11A, MTA2, GATA-1 y FOG-1. En el fraccionamiento por tamaño de los extractos nucleares eritroides, se observó considerable superposición entre los componentes NuRD y BCL11A en grandes complejos de megadaltons (Figura 4B). La superposición de BCL11A con polipéptidos GATA-1 y FOG-1 fue menos extensa (Figura 4B). Hay una superposición significativa entre BCL11A y MTA2, con un pequeño pico de GATA-1 y FOG-1 observado aquí también. Las interacciones de BCL11A con GATA-1 (Figura 4C) y FOG-1 (Figura 4D) se pudieron confirmar mediante expresión exógena en células Cos7 usando versiones marcadas con FLAG de GATA-1 o FOG-1 y versiones marcadas con V5 de BCL11A. Utilizando esta misma estrategia, se podrían utilizar los fragmentos de GATA-1 (todos los cuales muestran una expresión robusta aquí) para mapear la interacción con BCL11A (Fig. 4E). Sin desear estar sujetos a una teoría, es posible que sólo una fracción menor de estos factores está unida dentro de los complejos BCL11A y NuRD. Alternativamente, la asociación *in vivo* puede ser mayor, pero la disociación de los componentes de los complejos de proteínas se produce durante la preparación del extracto y el fraccionamiento por tamaño. GATA-1 y FOG-1 inmunoprecipitaron con BCL11A tras la expresión exógena en células no eritroides, lo que sugiere que estas proteínas interactúan directamente (Fig. 4C y 4D). Este enfoque se utilizó para mapear los determinantes mediadores de la asociación de GATA-1 con BCL11A (Fig. 4E). Se encontró que BCL11A interacciona con los dedos de zinc de GATA-1 (aminoácidos 200-338) y esta interacción parece ser parcialmente inhibida por la región del extremo terminal N de GATA-1. Se sabe que la región del extremo terminal N de GATA-1 es importante para la eritropoyesis normal en seres humanos (Hollanda y colaboradores, Nat. Genet. 38: 807 (2006)) y está mutada somáticamente en un trastorno mieloproliferativo infantil y en leucemia que surgen en pacientes con síndrome de Down (Wechsler y colaboradores, Nat. Genet. 32: 148 (2002) y Vyas y colaboradores, Curr. Opin. Pediatr. 19: 9 (2007)). Juntos, los datos proteómicos indican que BCL11A se une al complejo NuRD junto con GATA-1 y FOG-1 en células eritroides. Es probable que estos factores asociados sean críticos para la acción de BCL11A como un represor transcripcional en células eritroides.

Evaluación funcional de BCL11A como represor de la expresión de HbF.

Los resultados presentados hasta ahora proporcionan evidencia genética, de desarrollo y bioquímica en apoyo de un papel potencial para BCL11A como represor de la expresión génica de  $\gamma$ -globina. Para probar esta hipótesis, se intentó la modulación del nivel de BCL11A en células eritroides humanas primarias. Como sistema celular en el que realizar

experimentos, se expandieron y diferenciaron precursores eritroides de progenitores hematopoyéticos humanos CD34+ purificados. Se examinó el efecto de la introducción transitoria de ARNpi que dirige al ARNm de BCL11A. Cuando se introdujeron los ARNpi en progenitores eritroides en el día 0 de la diferenciación, se logró una desactivación de 40-45% de los niveles de ARNm de BCL11A, según lo evaluado en el día 4 de la diferenciación. Con esta desactivación, se observó un aumento de ~ 2,3 veces en el nivel de  $\gamma$ -globina por qRT-PCR en la etapa de eritroblasto basófilo en el día 7 de la diferenciación (Figura 5A). Con esta desactivación, se observó un aumento de 2,3 veces en el nivel de ARN de  $\gamma$ -globina (de un promedio de 7 a 15,7%) en la etapa de eritroblasto basófilo en el día 7 de la diferenciación (Figura 5A). Se encontró que a medida que estos ARNpi se introdujeron en puntos de tiempo posteriores durante la diferenciación eritroide, se observó una menor inducción del gen de la  $\gamma$ -globina (con 1,7 y 1,4 veces la inducción promedio de  $\gamma$ -globina observada añadiendo ARNpi en los días 1 y 2 de la diferenciación).

Los resultados observados a partir de la desactivación del ARNpi de BCL11A podrían deberse a un amplio efecto sobre el estado de diferenciación celular, que se ha demostrado que altera la expresión de la  $\gamma$ -globina (Nathan y colaboradores, Nathan y Oski's hematology of infancy and childhood. Sexta edición, página 2 v. (x9) (2003) y Stamatoyannopoulos, Exp. Hematol., 33: 259 (2005)), o reflejan una acción más directa en un número limitado de objetivos, incluyendo el gen de la  $\gamma$ -globina. Para distinguir estas posibilidades, se realizó el perfil de expresión de microarreglos de las células después de la desactivación de BCL11A y posterior diferenciación. El perfil de microarreglo de estas células utilizando el arreglo Affymetrix U133 Plus 2.0 revela que existe una estrecha similitud en el perfil de expresión de células no direccionadas y tratadas con ARNpi de BCL11A ( $r^2 = 0,9901$ ). La gráfica se muestra con intensidades de sonda normalizada  $\log_2$ . Los perfiles transcripcionales de los genes en el rango cuantitativo del arreglo (que excluye las globinas) fueron notablemente similares entre las células en el día 7 después del tratamiento con ARNpi de BCL11A y ARNpi no direccionadas (NT) en el día 0, con un  $r^2$  de 0,9901 para las intensidades normalizadas  $\log_2$  (Fig. 5B). Además, la morfología de estos dos grupos de células fue indistinguible a través de la diferenciación. En conjunto, estos resultados sugieren que la desactivación de BCL11A es capaz de alterar la expresión de la globina sin causar cambios globales en el estado de diferenciación de las células.

Para examinar los efectos de una reducción más persistente en la expresión de BCL11A, se utilizó la desactivación de la expresión de BCL11A mediada por ARNph lentiviral con selección de células transducidas (Moffat y colaboradores, Cell 124, 1283 (2006)). Para este propósito se eligieron dos constructos de ARNph independientes. Cuando se infectaron las células con los dos lentivirus de ARNph de BCL11A y se impuso la selección del fármaco al iniciarse la diferenciación, se observó un promedio de 97 y 60 por ciento de BCL11A desactivada a nivel de la proteína al día 5 de la diferenciación eritroide, basado en densitometría de transferencias de Western (Fig. 5C). En el día 6 de la diferenciación (etapa de proeritroblasto a eritroblasto basófilo), las células parecen ser indistinguibles, como ocurre morfológicamente también en otras etapas de diferenciación. No se pudieron observar diferencias morfológicas entre los grupos de células durante el transcurso de la diferenciación, lo que sugiere que, como en el caso de los experimentos de ARNpi, la desactivación de BCL11A no perturbó la diferenciación eritroide total (Fig. 5D).

El nivel de  $\gamma$ -globina en el día 7 de la diferenciación se elevó dramáticamente en 6,5 y 3,5 veces (de un promedio de 7,4 a 46,8 y 26%) en los dos conjuntos de desactivación mediada por ARNph de células tratadas con BCL11A en comparación con las células infectadas de control (Fig. 5E). Este efecto robusto es probable que sea el resultado tanto de la selección de células transducidas, así como la expresión continua de los ARNph tras la transducción viral. La inducción del ARN de  $\gamma$ -globina fue acompañada por niveles correspondientes de HbF maduro, como se muestra por electroforesis de hemoglobina y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Figura 5F). Los hemolizados preparados a partir de células en el día 12 de la diferenciación muestran la presencia de HbF madura. Esto se pudo evaluar utilizando la electroforesis de acetato de celulosa con hemoglobina, con el frotis de HbF mostrado en los paneles superiores y la medición correspondiente promedio de la densitometría mostrada debajo de estos paneles. Esto también podría ser cuantificado con mayor precisión por HPLC de hemoglobina, como se muestra en la parte inferior. Los picos de HbF se marcan con una flecha en cada cromatograma, con el primer pico correspondiente a HbF acetilada y la segunda HbF no modificada. La HPLC reveló que una fracción sustancial de la hemoglobina madura en estas células era HbF (con un nivel medio de 35,9 y 23,6%, en comparación con los niveles indetectables en el control). Con base en la variación en el grado de desactivación de BCL11A de los experimentos de ARNpi y ARNph y el grado concomitante de inducción de  $\gamma$ -globina observado, parece que BCL11A puede funcionar como un reóstato molecular para regular el silenciamiento del gen de  $\gamma$ -globina.

Los estudios moleculares de la conmutación de globina durante la ontogenia han servido como un paradigma para el control del desarrollo de genes de mamíferos. A pesar del extenso estudio, los mecanismos moleculares exactos que subyacen a este proceso aún no se han descubierto. Sin desear estar limitado por la teoría, los resultados aquí descritos sugieren que BCL11A es en sí mismo un modulador crítico y regulado por desarrollo de este proceso. Hemos demostrado que BCL11A reprime la expresión del gen de  $\gamma$ -globina en células eritroides humanas adultas primarias. Nuestros datos de proteínas sugieren que BCL11A funciona en concierto con el complejo represor NuRD, GATA-1, y FOG-1. Cabe destacar que los inhibidores de las histonas desacetilasas (HDAC) parecen inducir algo de HbF en pacientes con trastornos de la hemoglobina (Perrine, Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program, 38 (2005)). HDAC1 y HDAC2 son componentes del núcleo del complejo NuRD y esta asociación con BCL11A sugiere que este complejo puede ser el objetivo molecular de estas terapias. Es evidente a partir del trabajo sobre genética humana que la modulación de BCL11A puede elevar los niveles de HbF y mejorar la severidad de estas enfermedades (Lette y

colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (2008); Uda y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 105, 1620 (2008) y Menzel y colaboradores, Nat Genet 39, 1197 (2007)). Como componente específico de la etapa implicado en la represión de la expresión de la  $\gamma$ -globina, BCL11A emerge como un nuevo blanco terapéutico para la reactivación de HbF en la enfermedad de células falciformes y las  $\beta$ -talasemias. Es probable que el estudio posterior de BCL11A y sus factores asociados en la regulación genética de la globina conducirá a una mejor comprensión mecanicista del cambio fetal y la manipulación dirigida de HbF en humanos.

## Ejemplo 2

### Materiales y métodos

#### Animales experimentales

10 Todos los experimentos realizados con los ratones  $\beta$ -locus, K-RasG12D, BCL1 1A<sup>-/-</sup>, GATA1-Cre y Mx1-Cre fueron aprobados por el comité de ética animal del Hospital de Niños de Boston y el comité de ética del Centro de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson.

15 Las cepas de ratones transgénicos YAC de locus de  $\beta$ -globina ( $\beta$ -YAC) de tipo silvestre que se usaron en este estudio muestran un patrón similar de expresión génica de globina humana y son representativas de las diversas cepas de ratones transgénicos que albergan el locus entero de  $\beta$ -globina humana (Peterson, KR y colaboradores, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 7593-7, Peterson, KR y colaboradores, 1998, Hum. Mol. Genet 7: 2079-88 Harju, S. y colaboradores, 2005, Mol. Cell Biol. 25: 8765-78, Porcu, S. y colaboradores, 1997, Blood 90: 4602-9, Gaensler, KM y colaboradores, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 11381-5, Strouboulis, J., y colaboradores, 1992, Genes Dev. 6: 20 1857-64). Una línea transgénica de ratón fue proporcionada amablemente por K. Peterson y se creó con la inserción de un YAC de 213 kb que contenía el locus entero de la  $\beta$ -globina humana intacta y se ha descrito y caracterizado previamente (Peterson, KR y colaboradores, 1993; Peterson, KR, y colaboradores, 1998, Harju, S., y colaboradores, 2005, citado más arriba). Esta línea  $\beta$ -YAC contiene tres copias intactas del locus de  $\beta$ -globina humana integrado en un locus genómico único. Se usaron también dos líneas  $\beta$ -YAC (A20 y A85) que contenían una única copia de un locus YAC de  $\beta$ -globina de aproximadamente 150 kb en este estudio y han sido descritas anteriormente (Porcu, S. y colaboradores, 1997, citado más arriba) (gentilmente suministradas por K. Gaensler). Estos transgenes se mantuvieron en estado hemocigoto. Los animales se mantuvieron en un ambiente de C57B1/6 puro para todos los experimentos que implicaban análisis hematopoyéticos adultos. Se indujo un trastorno mieloproliferativo juvenil de leucemia mielomonocítica cruzando la línea Mx1-Cre con el alelo condicional K-rasG12D (Chan, IT y colaboradores, J. 2004, Clin. Invest. 113: 528-38; Braun, BS y colaboradores, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 101: 597-602), junto con el transgén  $\beta$ -YAC de K. Peterson. Se adquirieron ratones B6.SJL-PtprcaPep3b/BoyJ congénicos (Ptprca o CD45.1) de Taconic Farms o The Jackson Laboratory. Se crearon ratones que contenían un alelo flojo de BCL11A (con sitios loxP que flanqueaban el exón 1) mediante enfoques de direccionamiento génico y se describirán en trabajos futuros (G.C.I., S.D.M, y P.W.T., no publicados). Para obtener el alelo nulo de BCL11A, se cruzaron estos ratones con ratones GATA1-Cre y se seleccionaron para supresión de la línea germinal (Garrick, D. y colaboradores, 2006, PLOS Genet. 2: e58; 35 Jasinski, M., y colaboradores 98: 2248-55).

