

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 693**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61K 35/28** (2015.01)

**A61K 31/52** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012 PCT/US2012/034586**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12145723**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12774246 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2699247**

54 Título: **Método para el acondicionamiento y quimioselección combinadas en un único ciclo**

30 Prioridad:

**20.04.2011 US 201161477440 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.06.2018**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)  
1111 Franklin Street, 12th Floor  
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**KASAHARA, NORIYUKI;  
SCHIESTL, ROBERT, H.;  
HACKE, KATRIN;  
SZAKMARY, AKOS y  
CROOKS, GAY, M.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 672 693 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

Método para el acondicionamiento y quimioselección combinadas en un único ciclo

5 Declaración relativa a la investigación financiada con fondos federales

La presente invención se llevó a cabo con apoyo gubernamental, subvención nº AI06779, concedida por el National Institutes of Health. El gobierno posee determinados derechos sobre la presente invención.

10 ANTECEDENTES

El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT, por sus siglas en inglés) es el pilar del tratamiento de muchos trastornos hereditarios y neoplasias malignas linfohematopoyéticas (1). Además, las células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) en general representan una diana importante para la terapia génica *ex vivo*. La transferencia génica a HSC proporciona una estrategia potencial para corregir defectos monogénicos y para alterar la sensibilidad a fármacos de médula ósea (MO) normal a fármacos citotóxicos. Estas aplicaciones presentan un potencial terapéutico pero se han visto limitadas por la baja transferencia génica al interior de las HSC. Algunos avances recientes, tales como las citoquinas mejoradas para minimizar el compromiso durante la manipulación *ex vivo*, la transferencia y enriquecimiento génicos asistidos por fibronectina antes de la transferencia génica han mejorado la eficiencia de la transferencia génica al interior de las células humanas y han potenciado los ensayos de terapia génica humana. Sin embargo, la eficiencia de la transferencia génica al interior de las HSC y la injertación de un gran número de células transducidas sigue constituyendo un reto importante para ampliar la aplicación de esta tecnología para el tratamiento con éxito del cáncer y las enfermedades monogénicas.

Con el fin de potenciar la injertación de las HSC con genes modificados y para reducir el tiempo necesario para la reconstitución linfohematopoyética tras el HSCT, se han sometido a ensayo estrategias de selección *in vivo* que utilizan genes de resistencia a fármaco, tales como el de resistencia a dihidrofolato reductasa (DHFR) (3) o el gen 1 de múltiples resistencias farmacológicas (MDR1, por sus siglas en inglés) (4, documento nº US1996/017660), pero en general han fracasado debido a una toxicidad inaceptable (5) o una eficiencia de selección insuficiente (6). Actualmente, se están sometiendo a ensayo formas mutantes de O6-metilguanín-ADN-metiltransferasa (MGMT) para su capacidad de conferir quimioprotección frente a BCNU o temozolomida en combinación con O6-bencilguanina (2,7, documento nº US1997/004917) aunque estos agentes suponen un riesgo considerable de toxicidad y algunas observaciones recientes sugieren que la MGMT mutante podría conferir una desventaja selectiva al expresarse a niveles elevados (8). En el documento nº US2003/032003AA se describe una estrategia de selección para seleccionar células deficientes en HPRT *in vivo* con 6TG. Sin embargo, en dicha solicitud de patente todavía se utiliza irradiación para el preconditionamiento anterior a la selección *in vivo* o se lleva a cabo la selección *in vivo* en ciclos con periodos de recuperación entre administraciones de 6TG.

Además, la dosis de 6TG propuesta es elevada y se administra durante un periodo prolongado de tiempo (200 mg/kg de dosis total durante 55 días). Además, un enfoque para inactivar la expresión de HPRT en la MO y posteriormente seleccionar las células donantes con 6TG *in vivo* ha sido informado por Porter y DiGregori como "resistencia a análogo de purina mediada por ARN interfiriente" (iPAR, por sus siglas en inglés). Dicho informe ha demostrado la viabilidad de la inactivación de HPRT en las HSC con un vector lentivírico que expresa una horquilla pequeña de ARN (ARNhp) con diana en Hprt y el enriquecimiento para dichas células hematopoyéticas alteradas con 6TG en ratones *in vivo*. Sin embargo, en dicho informe, el preconditionamiento todavía se llevaba a cabo mediante irradiación del cuerpo entero y no se iniciaba la quimioselección *in vivo* hasta por lo menos 4 semanas después del trasplante. Además, se administró 6TG en forma de un pulso corto o a dosis seleccionadas para ser sólo moderadamente mielosupresoras y no queda claro si se alcanzaban niveles adecuados de transducción de HSC por los vectores lentivíricos de segunda generación utilizados en su estudio. Globalmente los niveles de injertación informados eran variables y relativamente modestos.

Sigue existiendo una necesidad de métodos más eficaces de HSCT que eviten la toxicidad durante la reconstitución de las células de médula ósea.

55 Referencias:

- (1) Bhattacharya D, Ehrlich LI, Weissman IL. Eur J Immunol. 2008;38:2060-2067.
- (2) Milsom MD, Williams DA. DNA Repair (Amst). 2007;6:1210-1221.
- (3) Williams DA, Hsieh K, DeSilva A, Mulligan RC. J Exp Med. 1987;166:210-218.
- (4) Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, et al. Science. 1992;257:99-103.
- (5) Zaboikin M, Srinivasakumar N, Schuening F. Cancer Gene Ther. 2006;13:335-345.
- (6) Southgate T, Fairbairn LJ. Expert Rev Mol Med. 2004;6:1-24.
- (7) Neff T, Beard BC, Kiem HP. Blood. 2006;107:1751-1760.
- (8) Schambach A, Baum C. DNA Repair (Amst). 2007;6:1187-1196.
- (9) Porter CC, DeGregori J. Blood. 2008;112:4466-4474.

*In vivo* selection of primitive hematopoietic cells (publicación de patente nº WO/1998/019540) US1996/017660  
 Use of mutant alkyltransferases for gene therapy to protect from toxicity of therapeutic alkylating agents (publicación de patente nº WO/1997/035477) US1997/004917

*In vivo* selection (publicación de patente nº WO/1997/043900) US2003032003AA

## DESCRIPCIÓN RESUMIDA

La invención proporciona un análogo de base purina para la utilización en un método de trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) sin radiación, en el que el análogo de base purina es la 6-tioguanina (6TG) y en el que el método comprende:

- (a) administrar en un sujeto mamífero una o dos dosis de entre 2 y 10 mg/kg de peso corporal del análogo de base purina a modo de etapa de preacondicionamiento,
- (b) injertar HSC del donante en el sujeto deficientes en hipoxantina-guanín fosforibosiltransferasa (HPRT) dentro de las 48 a 72 horas posteriores a la etapa de preacondicionamiento, y
- (c) administrar en el sujeto 1 a 5 mg/kg del análogo de base purina cada dos a cuatro días durante dos a ocho semanas después de la etapa de injertación,

en el que el método se lleva a cabo en ausencia de preacondicionamiento mediante radiación.

Por lo tanto, el sujeto no se trata con radiación mieloablativa en preparación para el trasplante y, de esta manera, el sujeto se encuentra libre de toxicidad inducida por radiación mieloablativa.

Entre los ejemplos representativos de un análogo de base purina se incluyen: 6-tioguanina (6TG), 6-mercaptopurina (6-MP) y azatiopurina (AZA). En algunas realizaciones, la dosis total de 6TG administrada en el sujeto no excede de 105 mg/kg; típicamente, la dosis total de 6TG administrada en el sujeto no excede 75 mg/kg. En una realización, la administración de análogo de base purina se lleva a cabo cada 3 días y durante no más de cuatro semanas después de la etapa de injertación.

Los sujetos tratados de acuerdo con el método muestran más de 75% de células hematopoyéticas genéticamente modificadas. En algunas realizaciones, el sujeto muestra más de 95% de células hematopoyéticas genéticamente modificadas. Las HSC deficientes en HPRT que deben trasplantarse pueden convertirse en deficientes en HPRT utilizando métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. Entre los métodos representativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la introducción de secuencias codificantes de nucleasas de dedo de cinc (ZFN, por sus siglas en inglés), nucleasas efectoras de tipo activador transcripcional (TALEN, por sus siglas en inglés), cadenas molde de recombinación homóloga de fragmentos pequeños (SFHR, por sus siglas en inglés), ARN inhibidores (ARNip) o microARN (ARNmi), ARN antisentido, ARN de corte y empalme en trans, ribozimas, anticuerpos intracelular o proteínas inhibitoras dominantes-negativas o competitivas. Las HSC transplantadas pueden ser autólogas, singénicas o alogénicas.

En algunas realizaciones, las HSC deficientes en HPRT que deben trasplantarse han sido modificadas genéticamente. El sujeto puede presentar un trastorno hereditario o genético, una enfermedad adquirida que afecta a las células linfohematopoyéticas, tal como la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o una neoplasia maligna linfohematopoyética. La modificación genética de las HSC del donante puede extenderse más allá de convertir las células en deficientes en HPRT y también servir para tratar o corregir una condición.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1A-1B. Optimización de régimen de acondicionamiento de 6TG. (FIG. 1A) Como estudio para encontrar la dosis, se realizó una inyección i.p. En ratones HPRT-wt de control de vehículo o diferentes dosis de 6TG comprendidas entre 2,5 y 10 mg/kg, tal como se indica, el día 1 (n=3 en cada grupo) o con dos dosis de 10 mg/kg los días 1 y 3 (n=3), respectivamente. El día 4, después de la primera dosis de 6TG, se tiñeron con H-E secciones de hueso fijadas con paraformaldehído y se examinó la histología de la MO. Se muestran fotomicrografías representativas (magnificación: 40x) para cada régimen de acondicionamiento con 6TG. (FIG. 1B) Fotomicrografías representativas que muestran la histología global y detallada de la MO a baja (10x) y alta (100x) magnificación de ratones HPRT-wt tratados con vehículo de control o con un régimen de acondicionamiento optimizado que consistía en dos dosis de 10 mg/kg de 6TG los días 1 y 3. Los análisis histológicos se llevaron a cabo el día 4, tal como anteriormente.