#### Análisis hematopoyético adulto

Se realizaron análisis de trasplantes de médula ósea, de hematología adulta, e inducción de 5-fluorouracilo (5-FU) como se describió anteriormente (Sankaran, VG y colaboradores, 2008, Genes Dev. 22: 463-475; Walkley, CR, y colaboradores, 2005, Nat. Cell Biol. 7: 172-8). Se analizó el PB entero en un analizador hematológico Beckman Coulter AcT (Jasinski, M., y colaboradores, 2001, citado más arriba). Los ratones receptores (CD45.1) fueron irradiados con un total de radiación gamma de 10,5 Gy (5 Gy y 5,5 Gy, espaciados 3 horas) el día del trasplante. Se aisló BM completa y se combinó a partir de ratones  $\beta$ -YAC. Se inyectaron en forma retro orbital un total de  $2 \times 10^6$  células/ratón en receptores. Se obtuvo ARN a partir de sangre utilizando el QiaAmp Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) y se realizó una RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) como se describe (Sankaran, VG y colaboradores, 2008, citado más arriba; Sankaran, VG y colaboradores, 2008, Science, 322: 1839-42) (utilizando los cebadores del gen de globina humana enumerados a continuación o los cebadores murinos previamente descritos (Kingsley, PD y colaboradores, 2006, Blood, 107: 1665-72). Los cebadores genéticos de globina humana fueron el exón 1 hacia delante de la  $\epsilon$ -globina 5'-GAGAGGCAGCAGCACATATC-3' (SEQ ID NO: 7), el exón 2 inverso de la  $\epsilon$ -globina 5'-CAGGGGTAACAACGAGGAG-3' (SEQ ID NO: 8), el exón 2 hacia delante de  $\gamma$ -globina 5'-TGGATGATCTCAAGGGCAC-3' (SEQ ID NO: 9), el exón 3 inverso de  $\gamma$ -globina 5'-TCAGTGGTATCTGGAGACA-3' (SEQ ID NO: 10), el exón 1 hacia delante de  $\beta$ -globina 5'-CTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA-3' (SEQ ID NO: 11) y el exón 2 inverso de  $\beta$ -globina 5'-AGCATCAGGAGTGGACA GAT-3' (SEQ ID NO: 12). Los cebadores del gen de la globina de ratón utilizados fueron el exón 1 hacia delante de  $\epsilon\gamma$  globina 5'-TGGCCTGTGGAGTAAGGTCAA-3' (SEQ ID NO: 13), exón 2 inverso de  $\epsilon\gamma$  globina 5'-GAAGCAGAGGACAA GTTCCCA-3' (SEQ ID NO: 14), el exón 2 hacia delante de la globina  $\beta$ h1 5'-TGGACAACCTCAAGGAGACC-3' (SEQ ID NO: 15), el exón 3 inverso de la  $\beta$ h1 globina 5'-ACCTCTGGGGTGAATTCCTT-3' (SEQ ID NO: 16), el exón 2 hacia delante de globinas  $\beta$  mayor/ $\beta$  menor 5'-TTTAACGATGGCCTGAATCACTT-3' (SEQ ID NO: 17), y el exón 3 inverso de globinas  $\beta$ -mayor/ $\beta$ -menor 5'-CAGCACAATCAGGATCATATTGC-3' (SEQ ID NO: 18). Los cebadores de qRT-PCR de

BCL11A de ratón fueron 5'-AACCCAGCACTTAAGCAAA-3' hacia delante (SEQ ID NO: 19) y 5'-ACAGGTGAGAA GGTCGTGGT-3' inverso (SEQ ID NO: 20).

#### Análisis hematopoyético de desarrollo

5 Los embriones se obtuvieron a partir de apareamientos sincronizados, se purgaron y las células positivas Ter119 se clasificaron con base en dispersión directa y lateral similar a la que se ha descrito previamente (Kingsley, P.D. y colaboradores, 2006, citado más arriba). Las células se mantuvieron en solución salina regulada con fosfato (PBS) con suero fetal de ternera (FCS) al 5%. Se añadió heparina no fraccionada en PBS a esta solución hasta una concentración final de 12,5 µg/ml. Se realizó inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal anti-HbF en secciones embebidas fijadas en parafina tal como se describió (Choi, J.W. y colaboradores, 2001, Int. J. Hematol., 74: 277-80). Se  
10 diseccionaron los hígados fetales de embriones murinos E13.5 y se creó una única suspensión celular. De forma similar, se recolectaron células de médula ósea de ratones como se ha descrito anteriormente (Sankaran, V.G., y colaboradores, 2008, Genes Dev. 22: 463-475). En ambos casos, las células se marcaron con Ter-119 y CD71, así como 7-AAD. Las poblaciones de Ter-119+/CD71+ se clasificaron como se describió anteriormente (Sankaran, V.G., y colaboradores, 2008, citado más arriba). Se obtuvieron muestras humanas de la misma etapa y se clasificaron como se  
15 ha descrito previamente (Sankaran, V.G. y colaboradores, 2008, Science 322: 1839-42). Estas muestras humanas fueron amablemente proporcionadas por H. Mikkola y B. Van Handel.

#### Análisis de transferencia de Western de BCL11A

20 La expresión de BCL11A se realizó usando el anticuerpo 14B5 (Abcam Inc., ab19487), como se describió anteriormente (Sankaran, V.G. y colaboradores, 2008, Science 322: 1839-42). La expresión de GAPDH se evaluó como un estándar usando anticuerpo policlonal de conejo FL-335 (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-25778).

#### ARN transcrito primario mediante FISH

25 El ARN transcrito primario mediante FISH se realizó en gran parte como se ha descrito previamente (Wijgerde, M., y colaboradores, 1995, Nature 377: 209-13; Ragozy, T., y colaboradores, 2006, Genes Dev. 20, 1447-57) con algunas modificaciones. Antes de la hibridación, se equilibraron los portaobjetos en formamida al 50% / 2X SSC, pH 7,0. Se generaron sondas de ADN de cadena sencilla contra los intrones de los genes de  $\alpha$  y  $\epsilon\gamma$ -globina murinos y  $\gamma$  y  $\beta$ -globina por transcripción *in vitro* de fragmentos de intrón clonados seguido por transcripción inversa e inclusión de DIG-11-dUTP, biotina-16-dUTP (Roche) o DNP-11-dUTP (Perkin Elmer) en reacciones como las descritas (Bolland, DJ y  
30 colaboradores, 2004, Nat. Immunol., 5: 630-7). Se hibridaron las sondas marcadas con las células en formamida al 50% / sulfato de dextrano al 10% / 2X SSC / complejo de vanadato de ribonucleótido 5 mM / BSA al 0,05% / 0,1 mg/ml de ADN de Cot-1 / 1 µg/µl de ARNt de *E. coli*. Las sondas se desnaturalizaron térmicamente a 80°C durante 5 minutos, se hibridaron previamente a 37°C y después se hibridaron durante la noche a 37°C en una cámara húmeda. Se lavaron los portaobjetos en formamida al 50% / 2X SSC 2X, pH 7 a 37°C, se enjuagaron en 2X SSC y se bloquearon en NaCl 145 mM / Tris 0,1 M a pH 7,5 / BSA al 2% / complejo de vanadato de ribonucleótido 2 mM. Los focos de transcrito primario se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos conjugados con Cy3, Alexa Fluor 488 y 647,  
35 incluyendo una o dos capas de amplificación de señal, tal como se ha descrito (Trimborn, T., y colaboradores, 1999, Genes Dev. 13, 112-24).

#### Adquisición y análisis de imágenes de FISH

40 Se capturaron pilas de imágenes (secciones Z separadas 0,25 µm) en un microscopio Olympus IX71 (objetivo Olympus 100X/1,40, UPLS Apo) equipado con una cámara CCD enfriada usando el software Deltavision SoftWorx (Applied Precision). La presencia de los transcritos primarios del gen de la globina se determinó en proyecciones bidimensionales de las pilas Z usando PhotoShop (Adobe). Se analizaron aproximadamente 100-200 núcleos para cada conjunto de sondas y etapa de maduración.

#### Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de células eritroides primarias

45 Se cosecharon progenitores eritroides derivados de CD34 humana al día 5 de la diferenciación (estado de proeritroblastos). Las células se fijaron usando una concentración final al 1% de formaldehído y se dejó que prosiguiera el entrecruzamiento durante 10 minutos. Después se introdujo glicina hasta una concentración final de 125 mM para detener el entrecruzamiento. Las células se lavaron dos veces en PBS y se almacenaron los sedimentos celulares a -80°C. Típicamente se usaron ~ 15-20 X10<sup>6</sup> células por reacción ChIP. Los ensayos ChIP se realizaron de una manera similar a lo que se ha descrito previamente en J. Kim, y colaboradores, 2008, Cell 132: 1049. El regulador de sonicación se modificó con el uso de SDS al 0,5%, en lugar de 0,1%. El procedimiento de sonicación se modificó con el uso de 4 a  
50 6 pulsos de 30 segundos, cada uno implicando una sonicación constante. Este procedimiento exacto produce típicamente fragmentos en el rango de 300-1000 pares de bases con este procedimiento. Se usaron los siguientes anticuerpos para el procedimiento ChIP: BCL11A [14B5] (Abcam, ab19487), BCL11A [15E3AC11] (Abcam, ab18688),

BCL11A (Novus Biologicals, Inc. NB600-261), e IgG de conejo (Upstate, 12-370). Se obtuvieron resultados similares con todos los anticuerpos BCL11A en todas las regiones ensayadas.

Las muestras de ChIP se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (BioRad). Todos los cebadores se ensayaron para determinar la eficacia de la PCR según las recomendaciones del fabricante (BioRad). Se preparó una curva estándar para cada conjunto de cebadores usando titulación en serie del ADN de entrada. La cantidad relativa de cromatina precipitada (porcentaje de entrada) se calculó a partir de curvas patrón específicas de cebadores usando el software de análisis de datos iCycler. Los cebadores específicos se diseñaron para amplificar secuencias en el HS3; región promotora de HBG1; región secuencia abajo de HBG1 (+ 3 kb); región secuencia arriba de HBD (-1 kb); y la región promotora de HBB del locus de  $\beta$ -globina humana. Además, se utilizó un conjunto de cebadores degenerado que se unió a los promotores tanto de HBG2 como de HBG1 y mostró resultados similares al conjunto de cebadores del promotor HBG1 (sin que se haya detectado ningún enriquecimiento).

## Resultados

No se conoce bien la contribución de los cambios en los elementos cis-reguladores o factores de acción trans a las diferencias entre especies en la expresión génica. Los loci de la  $\beta$ -globina de los mamíferos han servido como un paradigma para la regulación génica durante el desarrollo. Los ratones transgénicos que albergan el locus de la  $\beta$ -globina humana, que consiste en los genes embrionarios enlazados ( $\epsilon$ ), fetal ( $\gamma$ ) y adulto ( $\beta$ ), se han utilizado como un sistema modelo para estudiar el cambio temporal de la hemoglobina fetal a adulta, como ocurre en humanos. Los inventores muestran que los genes de la  $\gamma$ -globina humana en estos ratones se comportan como genes de globina embrionaria murina, revelando una limitación del modelo y demostrando que han surgido diferencias críticas en el medio de acción trans durante la evolución de los mamíferos. Los inventores muestran que la expresión de BCL11A, un represor de la expresión de la  $\gamma$ -globina humana identificada a través de estudios de asociación en todo el genoma, difiere entre ratones y humanos. El silenciamiento del desarrollo de la globina embrionaria de ratones y los genes de la  $\gamma$ -globina humana no ocurre en ratones en ausencia de BCL11A. Por lo tanto, BCL11A es un mediador crítico del cambio de globina de especie divergentes. Comparando la ontogenia de la regulación del gen de la  $\beta$ -globina en ratones y seres humanos, los inventores han mostrado que las alteraciones en la expresión de un factor de acción trans constituyen un impulsor crítico de los cambios de expresión génica durante la evolución.

La medida en que los cambios en los elementos reguladores cis o en el entorno de acción trans representan diferencias en la expresión génica en especies estrechamente relacionadas es el tema del debate (Carroll, SB, 2008, Cell 134: 25-36; Hoekstra, HE y Coyne, JA, 2007, Evolution 61: 995-1016). Algunos estudios sugieren que los cambios en los elementos reguladores cis son en gran parte responsables de muchas diferencias entre especies en la expresión génica (Wallace, HA y colaboradores, 2007, Cell 128: 197-209, Wilson, MD y colaboradores, 2008, Science 322: 434-8). La contribución de las alteraciones en el medio de acción trans está menos establecida. Con sus cambios temporales de expresión de la globina, los loci de la  $\beta$ -globina de mamíferos sirven como un paradigma para la regulación genética de desarrollo (McGrath, K. y Palis, J., 2008, Curr. Top. Dev. Biol. 82: 1-22). Para estudiar la regulación de los elementos cis humanos en un entorno que actúa en forma trans de ratones, los inventores emplearon ratones transgénicos de locus de  $\beta$ -globina humana (ratones  $\beta$ -locus). La regulación del locus de  $\beta$ -globina humana ha sido ampliamente estudiada usando tales modelos de ratón (Wijgerde, M., y colaboradores, 1995, Nature 377: 209-13; Peterson, KR y colaboradores, 1998, Hum. Mol. Genet, 7: 2079-88; Porcu, S. y colaboradores, 1997, Blood 90: 4602-9). Se acepta generalmente que estos ratones proporcionan un sistema válido para evaluar la regulación del gen de la globina de desarrollo humano, aunque se han observado algunas diferencias entre los seres humanos y estos ratones. Por ejemplo, el inicio de la expresión de la  $\gamma$ -globina ocurre durante la etapa embrionaria del saco vitelino de la eritropoyesis en el ratón, mientras que la expresión de alto nivel de este gen ocurre durante la etapa hepática fetal en el hombre. Además, el cambio de la  $\gamma$ -globina en  $\beta$ -globina adulta ocurre durante la eritropoyesis temprana del hígado fetal en estos ratones (Wijgerde, M., y colaboradores, 1995; Peterson, KR y colaboradores, 1998, Porcu, S. y colaboradores, 1997, citado más arriba), mientras que ocurre alrededor del tiempo de nacimiento en seres humanos (Peschle, C. y colaboradores, 1985, Nature 313, 235-8). Además, se han observado diferencias en la capacidad de estos ratones para responder a las respuestas inductoras de hemoglobina fetal (HbF) que son activas en seres humanos (Sloane-Stanley, J., 2006, Br. J. Haematol, 135: 735-7; Pace, B., y colaboradores, 1994, Blood 84: 4344-53). Los inventores comenzaron por evaluar si estos ratones responden a estímulos que consistentemente aumentan el nivel de HbF en seres humanos (Papayannopoulou, T., y colaboradores, 1984, Science 224: 617-9). Los inventores encontraron que estos ratones tienen niveles basales mucho más bajos de expresión de  $\gamma$ -globina que los humanos adultos y fallan en responder a estímulos que resultan en niveles elevados de HbF en seres humanos (Figura 10). El gráfico muestra, respectivamente, la medición de la línea de base en ratones adultos ( $n = 10$ ), trasplantes de médula ósea con células de médula de  $2 \times 10^6$  donantes (ratones  $\beta$ -locus) (Alter, BP, y colaboradores, 1976, Blood 48: 843-53) ( $n = 10$ ) los días 10 y 17 después del trasplante, tratamiento con 5-FU cuando las citopenias están en su nadir el día 7 ( $n = 10$ ) y un tipo de leucemia mielomonocítica juvenil (JMML) del trastorno mieloproliferativo de la activación de K-ras (Braun, BS y colaboradores, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 101: 597-602; Chan, IT y colaboradores, 2004, J. Clin. Invest. 113: 528-38) ( $n = 3$ ). Los datos se representan como porcentaje de  $\gamma$ -globina sobre los niveles de genes de globina tipo  $\beta$  humana total calculados sobre la base de los resultados de qRT-PCR. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Es de destacar que el nivel basal de  $\gamma$ -globina es 50 a 100 veces menor que en adultos humanos (Oneal, PA y colaboradores, 2006, Blood 108: 2081-6; Nathan, DG, y colaboradores, 2003, en Hematology of infancy

and childhood, 2 v. (xiv, 1864, xli p.) (Saunders, Filadelfia, Pa.). También, en un modelo de leucemia mielomonocítica juvenil creada en estos ratones, no se observó ninguna elevación en los niveles de  $\gamma$ -globina, en contraste con los altos niveles de  $\gamma$ -globina observados en seres humanos con este síndrome (Weatherall, DJ y colaboradores, 1975, Nature 257: 710-2).