Figura 2A-2B. La falta de mielotoxicidad progresiva tras la inyección de dosis de acondicionamiento de 6TG en ratones deficientes en HPRT y la baja tasa de injertación con acondicionamiento con 6TG únicamente. (FIG. 2A) en ratones HPRT-wt y deficientes en HPRT se inyectó i.p. 6TG 10 mg/kg los días 1 y 3. El día 7, después de la primera dosis de 6TG, se tiñeron con H-E secciones de hueso fijadas con paraformaldehído y se examinó la histología de la MO. Se muestran fotomicrografías representativas (magnificación: 40x). (FIG. 2B) Programa de tratamiento: Ratones HPRT-wt hembra receptores (n=4) recibieron la primera dosis de acondicionamiento de 6TG

(10 mg/kg, i.p.) el día -2 y después recibieron el trasplante de MO de macho deficiente en HPRT seguido de una segunda dosis de acondicionamiento de 6TG (10 mg/kg, i.p.) el día 0. Se analizó la MO el día 7 después de la primera dosis de 6TG. Se muestran secciones de hueso fijadas con paraformaldehído y teñidas con H-E (magnificación: 40x).

Figura 3. Dosis-respuesta y curso temporal de mielotoxicidad por dosis baja crónica de 6TG en ratones HPRT-wt vs. ratones deficientes en HPRT. Se trataron ratones de tipo salvaje para HPRT y deficientes en HPRT cada 3 días con dosis diferentes de 6TG o control de vehículo (n=3 en cada grupo), tal como se muestra en la parte superior de cada panel. Para los ratones tipo salvaje para HPRT, se examinó la histología en los puntos temporales siguientes hasta 60 días después de iniciar el tratamiento:

control de vehículo (día 60), 6TG 0,25 mg/kg (día 60), 6TG 0,5 mg/kg (día 60), 6TG 1,0 mg/kg (día 38), 6TG 2,5 mg/kg (día 28) y 6TG 5,0 mg/kg (día 22). Para los ratones deficientes en HPRT, se examinó la histología el día 60 en todos los animales. Se muestran fotomicrografías representativas de secciones de hueso fijadas con paraformaldehído y teñidas con H-E (magnificación original: 40x).

Figura 4A-4B. Optimización del acondicionamiento con 6TG combinado y estrategia de quimioselección *in vivo*. Programa de tratamiento: Ratones HPRT-wt hembra receptores recibieron la primera dosis de acondicionamiento de 6TG (10 mg/kg, i.p.) el día -2 y después recibieron el trasplante de MO de macho deficiente en HPRT junto con una segunda dosis de acondicionamiento de 6TG (10 mg/kg, i.p.) el día 0. A continuación, se llevó a cabo la quimioselección *in vivo* con inyecciones i.p. Repetidas de 2,5 mg/kg o 5,0 mg/kg de 6TG cada 3 días durante un periodo de 2 semanas (fig. 4A) o 4 semanas (fig. 4B), tal como se indica. Se muestran fotomicrografías representativas de secciones de hueso fijadas con paraformaldehído y teñidas con H-E (magnificación original: 40x).

Figura 5. Reconstitución hematopoyética a largo plazo tras el trasplante de receptores HPRT-wt con MO derivada de donante deficiente en HPRT utilizando una combinación de acondicionamiento de 6TG y quimioselección. Los gráficos de barras muestran el porcentaje de células derivadas de donante en leucocitos de médula ósea (MO) y de sangre periférica (LSP) determinado mediante análisis FISH de cromosoma XY a las 4 semanas (es decir, inmediatamente después del final del periodo de quimioselección) y a los 4, 7 y 12 meses del trasplante, tal como se indica.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención proporciona una nueva estrategia de quimioselección *in vivo* que aprovecha la función esencial de la conversión mediada por hipoxantín-guanín fosforibosiltransferasa (HPRT) de 6-tioguanina (6TG) en nucleótido tioguanina en la mielotoxicidad por 6TG. Debido a que la deficiencia en HPRT de por sí no influye negativamente sobre el desarrollo o función de las células hematopoyéticas, puede eliminarse de las células hematopoyéticas para la utilización en el trasplante. La estrategia de quimioselección *in vivo* implica HSCT realizada con HSC de donante deficiente en HPRT utilizando 6TG tanto para el acondicionamiento mieloablativo de receptores de tipo salvaje para HPRT como para un procedimiento de quimioselección *in vivo* en un solo ciclo de las células donantes. La invención se basa en el desarrollo e identificación de un programa de administración en el que 6TG induce la mieloablación selectiva sin ningún efecto adverso sobre los tejidos extrahematopoyéticos, mientras que las HSC injertadas deficientes en actividad de HPRT son altamente resistentes a los efectos citotóxicos de la 6TG. Con esta estrategia combinada de acondicionamiento de 6TG y quimioselección, puede conseguirse una injertación eficiente y elevada de HSC de donante deficiente en HPRT con una baja toxicidad global. La quimioselección *in vivo* de 6TG permite la reconstitución a largo plazo de médula ósea (MO) inmunofenotípicamente normal mediante la amplificación de la población de HSC pluripotentes autorrenovantes procedentes de MO de donante deficiente para HPRT o injertado.

El método descrito en la presente memoria para el acondicionamiento altamente eficiente y globalmente no tóxico y la quimioselección *in vivo* en un solo ciclo es generalmente aplicable como estrategia para mejorar la eficiencia de injertación de HSCT y el resultado del trasplante y para conferir una ventaja selectiva a células modificadas genéticamente tras la terapia génica *ex vivo*. La estrategia de quimioselección *in vivo* utiliza exclusivamente 6TG u otro análogo de base purina, para tanto el preacondicionamiento como la quimioselección en un solo ciclo de HSC de donante deficiente en HPRT y es capaz de conseguir una injertación altamente eficiente y la reconstitución a largo plazo con sustitución de >95% de la MO del receptor. Dicha estrategia es aplicable a la mejora de la injertación de un gran número de HSC manipuladas *ex vivo* para ampliar la aplicación de la terapia génica en general.