5 Los genes de la  $\gamma$ -globina fetal humana se comportan como genes embrionarios en el ratón

Para perseguir la base subyacente de estas diferencias entre especies, los inventores reevaluaron la ontogenia de la expresión de  $\gamma$ -globina humana durante el desarrollo del ratón. Los inventores aislaron primero la sangre circulante de embriones en un momento en que se observó la expresión de la  $\gamma$ -globina (E13.5) (Wijgerde, M., y colaboradores, 1995, Nature 377: 209-13; Peterson, KR y colaboradores 1998, Hum. Mol. Genet. 7: 2079-88; Porcu, S. y colaboradores, 1997, Blood 90: 4602-9). Utilizando diferencias en el tamaño de las células que permiten la separación de células de linaje primitivo y definitivo circulantes usando citometría de flujo (Kingsley, PD y colaboradores, 2006, Blood, 107: 1665 - 72; Fraser, ST, y colaboradores, 2007, Blood, 109: 343-52), los inventores enriquecieron las células eritroides en sangre de ratones  $\beta$ -locus embrionarios de día 13.5 (E13.5) (Figura 6A). Como se anticipó, la expresión del gen embrionario de  $\epsilon\gamma$  globina, un gen confinado al linaje eritroide primitivo junto con la globina  $\beta h1$  de ratón (Kingsley, PD y colaboradores, 2006, Blood, 107: 1665-72; Fraser, ST, y colaboradores, 2007, Blood, 109: 343-52), se enriqueció (aproximadamente 5 veces) en la población primitiva con respecto a la población definitiva (Figura 6B). En consonancia con esta distribución, se enriquecieron similarmente transcritos de  $\epsilon$ -globina embrionarios humanos en la población primitiva (Figura 6B). Sorprendentemente, no se observó diferencia entre el enriquecimiento relativo de los genes embrionarios y el grado de enriquecimiento de los transcritos de  $\gamma$ -globina humana en la población eritroide primitiva en comparación con las células definitivas (Figura 6B). Este hallazgo indica que los genes de la  $\gamma$ -globina humana no se expresan de forma robusta en células eritroides definitivas tempranas en ratones  $\beta$ -locus.

Los inventores utilizaron entonces inmunohistoquímica (IHC) de  $\gamma$ -globina en embriones E13.5 para examinar su distribución celular. IHC de hígado fetal humano (FL) reveló el etiquetado positivo de todos los eritroblastos (Fig. 6C). Por el contrario, la mayoría de los eritroblastos presentes en el FL murino de ratones  $\beta$ -locus no tiñó la  $\gamma$ -globina. Los inventores observaron células megaloblásticas nucleadas grandes ocasionales en FL positivo para  $\gamma$ -globina (Fig. 6D y 6E). Morfológicamente, estas células se asemejan a células primitivas que continúan circulando en cantidades sustanciales durante este período de gestación (McGrath, K. y Palis, J., 2008, Curr. Top. Dev. Biol. 82: 1-22). En consonancia con esta interpretación, las numerosas células positivas para  $\gamma$ -globina observadas en la circulación eran todas células primitivas megaloblásticas, mientras que las células enucleadas más pequeñas definitivas eran uniformemente negativas (Fig. 6E y 6F). Para generalizar estos hallazgos, los inventores realizaron tinción inmunohistoquímica similar en otras líneas derivadas independientemente de ratones  $\beta$ -locus (Fig. 6G y 6H) (Porcu, S. y colaboradores, 1997, Blood 90: 4602-9). En todas las líneas, la expresión de  $\gamma$ -globina (como se indica por IHC positiva) se limitó a las células megaloblásticas circulantes que eran poco frecuentes en el parénquima de FL. Como se han hecho observaciones similares en ratones  $\beta$ -locus derivados independientes, los hallazgos de los inventores demuestran un rasgo característico de ratones  $\beta$ -locus.

Un solo análisis de células confirma el comportamiento divergente de loci de  $\beta$ -globina humana en ratones

Para obtener una visión adicional a nivel de una célula única, los inventores emplearon fluorescencia de ARN de transcrito primario en hibridación *in situ* (PT-FISH) para examinar la expresión relativa de los genes endógenos de globina humana y de ratón en diferentes etapas de ontogenia (Ragoczy, T., y colaboradores, 2006, Genes Dev. 20: 1447-57, Trimborn, T., 1999, Genes Dev. 13: 112-24). En primer lugar, los inventores examinaron la expresión relativa de  $\gamma$  y  $\beta$ -globina humana (con  $\alpha$ -globina murina como control) en células eritroides primitivas E11.5 de dos líneas transgénicas independientes (A20 y A85). De acuerdo con análisis previos que demuestran la expresión de alto nivel de  $\gamma$ -globina en la fase eritroide primitiva en ratones  $\beta$ -locus, los inventores observaron una expresión relativamente alta de  $\gamma$ -globina por PT-FISH, con expresión baja o ausente de  $\beta$ -globina humana (Fig. 7A y 2B). Entre las células primitivas circulantes de una etapa posterior de desarrollo (E13.5) se observó un patrón similar, aunque se observó más expresión de  $\beta$ -globina humana y una reducción general en el porcentaje de células con una señal de PT-FISH (utilizando el control de  $\alpha$ -globina murina), con sólo una fracción de las células ( $\sim 1/3$ ) mostrando loci transcripcionalmente activos en un solo punto de tiempo (Figuras 7A y 7B). Se muestran ejemplos de las células usadas en este análisis (datos no mostrados). Una observación interesante realizada con el análisis concomitante de PT-FISH de  $\gamma$  y  $\beta$ -globina humana es la extensión de transcripción conjunta, que representa la presencia concomitante de dos señales de transcritos primarios dentro del mismo locus de genes (datos no mostrados).

Análisis de transcripción conjunta mediante análisis de hibridación *in situ* de fluorescencia de transcritos primarios (PT-FISH) análisis

55 La transcripción conjunta se define como la presencia simultánea de dos señales de transcritos primarios del mismo locus genético en una sola célula. Se observa una alta frecuencia de transcripción conjunta en este análisis, particularmente en etapas en las que se expresa poco del gen de la  $\gamma$ -globina madura. En las células sanguíneas periféricas (células primitivas circulantes) del día embrionario 13,5 (E13.5), 19 y 21% (en las líneas A85 y A20, respectivamente) de células que expresan  $\gamma$ -globina muestran transcripción conjunta de  $\beta$ -globina (datos no mostrados).

En las células de hígado fetal de E13.5, este grado de superposición aumenta dramáticamente, con 52 y 55% de células que expresan  $\gamma$ -globina que muestra transcripción conjunta de  $\beta$ -globina (datos no mostrados). La naturaleza de dicha transcripción conjunta no está clara. Anteriormente se ha atribuido a un mecanismo de cambio repentino (*flip-flop*) rápido de la región de control del locus (LCR) con los genes de globina secuencia abajo (Wijgerde, M., y colaboradores, 1995, *Nature* 377: 209-13). Los resultados sugieren que los transcritos primarios pueden ser generados por transcripción conjunta incluso en ausencia de transcripción robusta (como se ha indicado para  $\gamma$ -globina en células de FL E13.5). Dado que PT-FISH se limita a una sola instantánea de transcripción, no está claro si la tasa de transcripción en loci transcritos conjuntamente es comparable. Estos hallazgos sugieren que la tasa y/o eficiencia en estos loci concomitantemente transcritos probablemente varíen y por lo tanto la presencia de transcritos primarios, particularmente en el contexto de la transcripción conjunta, puede no indicar producción eficiente de transcritos maduros.

La comparación de  $\epsilon\gamma$ -globina embrionaria de ratón con  $\gamma$ -globina reveló una expresión similar del gen embrionario de ratón con  $\gamma$ -globina humana en células primitivas circulantes de E13.5 (Figs. 7C y 7D). Este hallazgo indica que la expresión de los genes de la  $\gamma$ -globina humana es paralela a la de los genes embrionarios de tipo  $\beta$  de ratón en el entorno de acción trans de ratón. Las células de FL de E13.5 se analizaron de una manera similar, examinando la expresión de  $\epsilon\gamma$  de ratón y  $\gamma$ -globina humana por PT-FISH en estas células. Sólo un bajo porcentaje de células mostraron tinción de  $\epsilon\gamma$  o de  $\gamma$ -globina (Figs. 7C y 7D), en comparación con la transcripción robusta de la  $\beta$ -globina humana de la misma etapa (Figs. 7A y 7B). Consistente con análisis de desarrollo previos en ratones (Kingsley, PD y colaboradores, 2006, *Blood*, 107: 1665-72; Trimborn, T., 1999, *Genes Dev.* 13: 112-24), las células positivas para  $\epsilon\gamma$  de ratón representan células primitivas circulantes presentes en el hígado fetal de ratón. Las células que son positivas para la expresión de la  $\gamma$ -globina humana también son probablemente células eritroides primitivas, y es importante reconocer que en estas células sólo una fracción (~ 1/3) de loci están activos en cualquier punto de tiempo, limitando por lo tanto el grado de expresión concomitante observado. Cabe resaltar que 45 y 54% (en las líneas A85 y A20, respectivamente) de las células primitivas de E 13.5 (PBC) con transcripto de  $\gamma$ -globina mostraron expresión de  $\epsilon\gamma$  globina, apoyando la noción de que  $\gamma$ -globina es tratada como un gen embrionario en el entorno que actúa trans de ratón. De manera interesante, un análisis temprano de transgenes de expresión muy baja que carecen de secuencias reguladoras críticas de región del locus ha sugerido que la  $\gamma$ -globina se comporta efectivamente como un gen embrionario, como se ha demostrado para ratones que contienen todo el  $\beta$ -locus humano expresado en forma robusta (Chada K., y colaboradores, 1986, *Nature* 319: 685-9).

BCL11A restringe la expresión de la globina tipo  $\beta$  embrionaria de ratón al linaje primitivo

A partir de estos resultados se llegó a la conclusión de que el entorno de acción trans eritroide de ratón homólogo difiere de aquel del humano, presumiblemente con respecto a la composición o la regulación de reguladores transcripcionales críticos. Recientemente se ha demostrado que el gen BCL11A, que alberga variantes genéticas que afectan los niveles de HbF en seres humanos (Uda, M. y colaboradores, 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 105: 1620-5; Lettre, G. *Sci. EE.UU.* 105: 11869-74, Menzel, S. y colaboradores, 2007, *Nat. Genet.* 39: 1197-9, Sedgewick, AE y colaboradores, 2008, *Blood Cells Mol. Dis.* 41: 255-8), codifica un represor específico de la etapa de desarrollo de los genes de la  $\gamma$ -globina humana (Sankaran, VG y colaboradores, 2008, *Science* 322: 1839-42). Los hallazgos previos se limitaron a un análisis de células eritroides humanas, donde se encontró que las formas de BCL11A de longitud completa se expresaron de forma robusta en eritroblastos de médula ósea adultos, a niveles sustancialmente más bajos en FL y ausentes en eritroblastos primitivos. Además, las formas variantes más cortas de BCL11A se expresan en eritroblastos primitivos humanos y de FL, los cuales expresan  $\gamma$ -globina. Para investigar las diferencias de especies potenciales en la expresión de la proteína BCL11A, se examinó las poblaciones clasificadas por FACS de la misma etapa, de células eritroides humanas y de ratón. Sorprendentemente, la comparación de la expresión de BCL11A en muestras de ratón y humanas revela diferencias sorprendentes (Fig. 8A, Fig. 11). La expresión de ARN de BCL11A medida por qRT-PCR en poblaciones clasificadas de células de la misma etapa (clasificadas para CD71 y Ter-119) de diferentes etapas de desarrollo en ratones demuestra que el ARN de BCL11A se expresa en niveles similares en todas las poblaciones definitivas de células murinas, pero estaba ausente o expresado a niveles notablemente reducidos en células primitivas (normalizadas a GAPDH). En primer lugar, la proteína BCL11A y los transcritos de ARN están ausentes en células eritroides primitivas de ratones. En segundo lugar, las formas de longitud completa de BCL11A se expresan en niveles similares en células eritroides definitivas tanto de FL de ratón como de médula ósea, mientras que no se pueden identificar formas variantes más cortas en ratones (Figura 8A). Además, formas de variantes cortas están presentes en estas etapas de desarrollo tempranas. Todas las células humanas se clasificaron para la expresión de CD235 y CD71. Por el contrario, en las células murinas, la expresión de la proteína BCL11A de longitud completa es evidente en todas las poblaciones progenitoras definitivas, incluyendo células eritroides de médula ósea e hígado fetal E13.5 de la misma etapa clasificadas (todas las poblaciones se clasificaron para Ter119+/CD71+). No se detectó expresión de BCL11A dentro de poblaciones de células primitivas murinas. Estos resultados ponen de relieve las importantes diferencias entre especies que podrían desempeñar potencialmente un papel en la mediación de la regulación divergente del gen de la globina. Se muestra un modelo basado en nuestros hallazgos de la expresión de desarrollo de los genes de globina tipo  $\beta$  en humanos, ratones y ratones  $\beta$ -locus, junto con un resumen de la expresión de BCL11A en estas dos especies (Figura 8B).

Los inventores demostraron que la expresión de los genes de la  $\gamma$ -globina humana es estrictamente paralela a la de los genes embrionarios de ratón,  $\epsilon\gamma$  y  $\beta$ h1, en el contexto del entorno de acción trans de ratón. Por otra parte, el patrón de

expresión de BCL11A sugiere un papel a través de la eritropoyesis definitiva en ratones, en contraposición a su función predominante después del nacimiento en los seres humanos. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que los cambios en la expresión de BCL11A puede ser responsable, al menos en parte, de la expresión divergente observada entre especies de genes de globina tipo  $\beta$ . Para probar directamente un papel potencial de BCL11A en el silenciamiento de los genes embrionarios endógenos en el linaje eritroide definitivo, se examinaron ratones desactivados para BCL11A. Como se ha descrito anteriormente (Liu, P. y colaboradores, 2003, *Nat. Immunol.*, 4: 525-32), los ratones BCL11A  $-/-$  mueren en el período perinatal por causas desconocidas. Se examinaron los ratones BCL11A  $-/-$  en E14.5 y E18.5 durante la gestación cuando está teniendo lugar una eritropoyesis definitiva robusta dentro del FL (Fig. 12). Por enfoques fenotípicos y morfológicos (Sankaran, VG y colaboradores, 2008, *Genes Dev.* 22: 463-475; Zhang, J., y colaboradores, 2003, *Blood*, 102: 3938-46), la eritropoyesis apareció ostensiblemente normal dentro de estos embriones (Fig. 9A, Figuras 13-15). A continuación, se evaluó la expresión de los genes de la globina de ratón. En fuerte apoyo a la hipótesis de los inventores, se observó que el silenciamiento de la expresión de genes de globina embrionaria de ratón no se produce en células eritroides de FL E14.5 y E18.5 FL (Fig. 9B-E, Fig. 16). Se pierde la restricción de la expresión de la globina embrionaria para el linaje primitivo. La expresión de los genes de la globina  $\epsilon\gamma$  y  $\beta h1$  fue sobrerregulada en 70 y 350 veces, respectivamente, a E14.5 (Figura 9B). En conjunto, estos genes de globina embrionaria representan el 50 por ciento de los genes de globina tipo  $\beta$  en esta etapa, en comparación con el 0,4 por ciento en los controles. En E18.5, mientras que la contribución de sus transcritos a los transcritos totales de globina tipo  $\beta$  fue algo reducida, los transcritos de globina  $\epsilon\gamma$  y  $\beta h1$  fueron 2600 y 7600 veces superiores comparado con los controles (Fig. 9C). Para determinar la distribución celular de las globinas embrionarias de ratón, se realizó inmunohistoquímica. Utilizando este enfoque se encontró que las globinas  $\beta h1$  y  $\epsilon\gamma$  fueron expresadas en forma robusta en células eritroides definitivas (Fig. 9D y 9E, Fig. 17), mientras que normalmente estas globinas embrionarias se limitan al linaje eritroide primitivo (McGrath, K. y Palis, J., 2008, *Curr. Top. Dev. Biol.* 82: 1-22) (Figura 8B).

El silenciamiento de la expresión de  $\gamma$ -globina humana depende de BCL11A

A continuación se examinó la consecuencia de la pérdida de BCL11A en la regulación de genes de globina humana en los ratones  $\beta$ -locus. Al introducir el transgén  $\beta$ -locus en el ambiente desactivado, se encontró que en ausencia de BCL11A, el silenciamiento de desarrollo de los genes de  $\gamma$ -globina está marcadamente deteriorado en el linaje eritroide definitivo (Fig. 9F, Fig. 18). En el ARN de  $\gamma$ -globina de ratones de control BCL11A  $-/-$ ,  $+/-$  y de compañeros de camada comprendía 76, 20 y 0,24 por ciento del ARN del gen de la globina tipo  $\beta$  total en E18.5, respectivamente (Figura 9F, Figura 18). La relajación del silenciamiento génico de la  $\gamma$ -globina en los heterocigotos BCL11A  $+/-$  es consistente con la asociación genética de los niveles de BCL11A y HbF y extiende nuestras observaciones previas utilizando enfoques desactivados en células humanas (Sankaran, VG y colaboradores, 2008, *Science* 322: 1839-42) que juntos apuntan a BCL11A como regulador cuantitativo de la expresión de  $\gamma$ -globina. El fracaso del silenciamiento génico de la  $\gamma$ -globina frente a una eritropoyesis aparentemente normal, proporciona evidencia convincente de que BCL11A es un regulador principal de los cambios de globina en la ontogenia humana y de ratón.

En principio, el BCL11A puede influir en la expresión génica de la globina ya sea directamente interactuando con elementos reguladores cis dentro del grupo de  $\beta$ -globina o indirectamente afectando el ciclo celular u otras vías que finalmente inciden en la expresión de HbF. Para discriminar estas posibilidades, se utilizó inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para estudiar progenitores eritroides humanos primarios. No se detectó la ocupación ni de los promotores proximales y ni  $\beta$ -globina. En vez de eso, se observó una unión robusta en varias otras regiones del grupo de  $\beta$ -globina (Figura 19). Estos incluyen el tercer sitio de hipersensibilidad (HS3) de la región de control de locus (LCR) (PA Navas y colaboradores, 1998, *Mol. Cell. Biol.* 18: 4188), la región de alta supresión de Corfú asociada a HbF secuencia arriba del gen de la  $\delta$ -globina (A. Bank, 2006, *Blood* 107: 435) y otra región secuencia abajo del gen de la  $A\gamma$ -globina que se suprime comúnmente en ciertas formas de persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (A. Bank, 2006, *Blood* 107: 435). De particular importancia, se ha sugerido que todos estos elementos cis juegan un papel en el silenciamiento de  $\gamma$ -globina. Los presentes resultados argumentan fuertemente que BCL11A actúa dentro del grupo  $\beta$ -globina. Las variantes más cortas de BCL11A presentes en las células que expresan activamente la  $\gamma$ -globina pueden participar en otros aspectos de la regulación transcripcional dentro del grupo de  $\beta$ -globina. Por lo tanto, BCL11A, a diferentes niveles y en sus formas variantes, reconfigura el locus de  $\beta$ -globina en diferentes etapas de desarrollo.

Conclusión

Tomados en conjunto, los presentes hallazgos demuestran cómo los cambios en la expresión de un único factor de transacción a lo largo del transcurso de la evolución pueden conducir a la expresión alterada del gen de desarrollo. Se muestra aquí que los elementos cis dentro del locus de la  $\beta$ -globina humana son insuficientes para recapitular la regulación apropiada del desarrollo en un contexto de ratón. Anteriormente se ha postulado que la evolución de la expresión del gen de la globina tipo  $\beta$  es mediada en gran medida a través de cambios en los elementos cis (Johnson, R.M. y colaboradores, 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 103: 3186-91). Los hallazgos en este documento argumentan persuasivamente que los cambios en los factores transaccionales pueden ejercer efectos sorprendentes en la conmutación de genes durante el desarrollo. BCL11A sirve para silenciar los genes embrionarios en las células eritroides definitivas de ratón, en contraste con su papel en los seres humanos donde actúa para silenciar la expresión de  $\gamma$ -globina después del nacimiento. Además, se demuestra que BCL11A es un poderoso regulador de los cambios de globina de diferentes especies, demostrando que el gen de  $\gamma$ -globina escapa del silenciamiento adecuado de desarrollo

- 5 en un entorno BCL11A -/- de acción trans de ratón. Los presentes hallazgos indican un modelo en el que uno (o más) silenciadores de acción trans de los genes de la globina embrionaria, expresados inicialmente a lo largo de la eritropoyesis definitiva, se han alterado durante la evolución de los primates, de modo que su expresión se traslada a una fase posterior de eritropoyesis definitiva, permitiendo la evolución de una única etapa de expresión de la hemoglobina fetal. En la presente memoria, se muestra que BCL11A representa uno de los factores principales que regulan este cambio. Estos hallazgos permiten simplificar los modelos moleculares que explican esta transición crítica de desarrollo. Este trabajo proporciona no sólo ideas únicas sobre cómo las alteraciones en la expresión génica se producen en el curso de la evolución, sino que también revela pistas mecánicas adicionales al cambio clínicamente importante de la hemoglobina fetal a adulta en humanos.
- 10 Listado de secuencias
- <110> CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION
- <120> MODULACIÓN DE BCL11A PARA EL TRATAMIENTO DE HEMOGLOBINOPATIAS
- <130> 701039-062892-PCT
- <140>
- 15 <141>
- <150> 61/222.571
- <151> 2009-07-02
- <150> 61/097.017
- <151> 2008-09-15
- 20 <160> 28
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 19
- <212> ARN
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético
- <400> 1
- gagcacaac ggaacaau 19
- 30 <210> 2
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 2  
gccacaggau gacgauugu 19  
<210> 3  
<211> 19  
5 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético  
<400> 3  
10 gcacuaaagc aaacgggaa 19  
<210> 4  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
15 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético  
<400> 4  
acagaacacu cauggauua 19  
<210> 5  
20 <211> 58  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético  
25 <400> 5  
ccggcgca gaacactcat ggattctcga gaatccatga ggttctgtg cgtttttg 58  
<210> 6  
<211> 58  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial  
<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético  
 <400> 6  
 ccggccagag gatgacgatt gtttactcga gtaacaatc gtcacacctt ggTTTTG 58  
 <210> 7  
 5 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético  
 10 <400> 7  
 gagaggcagc agcacatat 20  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 8  
 caggggtaaa caacgaggag 20  
 20 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 9  
 tggatgatct caagggcac 19  
 <210> 10  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 10

tcagtggat ctggaggaca 20

5 <210> 11

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 11

ctgaggagaa gtctgccgtt a 21

<210> 12

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 12

20 agcatcagga gtggacagat 20

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 13

tggcctgtgg agtaaggta a 21

<210> 14

30 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 14

5 gaagcagagg acaagttccc a 21

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 15

tggacaacct caaggagacc 20

<210> 16

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

20 <400> 16

acctctgggg tgaattcct 20

<210> 17

<211> 23

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 17

ttaaactgatg gcctgaatca ctt 23

30 <210> 18

<211> 23

- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
- 5 <400> 18
- cagcacaatc acgatcatat tgc 23
- <210> 19
- <211> 20
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
- <400> 19
- aaccccagca ctaagcaaa 20
- 15 <210> 20
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
- <400> 20
- acagtgaga aggtcgtggt 20
- <210> 21
- <211> 23
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético
- <220>
- 30 <221> base modificada
- <222> (3)..(21)

<223> a, c, g, t, desconocido u otro

<400> 21

aanannnnnnn nnnnnnnnnn ntt 23

<210> 22

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 22

Met Ser Arg Arg Lys Gln Gly Lys Pro Gln His Leu Ser Lys Arg Glu  
 1 5 10 15

10 <210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

15 Met Ser Arg Arg Lys Gln Gly Lys Pro Gln His Leu Ser Lys Arg Glu  
 1 5 10 15

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

20 <400> 24

Met Ser Arg Arg Lys Gln Gly Asn Pro Gln His Leu Ser Gln Arg Glu  
 1 5 10 15

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

25 <213> Mus sp.

<400> 25

Met Ser Arg Arg Lys Gln Ser Asn Pro Arg Gln Ile Lys Arg Ser Leu  
 1 5 10 15

<210> 26

ES 2 615 829 T3

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 26

5 Met Ser Arg Arg Lys Gln Ala Lys Pro Arg Ser Leu Lys Asp Pro Asn  
1 5 10 15

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

10 <400> 27

Met Ser Arg Arg Lys Gln Ala Lys Pro Arg Ser Val Lys Val Glu Glu  
1 5 10 15

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Mus sp.

<400> 28

Met Ser Arg Arg Lys Gln Ala Lys Pro Gln His Phe Gln Ser Asp Pro  
1 5 10 15

## Reivindicaciones

- 5 1. Un método *ex vivo* o *in vitro* para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula, comprendiendo el método las etapas de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética con una cantidad eficaz de una composición que comprende un inhibidor de BCL11A, por lo cual aumenta la expresión de hemoglobina fetal en dicha célula, o su progenie, en relación con dicha célula antes de dicha puesta en contacto, en donde el inhibidor de BCL11A es un ácido nucleico específico de BCL11A que inhibe la expresión de BCL11A, y en donde el ácido nucleico específico de BCL11A es un agente de ARN de interferencia específico de BCL11A, un vector que codifica un agente de ARN de interferencia específico de BCL11A, un constructo o molécula antisentido, o una ribozima.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho agente de ARN de interferencia comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1-6.
- 15 3. Una composición que comprende un inhibidor de BCL11A para uso en el tratamiento y/o prevención de una hemoglobinopatía, en donde el inhibidor de BCL11A es un ácido nucleico específico de BCL11A que inhibe la expresión de BCL11A y en donde el ácido nucleico específico de BCL11A es un agente de ARN de interferencia específico de BCL11A, un vector que codifica un agente de ARN de interferencia específico de BCL11A, un constructo o molécula antisentido, o una ribozima.
- 20 4. La composición para uso en el tratamiento y/o prevención de una hemoglobinopatía de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha hemoglobinopatía es una  $\beta$ -hemoglobinopatía, o una enfermedad de células falciformes, o  $\beta$ -talasemia.
- 25 5. La composición para uso en el tratamiento y/o prevención de una hemoglobinopatía de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el uso comprende poner en contacto una célula progenitora hematopoyética con dicha composición *ex vivo* o *in vitro* y administrar dicha célula o su progenie a un mamífero.
6. La composición para uso en el tratamiento y/o prevención de una hemoglobinopatía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la composición comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
7. La composición para uso en el tratamiento y/o prevención de una hemoglobinopatía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicho agente de ARN de interferencia comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1-6.