## Definiciones

Todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente solicitud presentan los significados utilizados comúnmente en la técnica, a menos que se indique lo contrario. Tal como se utiliza en la presente solicitud, los términos o expresiones a continuación presentan los significados especificados.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) libres de radiación" se refiere a que el receptor no ha sido sometido a acondicionamiento mieloablativo mediante radiación. Por el contrario,

el acondicionamiento se consigue mediante la administración de 6TG, típicamente administrado durante 48 horas antes (e incluyendo el día) de la injertación con HSC del donante.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, "deficiente en HPRT" incluye tanto células que son naturalmente deficientes en HPRT como las convertidas en deficientes en HPRT mediante modificación genética.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, "HSC de donante" o "células de donante" se refiere a las células que deben injertarse, con independencia de si las HSC se derivan del receptor del trasplante o de otro sujeto. De esta manera, las células recolectadas de un sujeto pueden modificarse e injertarse de vuelta en el mismo sujeto, convirtiéndose en "células de donante". Pueden denominarse en la presente memoria "células de donante", "células injertadas" o "células trasplantadas".

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, "un" o "una" se refiere a por lo menos una, a menos que se indique claramente lo contrario.

#### Acondicionamiento y quimioselección combinados para el trasplante hematopoyético

20 La invención proporciona un análogo de base purina para la utilización en un método de trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) sin radiación, en el que el análogo de base purina es la 6-tioguanina (6TG) y en el que el método comprende:

- (a) administrar en un sujeto mamífero una o dos dosis de entre 2 y 10 mg/kg de peso corporal del análogo de base purina a modo de etapa de preacondicionamiento,
- (b) injertar HSC del donante en el sujeto deficientes en hipoxantina-guanín fosforibosiltransferasa (HPRT) dentro de las 48 a 72 horas posteriores a la etapa de preacondicionamiento, y
- (c) administrar en el sujeto 1 a 5 mg/kg del análogo de base purina cada dos a cuatro días durante dos a ocho semanas después de la etapa de injertación,

30 en el que el método se lleva a cabo en ausencia de preacondicionamiento mediante radiación.

35 Por lo tanto, el sujeto no se trata con radiación mieloablativa en preparación para el trasplante y, de esta manera, el sujeto se encuentra libre de toxicidad inducida por radiación mieloablativa. El método se encuentra contemplado para la utilización con una diversidad de sujetos, incluyendo sujetos que nunca han recibido tratamiento de radiación de ningún tipo, sujetos que nunca han recibido tratamiento de radiación mieloablativa y sujetos que han recibido tratamiento mieloablativo en el pasado, aunque no dentro de un marcado temporal y/o a una dosis que sería un preacondicionamiento para el método descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el sujeto típicamente no habría recibido radiación mieloablativa dentro de las 2 semanas o incluso dentro de las 8 semanas anteriores al método de acondicionamiento y quimioselección combinados que se describe en la presente memoria.

40 Entre los ejemplos representativos de un análogo de base purina se incluyen: 6-tioguanina (6TG), 6-mercaptopurina (6-MP) y azatiopurina (AZA). En algunas realizaciones, la dosis total de 6TG administrada en el sujeto no excede de 105 mg/kg; típicamente, la dosis total de 6TG administrada en el sujeto no excede 75 mg/kg. En una realización, la administración de análogo de base purina se lleva a cabo cada 3 días y durante no más de cuatro semanas después de la etapa de injertación.

45 Se da a conocer además en la presente memoria un método en el que se utiliza una alternativa a 6TG como análogo de base purina, conocido a partir de Internet (por ejemplo, rxlist.com) y se encuentran disponibles otros recursos para guiar al experto clínico en la identificación de una dosis adecuada para la utilización en el método de la invención. Por ejemplo, la dosis oral habitual para la quimioterapia con el agente único 6TG en pacientes pediátricos y adultos es de 2 mg/kg de peso corporal al día; en caso de no observar respuesta al tratamiento tras 4 semanas, la dosis puede incrementarse a 3 mg/kg. Pueden administrarse hasta 35 mg/kg en una única dosis oral y observar mielosupresión reversible.

55 Para la leucemia linfática aguda, la dosis inicial habitual para pacientes pediátricos y adultos es de 2,5 mg de 6-MP/kg de peso corporal al día (100 a 200 mg en el adulto medio y 50 mg en un niño de 5 años promedio). Los pacientes pediátricos con leucemia aguda toleran dicha dosis sin dificultad en la mayoría de casos; puede continuarse diariamente durante varias semanas o más en algunos pacientes. En el caso de que, tras 4 semanas de administración, no se observe mejora clínica ni evidencia definitiva de depresión leucocitaria o plaquetaria, puede incrementarse la dosis hasta 5 mg/kg diarios. Una dosis de 2,5 mg/kg/día puede resultar en una rápida caída del recuento leucocitario en 1 a 2 semanas en algunos datos con leucemia linfática aguda y recuentos leucocitarios totales altos. Tras alcanzar una remisión hematológica completa, se considera esencial la terapia de mantenimiento. Las dosis de mantenimiento varían de paciente a paciente. La dosis de mantenimiento diario habitual de 6-MP es de entre 1,5 y 2,5 mg/kg/día como dosis única.