Figura 1

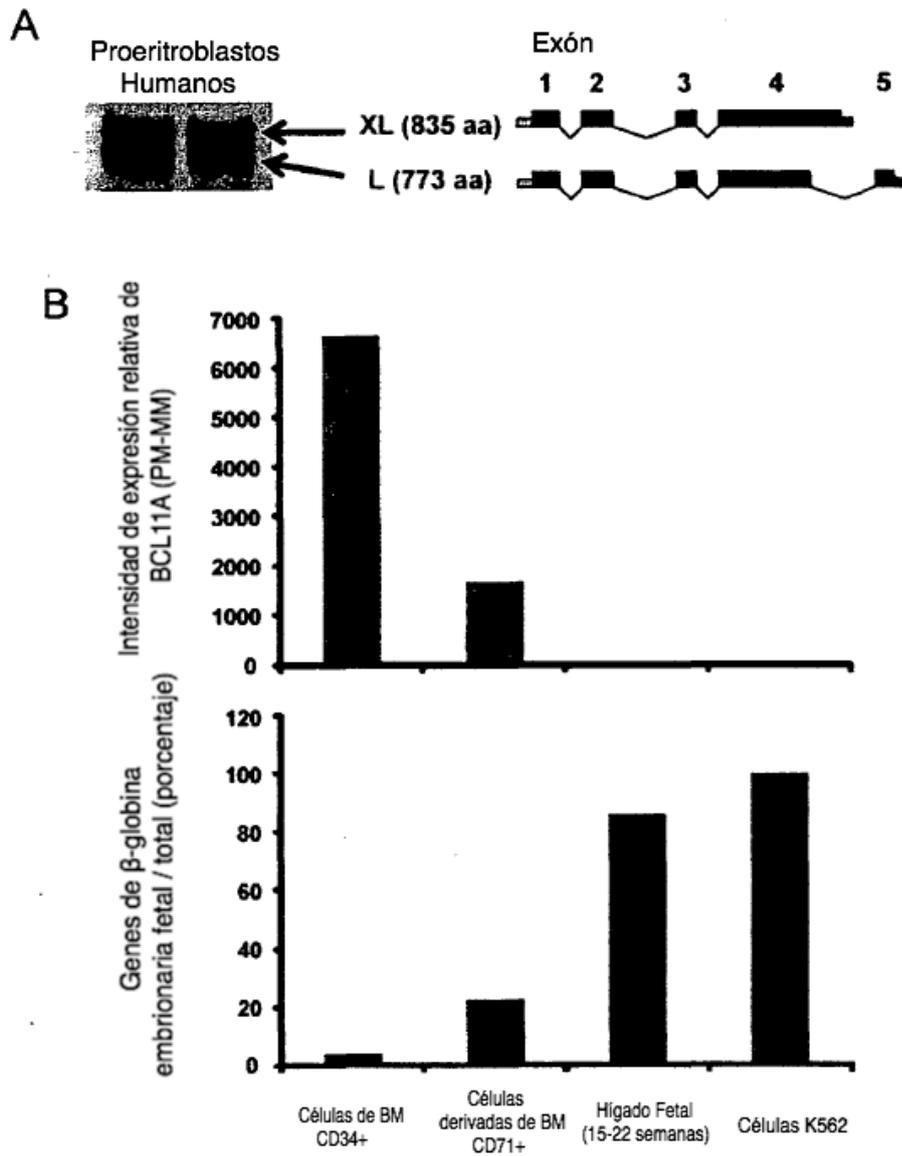
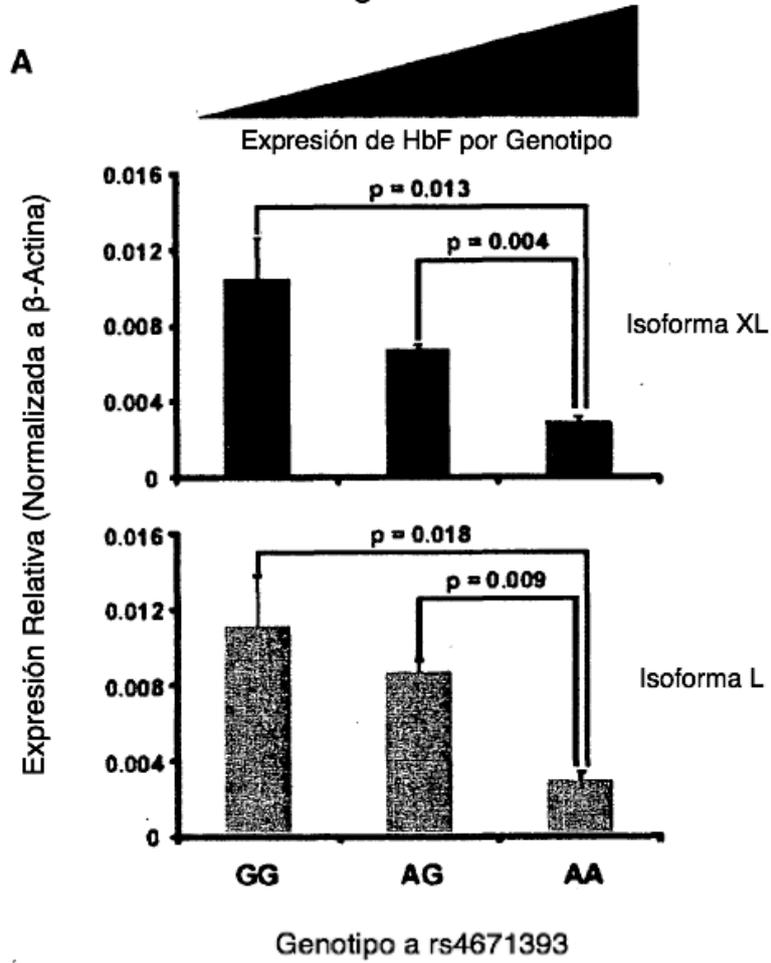


Figura 2



**B**

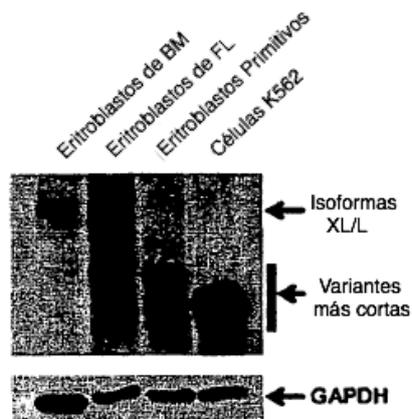
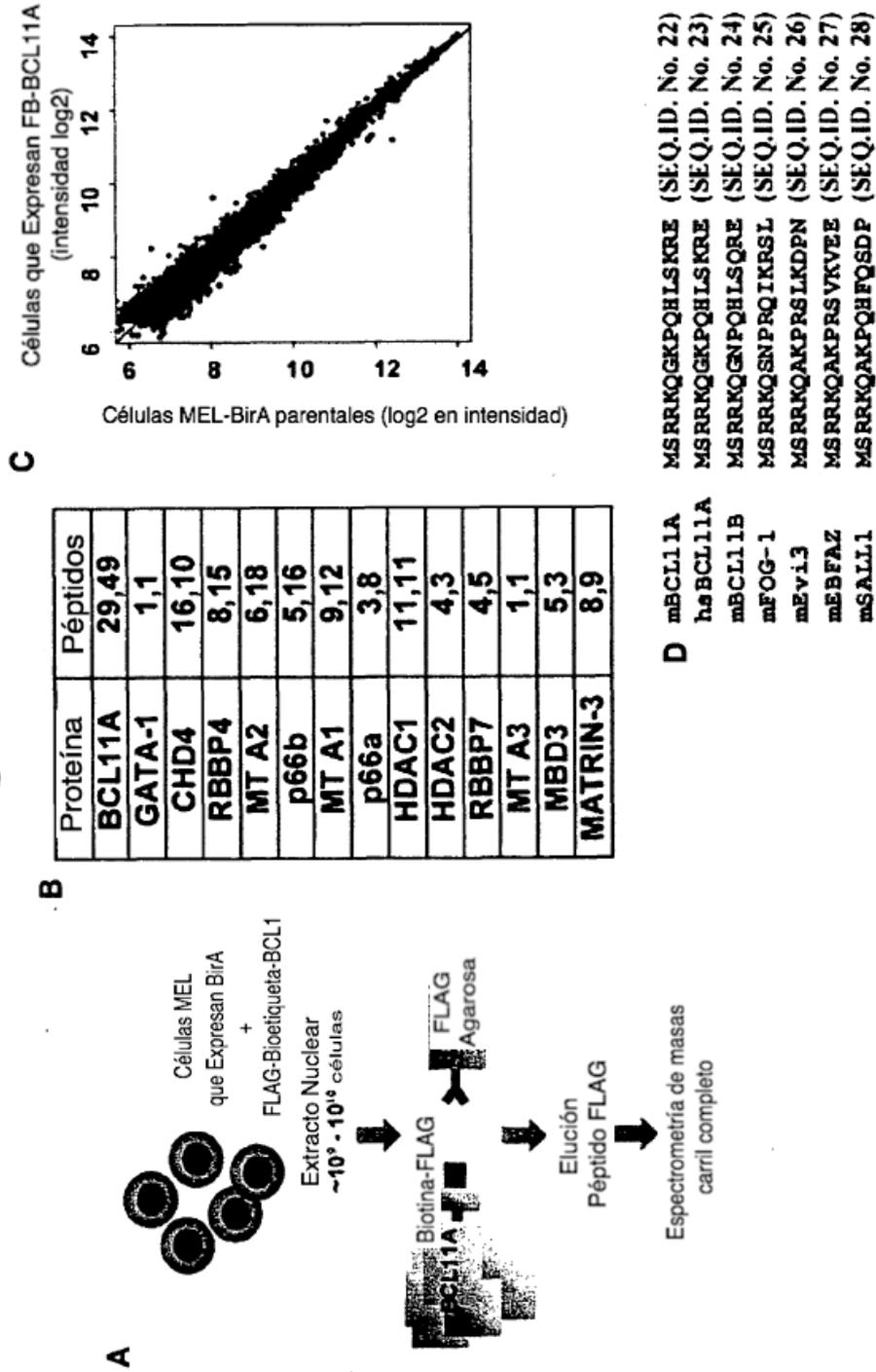


Figura 3



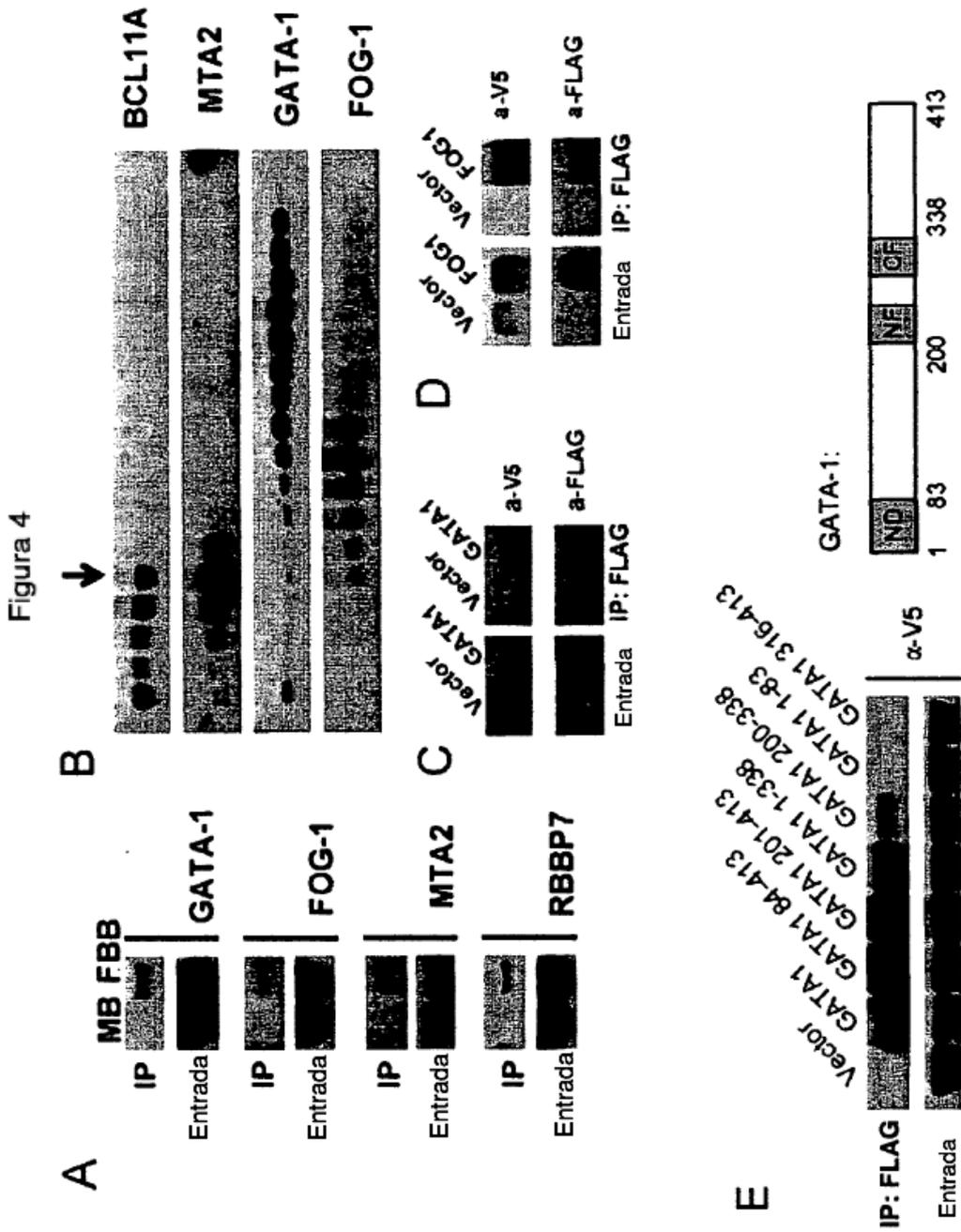


Figura 5

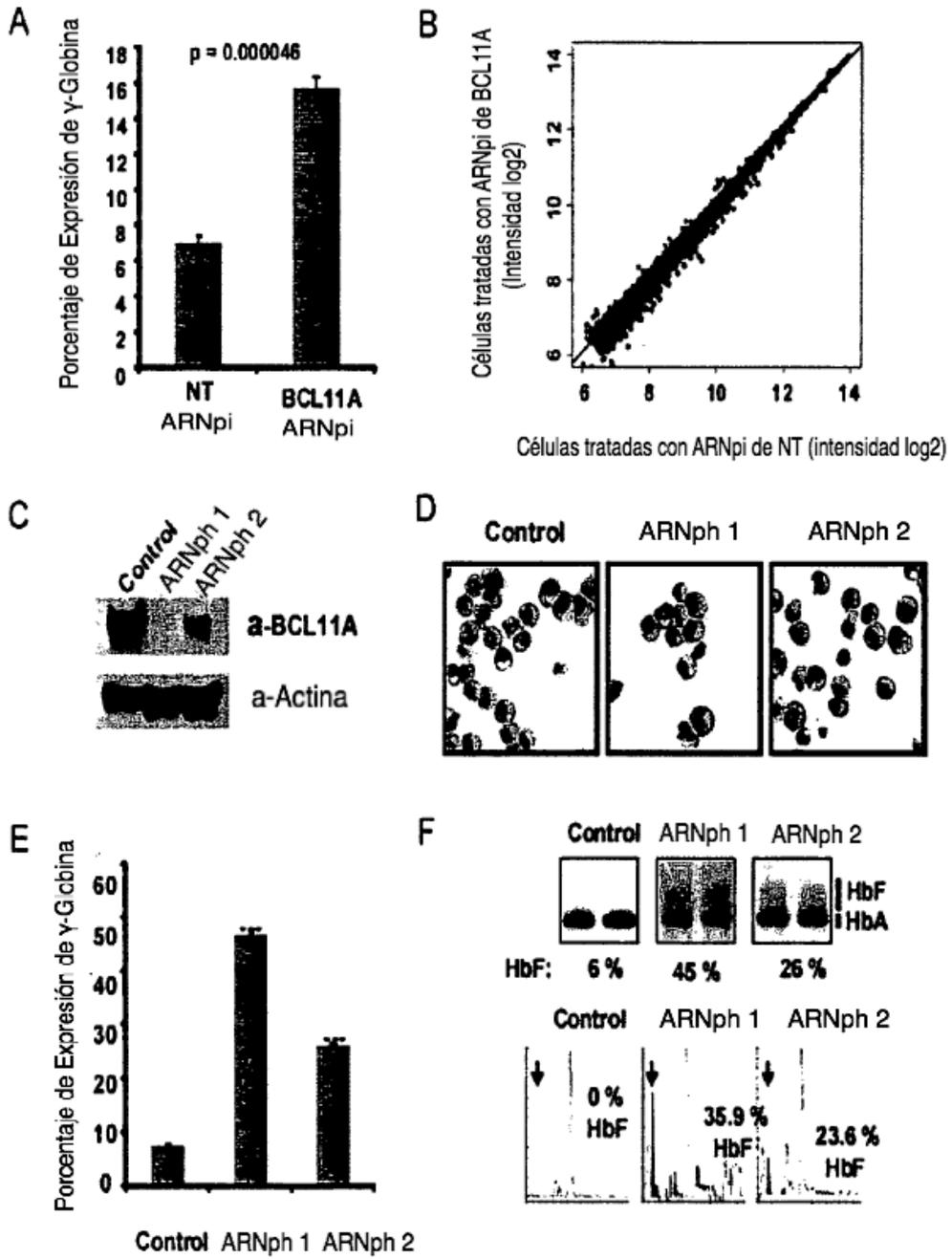


Figura 6

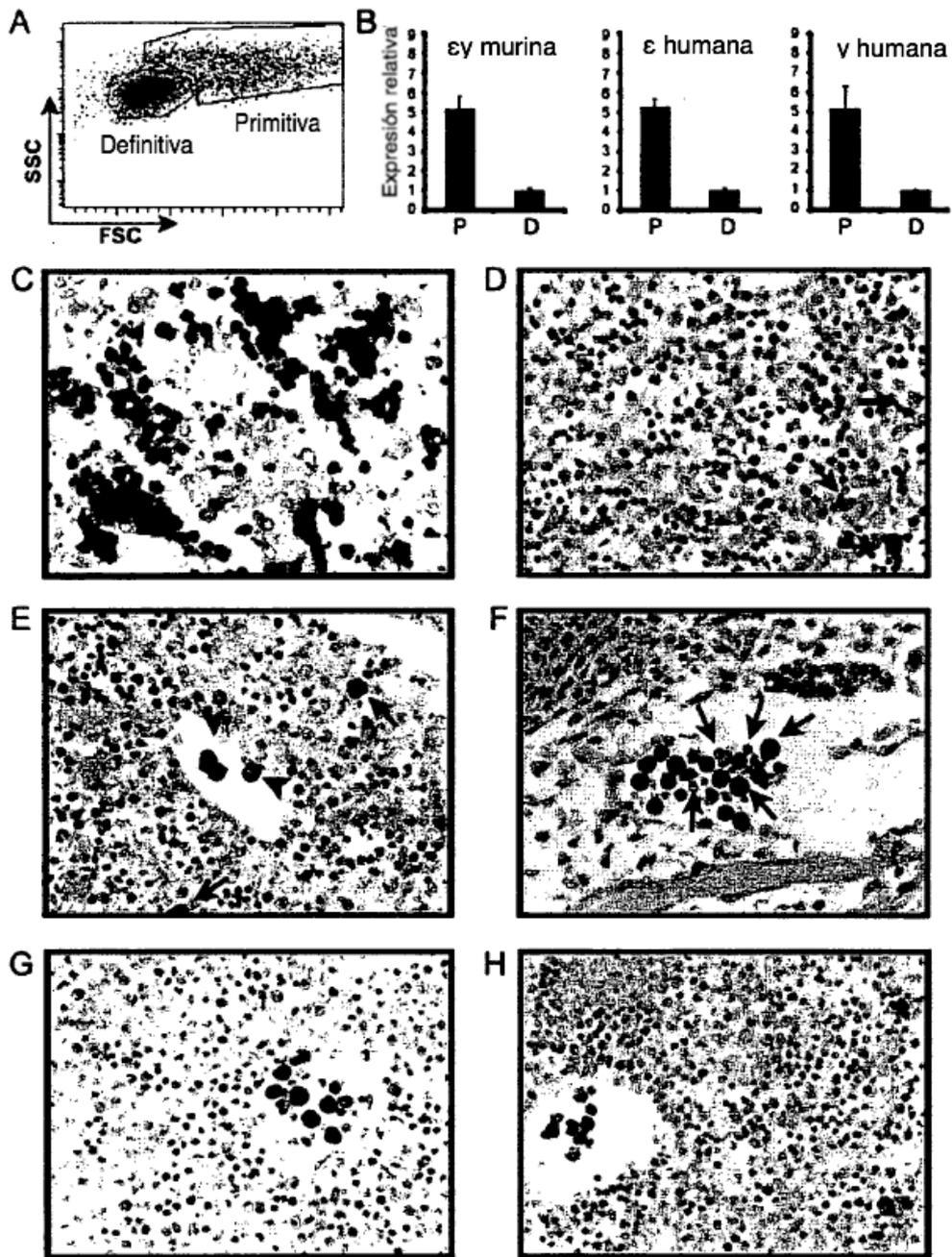


Figura 7

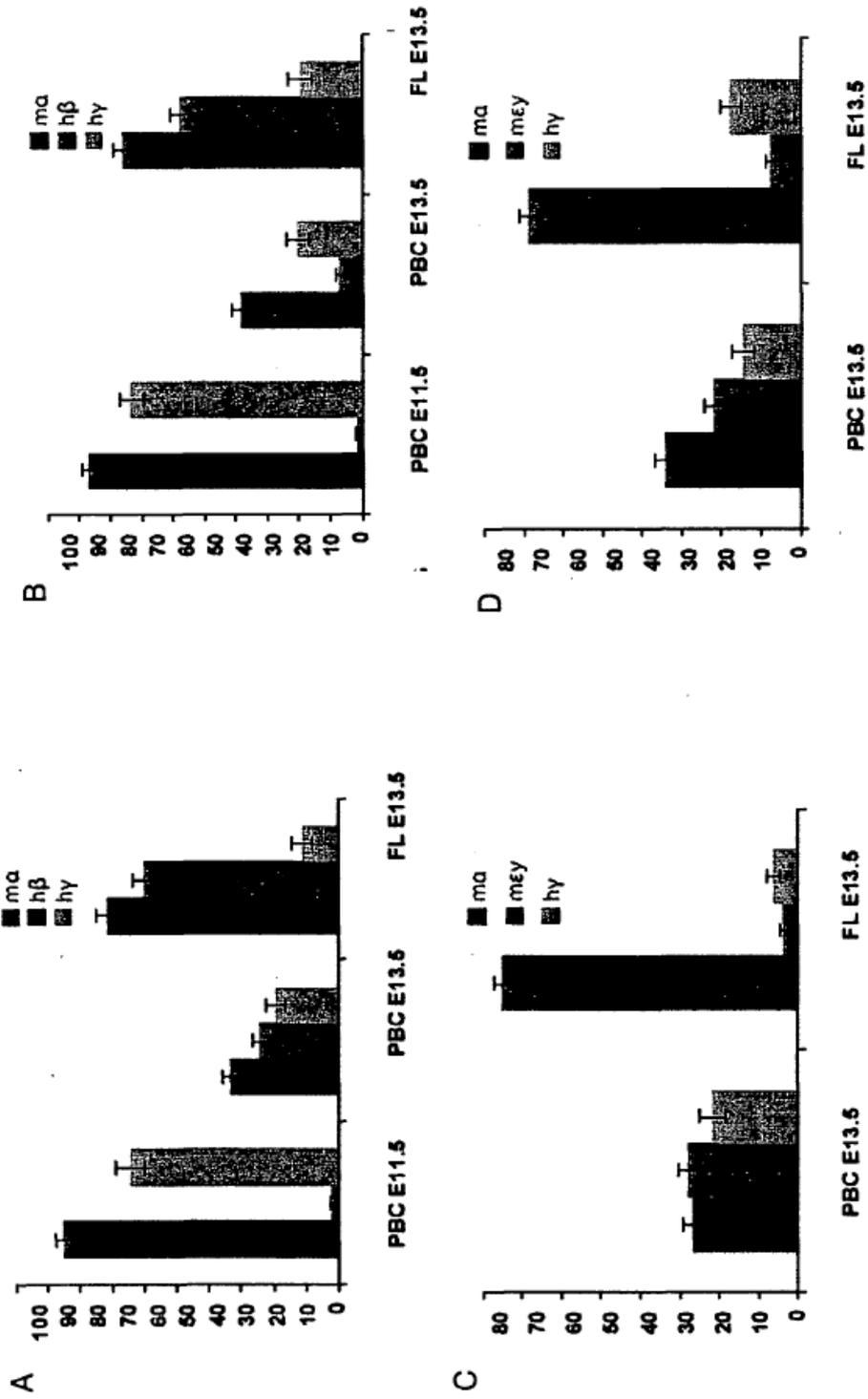
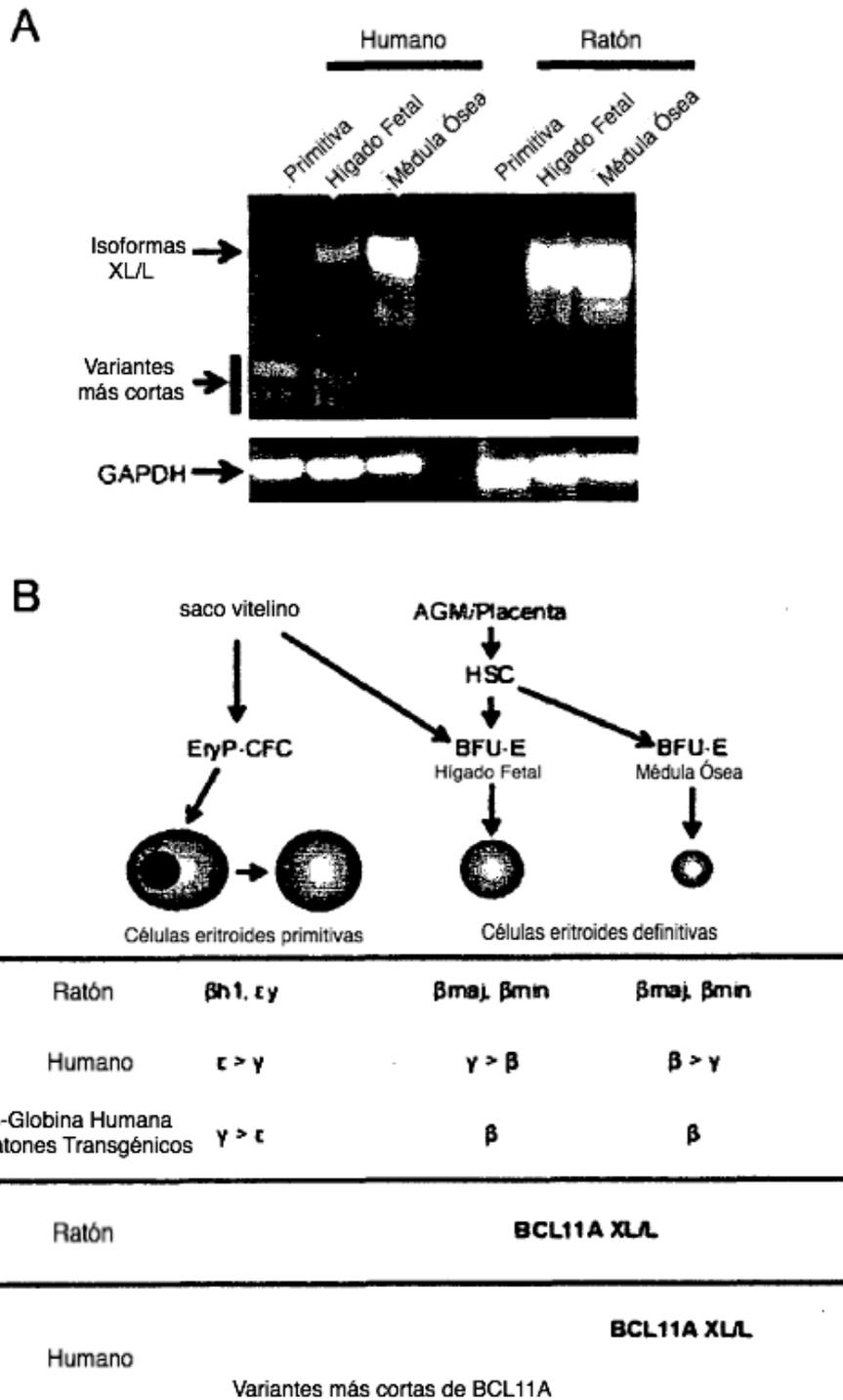