65 La dosis de 6-TG y 6-MP es bastante comparable, mientras que la dosis de AZA resulta más difícil de comparar debido a que en primer lugar necesita bioactivarse a 6-MP y habitualmente no se utiliza para tratar la leucemia. Para los

pacientes que han recibido un trasplante de un órgano sólido, la dosis de AZA necesaria para evitar el rechazo y minimizar la toxicidad varía entre pacientes, exigiendo una gestión cuidadosa. La dosis inicial habitualmente es de entre 3 y 5 mg/kg diarios, iniciándose en el momento del trasplante. Habitualmente se administra AZA como una única dosis diaria en el día del trasplante, y en una pequeña proporción de casos, 1 a 3 días antes del trasplante. La reducción de la dosis hasta niveles de mantenimiento, de entre 1 y 3 mg/kg diarios, habitualmente resulta posible. La dosis de AZA no debería incrementarse hasta niveles tóxicos debido a una amenaza de rechazo.

Las HSC de donantes deficientes en HPRT pueden ser naturalmente deficientes en HPRT o convertirse en deficientes en HPRT mediante modificación genética. En el presente contexto, "HSC del donante" se refiere a las células que deben injertarse, con independencia de si las HSC se derivan del receptor del trasplante o de otro sujeto. Las HSC trasplantadas pueden ser autólogas, singénicas o alogénicas.

La modificación genética puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de entre una diversidad de medios conocidos por el experto en la materia. Entre los ejemplos de medios adecuados de modificación genética se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la introducción de secuencias codificantes de nucleasas de dedo de cinc (ZFN, por sus siglas en inglés), nucleasas efectoras de tipo activador transcripcional (TALEN, por sus siglas en inglés), cadenas molde de recombinación homóloga de fragmentos pequeños (SFHR, por sus siglas en inglés), ARN inhibidores (ARNip) o microARN (ARNmi), ARN antisentido, ARN de corte y empalme en trans, ribozimas, anticuerpos intracelular o proteínas inhibitoras dominantes-negativas o competitivas. La modificación puede utilizarse directamente con las HSC de donante o con los progenitores. Dichas tecnologías pueden utilizarse para la modificación genética de una diversidad de tipos celulares, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas directamente, así como otros tipos de células madre adultas o embrionarias o células madre pluripotentes inducidas que pueden diferenciarse o trans-diferenciarse en células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas.

En algunas realizaciones, las HSC deficientes en HPRT que deben trasplantarse han sido modificadas genéticamente para adaptarse a un objetivo terapéutico particular. Por ejemplo, las HSC de donante pueden modificarse para corregir un defecto genético hereditario, para alterar la sensibilidad farmacológica de la médula ósea normal a los fármacos citotóxicos, para conferir resistencia a microorganismos infecciosos que afectan a las células linfhematopoyéticas, para sustituir o reiniciar el sistema inmunológico endógeno o para combatir neoplasias malignas linfhematopoyéticas mediante la sustitución de la médula ósea endógena y la inducción de una reacción de injerto contra leucemia/linfoma.

Más específicamente, entre los defectos genéticos hereditarios puede incluirse, aunque sin limitarse a ellos, trastornos de la hematopoyesis, incluyendo hemoglobinopatías, tales como la anemia de las células falciformes, la talasemia, la esferocitosis hereditaria, la deficiencia en G6PD, etc., trastornos de la función inmunológica o antimicrobiana, tales como la inmunodeficiencia combinada severa (ICS), la enfermedad granulomatosa crónica (EGC), trastornos de la trombopoyesis que conducen a defectos de la coagulación, tales como el síndrome de Wiscott-Aldrich (SWA), así como otros trastornos estructurales o metabólicos genéticos que pueden mejorarse mediante la ingeniería genética de las células hematopoyéticas que viajan a los sitios de daño tisular, tales como diversas formas de epidermolisis bullosa (EB) y la mucopolisacaridosis.

Entre las enfermedades en las que la modificación de la sensibilidad farmacológica de la médula ósea a los fármacos quimioterápicos resultaría ventajosa se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, enfermedades malignas que se tratan con agentes quimioterápicos la dosis tolerada máxima de los cuales está limitada por mielotoxicidad. Entre ellas se incluyen el cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de piel, sarcomas y glioma.

Entre las enfermedades en las que se utiliza el trasplante de médula ósea o de células madre hematopoyéticas para sustituir o reiniciar el sistema inmunológico endógeno se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, la enfermedad intestinal inflamatoria, el escleroderma y el lupus eritematoso.

Entre las enfermedades en las que conferir resistencia a microorganismos infecciosos resultaría ventajoso se incluye, aunque sin limitarse a ellas, la infección por el VIH y el SIDA, la infección por el VLCT y la infección por el parvovirus B19.

Entre las enfermedades malignas o premalignas de la linfhematopoyesis que son tratadas mediante el trasplante de médula ósea o de células madre hematopoyéticas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la leucemia mielógena aguda, la leucemia linfocítica aguda, el linfoma y los síndromes mielodisplásicos.

Otro ejemplo de la aplicación terapéutica de dicha tecnología sería mejorar el resultado del trasplante de médula ósea o de células madre hematopoyéticas tras la lesión adquirida de la linfhematopoyesis endógena causada por daños de radiación y quimioterápicos.