Figura 8



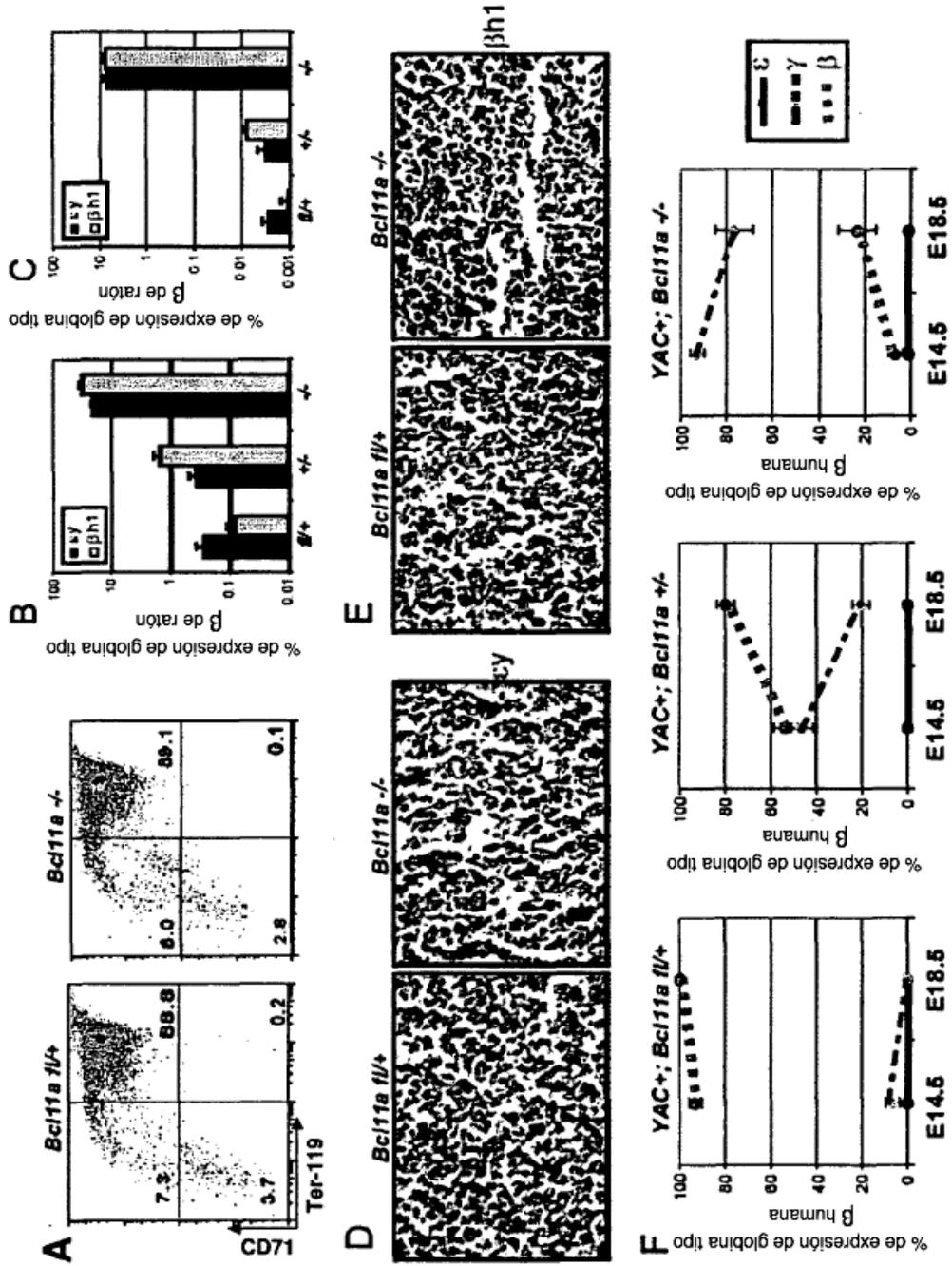


Figura 9

Figura 10

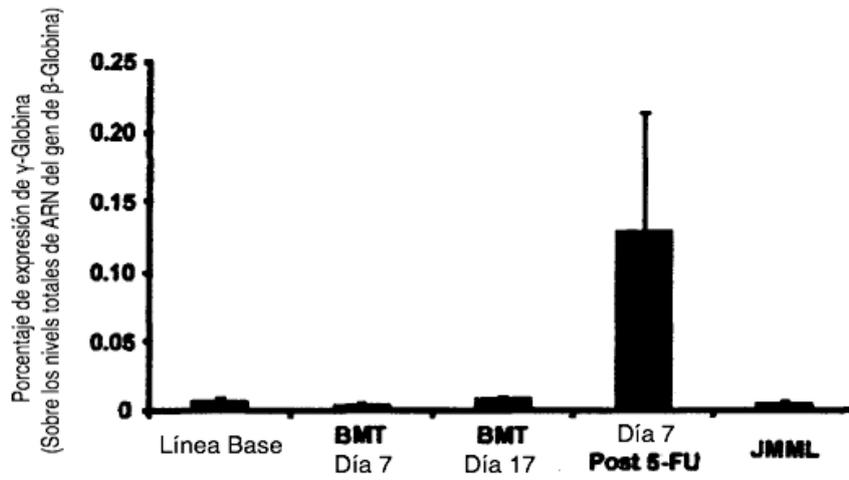


Figura 11

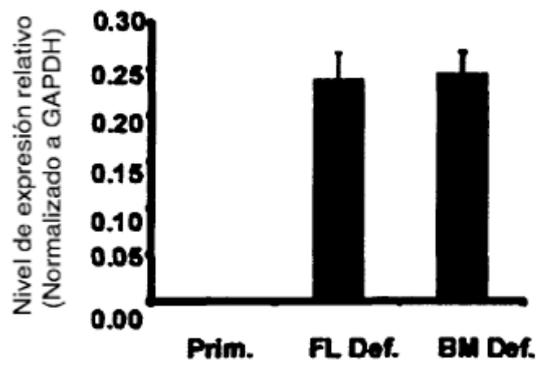


Figura 12

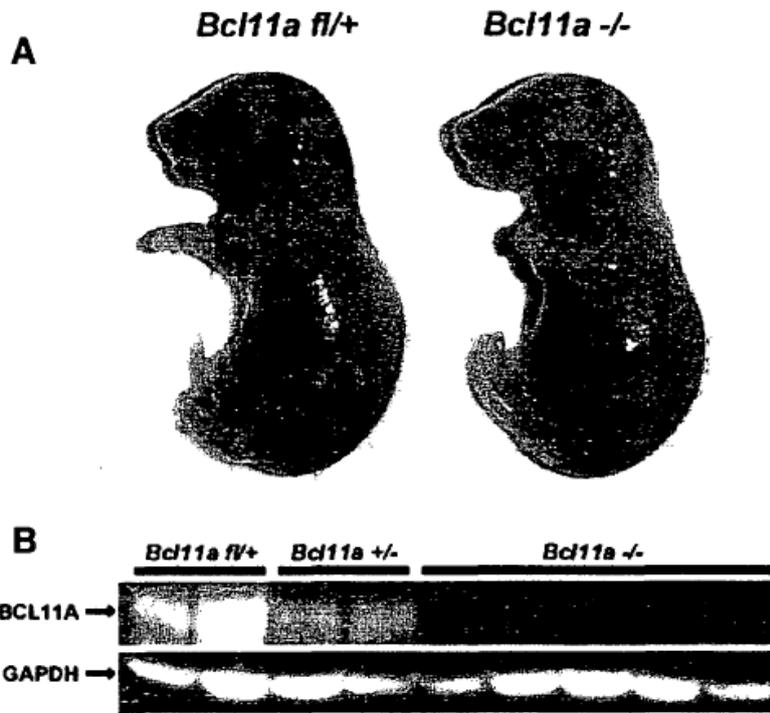


Figura 13

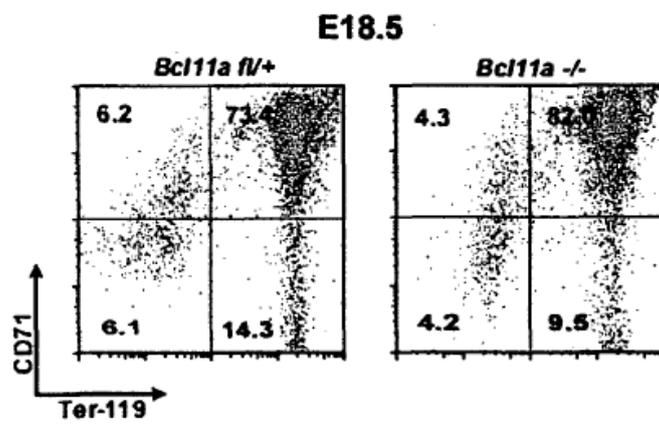


Figura 14

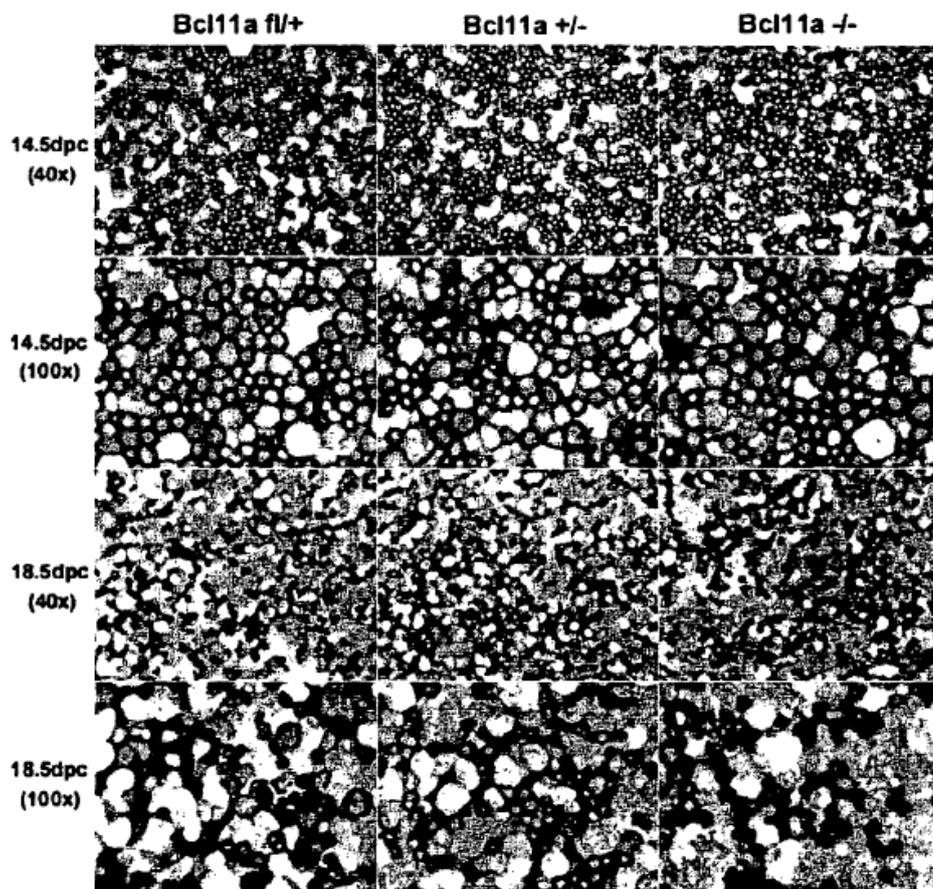


Figura 15

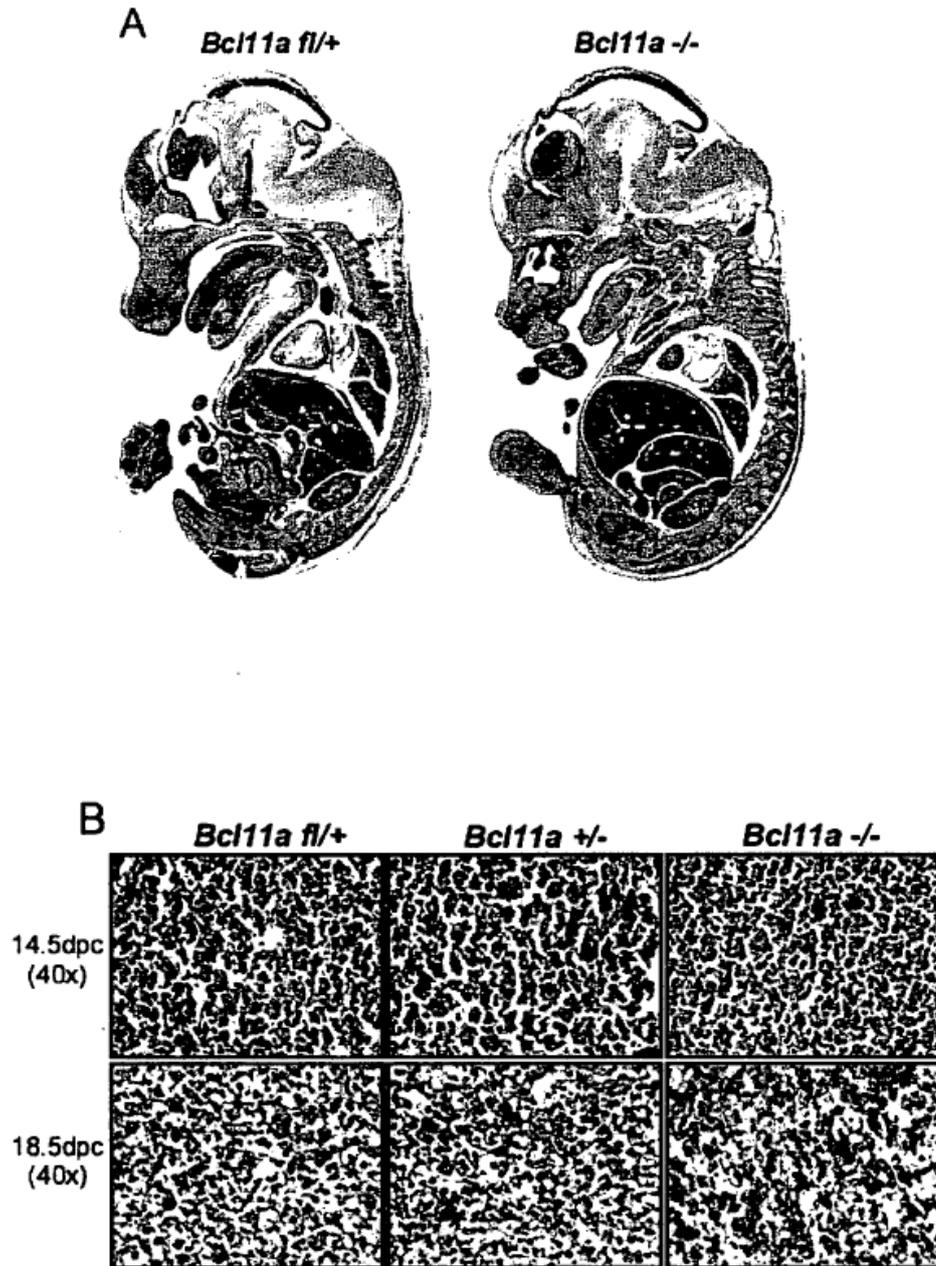


Figura 16

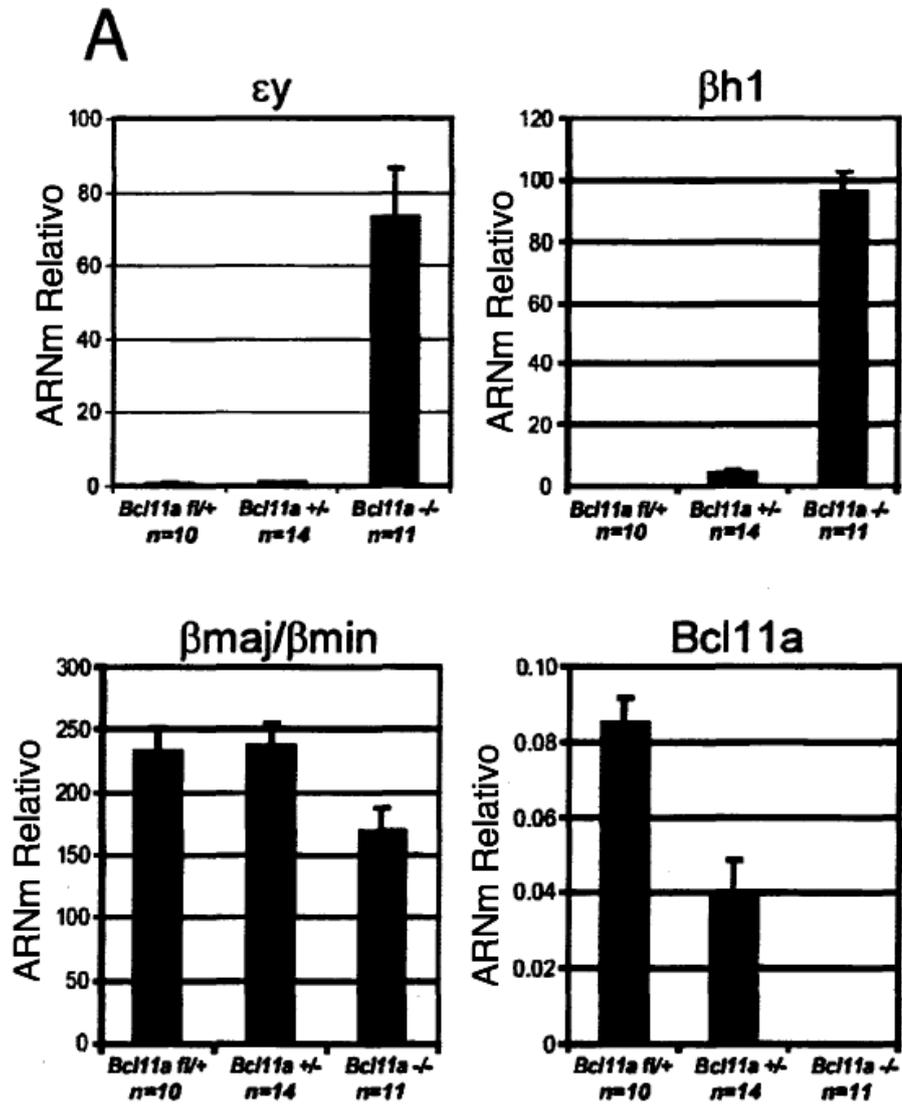


Figura 16 continuación

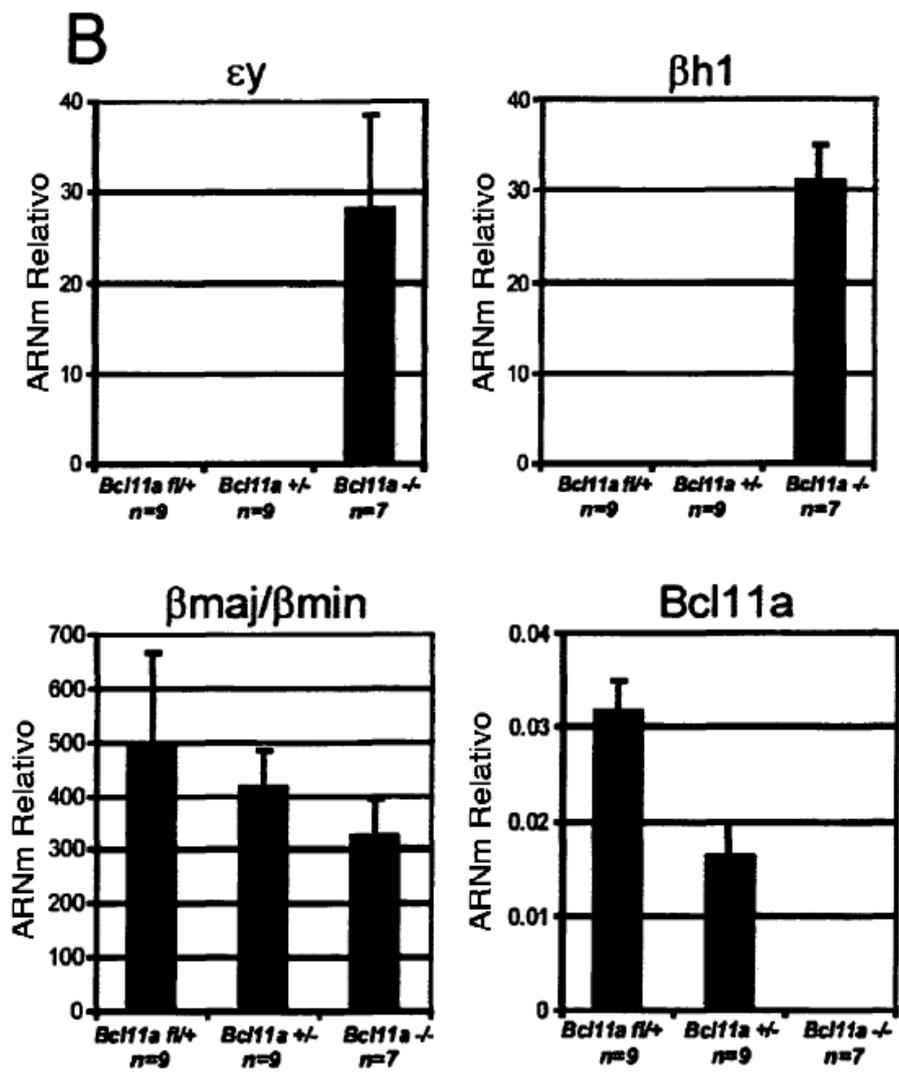


Figura 17

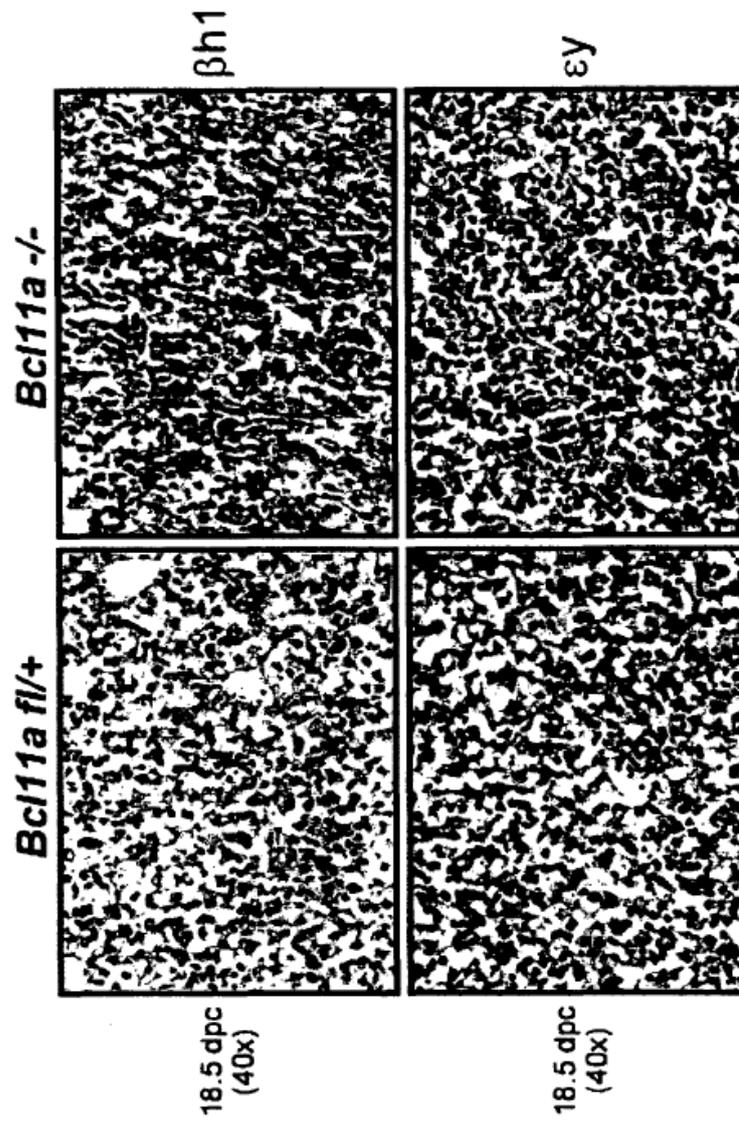


Figura 18

<b>A</b>		<b>E14.5 Hígado Fetal</b>		<b>YAC+; Bcl11a fl/+ (n=4)</b>	<b>YAC+; Bcl11a +/- (n=6)</b>	<b>YAC+; Bcl11a -/- (n=4)</b>
% de expresión de globina tipo $\beta$ humana	$\epsilon$			0.022 $\pm$ 0.011	0.043 $\pm$ 0.026	0.37 $\pm$ 0.14
	$\gamma$			6.75 $\pm$ 2.84	46.39 $\pm$ 5.18	93.33 $\pm$ 2.91
	$\beta$			93.22 $\pm$ 2.83	53.56 $\pm$ 5.17	6.30 $\pm$ 3.03

<b>B</b>		<b>E18.5 Hígado Fetal</b>		<b>YAC+; Bcl11a fl/+ (n=4)</b>	<b>YAC+; Bcl11a +/- (n=7)</b>	<b>YAC+; Bcl11a -/- (n=4)</b>
% de expresión de globina tipo $\beta$ humana	$\epsilon$			0.003 $\pm$ 0.001	0.012 $\pm$ 0.005	0.35 $\pm$ 0.08
	$\gamma$			0.24 $\pm$ 0.05	20.36 $\pm$ 3.84	76.65 $\pm$ 8.35
	$\beta$			99.76 $\pm$ 0.05	79.63 $\pm$ 3.84	23.00 $\pm$ 8.36

Figura 19