Una aplicación no terapéutica pero comercialmente útil de dicha tecnología resultaría útil para generar modelos animales humanizados, en los que su linfhematopoyesis endógena resulta sustituida prácticamente por completo por

células de un donante humano. Tras generarla, dichos animales podrían utilizarse, por ejemplo, para someter a ensayo la mielotoxicidad de nuevos fármacos que se consideren para la aplicación a enfermedades humanas. Lo anterior resulta ventajoso debido a que la sensibilidad de la hematopoyesis a diversos fármacos puede ser diferente según la especie de animal; por lo tanto, resulta más deseable someter a ensayo dichos fármacos en un modelo animal humanizado.

Típicamente, el sujeto es un mamífero. El sujeto mamífero puede ser murino, canino, felino, bovino, equino, ovino, primate o ser humano. En una realización, el sujeto es un ser humano.

#### Administración y dosis

Las composiciones se administran de cualquier manera adecuada, con frecuencia con portadores farmacéuticamente aceptables. Se encuentran disponibles métodos adecuados de administración de tratamiento en el contexto de la presente invención en un sujeto y, aunque puede utilizarse más de una vía para administrar una composición particular, una vía particular con frecuencia puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía. La dosis administrada en el paciente, en el contexto de la presente invención, debería resultar suficiente para producir una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo o inhibir el avance de la enfermedad. De esta manera, la composición se administra en un sujeto en una cantidad suficiente para inducir una respuesta eficaz y/o para aliviar, reducir, curar o por lo menos detener parcialmente los síntomas y/o complicaciones de la enfermedad. Una cantidad adecuada para conseguir lo anterior se define como "una dosis terapéuticamente eficaz".

Las vías y la frecuencia de la administración de las composiciones terapéuticas dadas a conocer en la presente memoria, así como las dosis, variarán entre individuos, así como según el fármaco seleccionado, y podrán establecerse fácilmente utilizando técnicas estándares. En general, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, intracutánea, intratumoral, intramuscular, intravenosa o subcutánea), intranasal (por ejemplo mediante aspirado) u oral. Pueden resultar apropiados protocolos alternativos para algunos pacientes.

Tal como entenderá el experto en la materia, pueden convertirse las dosis de mg/kg de peso corporal a mg/superficie corporal, siendo ésta última adecuada para la utilización con sujetos mamíferos de mayor tamaño, incluyendo en el ser humano. Se conocen de la técnica y podrán obtenerse fácilmente en Internet, calculadores para el escalado alométrico. Generalmente, el escalado alométrico utiliza un exponente de entre 0,75 y 0,80. Para más información ver West y Brown, J. Exp. Bio. 208:1575-1592, 2005. Además, la Food and Drug Administration estadounidense ha publicado la obra "Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers", que se encuentra disponible en: Office of Training and Communications Division of Drug Information, HFD-240 Center for Drug Evaluation and Research Food and Drug Administration 5600 Fishers Lane Rockville, MD 20857.

Por ejemplo, 5 mg/kg de 6TG corresponde a una dosis de 15,08 mg/m<sup>2</sup> para un ratón de 20 g. Lo anterior equivale a 0,4 mg/kg para un ser humano de 65 kg. La absorción tras la administración oral de 6TG se estima en 30%; por lo tanto, dicha dosis i.p. en ratones corresponde a una dosis absorbida tras la administración oral de aproximadamente 1,3 mg/kg en el ser humano. Por ejemplo, la dosis oral convencional para la quimioterapia con el agente único 6TG en pacientes pediátricos y adultos es de 2 mg/kg de peso corporal al día; en caso de no observar respuesta al tratamiento tras 4 semanas, la dosis puede incrementarse a 3 mg/kg.

La invención proporciona la ventaja inesperada de evitar la toxicidad tras una irradiación excesiva del sujeto o una dosis excesiva de 6TG. Inesperadamente, el acondicionamiento eficaz y la reconstitución de la médula ósea puede conseguirse utilizando menos de 105 mg/kg de dosis total de 6TG durante el curso del tratamiento y durante un curso temporal de dos a ocho semanas. Se ha observado una injertación eficaz con dosis totales de 6TG inferiores a 65 mg/kg y en tan solo dos semanas. Además, el método permite la opción de monitorizar la toxicidad en un sujeto individuo y ajustar la dosis para optimizar una injertación eficaz con una toxicidad mínima para cada sujeto. En algunas realizaciones, en el sujeto se administra 1 o 2,5 mg/kg de peso corporal de 6TG durante los tratamientos post-injertación.

Los sujetos tratados de acuerdo con el método muestran más de 75% de células hematopoyéticas genéticamente modificadas. En algunas realizaciones, el sujeto muestra más de 95% de células hematopoyéticas genéticamente modificadas. La injertación con éxito puede confirmarse en un sujeto mediante el muestreo de la sangre periférica o la médula ósea a diversos intervalos tras el trasplante y la quimioselección. Las células mononucleares de sangre periférica pueden examinarse mediante la monitorización de los niveles de disrupción e inactivación del gen HPRT o la reducción de la actividad funcional utilizando diversas técnicas estándares que generalmente resultan familiares para el experto ordinario en la materia, incluyendo, aunque sin limitarse a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real cuantitativo (Q-PCR), ensayo de nucleasa SURVEYOR (también denominado "ensayo Cel-I"), análisis de transferencia southern, análisis de transferencia western/inmunotransferencia, inmunohistoquímica o inmunocitoquímica, análisis de citometría de flujo con tinción intracelular, análisis de actividad del enzima HPRT, HPLC, espectrometría de masas y similares.

**EJEMPLO**

El ejemplo a continuación se presenta a fin de ilustrar la presente invención y para ayudar al experto ordinario en la producción y utilización de la misma. Los ejemplos no están destinados en modo alguno a limitar de otro modo el alcance de la invención.

Ejemplo 1: preacondicionamiento y quimioselección *in vivo* combinados con 6-tioguanina sola consigue una reconstitución altamente eficiente de hematopoyesis normal con una médula ósea deficiente en HPRT

Los análogos de purina tales como 6-tioguanina (6TG) provoca mielotoxicidad con la conversión en nucleótidos por la hipoxantín-guanín fosforibosiltransferasa (HPRT). El presente ejemplo muestra el desarrollo de una nueva y altamente eficiente estrategia que utiliza 6TG como agente único para tanto el acondicionamiento como la quimioselección *in vivo* de HSC deficientes de HPRT. La respuesta a dosis y curso temporal de la mielotoxicidad de 6TG se compararon en primer lugar en ratones de HPRT de tipo salvaje y ratones transgénicos deficientes en HPRT. La dosis y parámetros del programa de administración se optimizaron para utilizar 6TG para el acondicionamiento mielosupresor, inmediatamente seguido de la quimioselección *in vivo* de médula ósea (MO) de donante transgénico deficiente en HPRT trasplantada en receptores singénicos de HPRT de tipo salvaje.

A dosis apropiadas, la mielotoxicidad selectiva inducida por 6TG sin ningún efecto adverso sobre los tejidos extrahematopoyéticos en ratones de tipo salvaje para HPRT, mientras que las HSC deficientes en actividad de HPRT eran altamente resistentes a sus efectos citotóxicos. El acondicionamiento de 6TG y quimioselección post-trasplante combinados consistentemente alcanzó una injertación de 95% de la MO de donante deficiente en HPRT con una toxicidad global baja. La reconstitución a largo plazo de la MO inmunofenotípicamente normal se consiguió en receptores tanto primarios como secundarios. Estos resultados proporcionan la prueba de concepto de que el agente único 6TG puede utilizarse tanto para el acondicionamiento mielosupresor sin requerir la irradiación como para la quimioselección *in vivo* de células donantes deficientes en HPRT. Los resultados muestran que mediante la aplicación de los efectos mielosupresores de 6TG tanto antes (a modo de acondicionamiento) y después del trasplante (a modo de quimioselección), puede conseguirse una injertación altamente eficiente de las células madre hematopoyéticas deficientes en HPRT.

La eficacia clínica de la terapia génica *ex vivo* utilizando células madre hematopoyéticas sigue siendo dependiente de proporcionar una ventaja selectiva a las células trasplantadas [1, 2]. Con el fin de potenciar la injertación y reducir el tiempo necesario para la reconstitución linfohematopoyética, se han sometido a ensayo estrategias de selección *in vivo* que utilizan genes de resistencia a fármaco, tales como la dihidrofolato reductasa (*DHFR*) [3] o el gen 1 de resistencia a múltiples fármacos (*MDR1*) [4, 5], pero generalmente han fracasado debido a toxicidad inaceptable [6] o a una eficiencia de selección insuficiente [7]. Actualmente, se están sometiendo a ensayo formas mutantes de O<sup>6</sup>-metilguanín-ADN metiltransferasa (*MGMT*) para su capacidad de conferir quimioprotección frente a BCNU o temozolomida en combinación con O<sup>6</sup>-bencilguanina [8, 9] aunque estos agentes suponen un riesgo considerable de toxicidad y algunas observaciones recientes sugieren que la *MGMT* mutante podría conferir una desventaja selectiva al expresarse a niveles elevados [10].

Notablemente, dichos enfoques generalmente se han basado en el trasplante de progenitores hematopoyéticos que sobreexpresan un gen de resistencia farmacológica exógeno en receptores preacondicionados con irradiación mieloablativa; sin embargo, la quimiorresistencia también puede ser proporcionada por niveles reducidos de enzimas endógenos que normalmente resultan esenciales para la activación de los fármacos citotóxicos. En el presente contexto, los presentes inventores anteriormente observaron que los niveles elevados del enzima de la ruta de rescate de nucleótidos purina, la hipoxantín-guanín fosforibosiltransferasa (HPRT), causa una sensibilidad incrementada al análogo de purina 6-tioguanina (6TG) [11]. La primera etapa de conversión metabólica de 6TG está catalizada por la HPRT [12], que media en la adición de ribosa 5-fosfato para generar tioguanosina monofosfato (TGMP). De esta manera, la citotoxicidad de 6TG esencialmente se basa en la conversión mediada por HPRT en tio-dGTP, que después se incorporan en el ADN induciendo una reparación inútil de no apareamientos y la consiguiente apoptosis.

Para conferir mieloprotección mediante una actividad reducida, el enzima activador de fármaco endógeno normalmente debería expresarse a nivel elevado en los progenitores hematopoyéticos pero no resultar esencial para la hematopoyesis normal. De hecho, los progenitores hematopoyéticos normalmente expresan niveles elevados de HPRT [13-16], convirtiéndolos en extremadamente sensibles a 6TG. En efecto, los análogos de purina tales como la 6-mercaptapurina (6MP), la azatiopurina (Aza) y 6TG se han utilizado clínicamente para el tratamiento de la leucemia, en particular en pacientes pediátricos, durante medio siglo [17], así como para la inmunosupresión en pacientes de trasplante de órganos y más recientemente para enfermedades autoinmunitarias. A dosis más elevadas, la mielotoxicidad es el efecto adverso más frecuente y consistente de 6TG durante la utilización clínica y al administrarlo a concentraciones apropiadas durante periodos de tiempo cortos, 6TG resulta fuertemente mielosupresor con poca toxicidad en otros tejidos en animales normales de HPRT de tipo salvaje [11].

En contraste, la médula ósea (MO) de los animales deficientes en HPRT es altamente resistente a 6TG [11]. Notablemente, sin embargo, los presentes inventores [11] han encontrado que la hematopoyesis es fenotípica y funcionalmente normal en animales con desactivación de *Hprt* y aunque se han asociado casos de anemia

megaloblástica a deficiencia de HPRT hereditaria (síndrome de Lesch-Nyhan) en el ser humano [19], se ha informado de que lo anterior responde bien a la administración oral de adenina [20]. Además, la deficiencia de HPRT aparentemente no se encuentra asociado a ninguna alteración gruesa del sistema inmunológico en el ser humano o en animales [21].

Dichas observaciones sugieren que las células progenitoras hematopoyéticas deficientes en HPRT, que son resistentes a 6TG pero de otro modo normales, deberían presentar una ventaja selectiva al trasplantarlas en receptores con HPRT de tipo salvaje sometidos a tratamiento con 6TG y que dicha estrategia puede utilizarse para mejorar el resultado de la terapia génica *ex vivo*. De hecho, Porter y DeGregori [22] han demostrado anteriormente la viabilidad de transducir HSC con un vector lentivírico que expresa ARNhp con diana en *Hprt* y de enriquecer dichas células hematopoyéticas manipuladas *in vivo* mediante quimioselección con 6TG en ratones. Sin embargo, en dicho informe anterior, se utilizó 6TG a dosis seleccionadas para ser sólo moderadamente mielosupresoras o sólo durante periodos cortos de selección que se iniciaron 4 semanas o más después del trasplante y a pesar del preacondicionamiento mediante irradiación del cuerpo entero, los resultados de injertación eran relativamente modestos y altamente variables, comprendidos entre 5% y 50% [22].

Los presentes inventores han examinaron sistemáticamente los efectos de modificar la dosis, la programación temporal y la duración de la administración de 6TG sobre la injertación y la reconstitución hematopoyética tras el trasplante de médula ósea deficiente en HPRT. Con el fin de excluir la eficiencia de transducción de vector como variable, los presentes inventores utilizaron la MO procedente de animales con desactivación de *Hprt* como células donantes 'ideales', permitiendo de esta manera centrarse en los efectos de modificar la dosis de 6TG y los parámetros de programación tanto (i) pretrasplante para el acondicionamiento mielosupresor de receptores de HPRT de tipo salvaje e (ii) post-trasplante para la amplificación quimioselectiva de poblaciones de células donantes deficientes en HPRT. En consecuencia, en la presente memoria los inventores describen el desarrollo de un nuevo régimen que utiliza secuencialmente 6TG como agente único para tanto el preacondicionamiento como la quimioselección *in vivo* y muestra que dicho régimen de combinación rápida y consistentemente consigue una injertación altamente eficiente y una reconstitución duradera.

#### Materiales y métodos

##### Ratones

Se obtuvieron originalmente ratones deficientes en *Hprt* B6.129P2-*Hprt*<sup>1b-3</sup>/J (CD45.2), de *Hprt* de tipo salvaje (wt) C57BL/6J y B6.SJL-*Ptprc*<sup>a</sup>*Pepc*<sup>b</sup>/BoyJ (CD45.1) del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones B6.129P2-*Hprt*<sup>1b-m3</sup>/J portan una delección de 55 kb que comprende el promotor y los primeros 2 exones del gen *Hprt* [23]. Se criaron los ratones y se mantuvieron en las instalaciones animales libres de patógenos específicos de la institución, bajo condiciones estándares siguiendo las directrices institucionales.

##### Tratamiento de 6TG

En ratones C57BL/6J y B6.129P2-*Hprt*<sup>1b-m3</sup>/J se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) 200 µl de dosis variables de 6TG (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) en diferentes puntos temporales, tal como se indica en las leyendas de las figuras. En animales de control se inyectaron i.p. 200 µl de H<sub>2</sub>O estéril.

##### Trasplante de médula ósea y quimioselección *in vivo* con 6TG

Se trataron ratones hembra receptores C57BL/6J (HPRT-wt) o B6.SJL-*Ptprc*<sup>a</sup>*Pepc*<sup>b</sup>/BoyJ (HPRT-wt, CD45.1) con 10 mg/kg de 6TG mediante inyección i.p. 48 h antes del HSCT. Para el HSCT, se inyectaron por vía intravenosa 0,8-1 x 10<sup>7</sup> células de MO nucleadas, aisladas a partir de ratones macho B6.129P2-*Hprt*<sup>1b-m3</sup>/J (CD45.2) en ratones receptores de HPRT de tipo salvaje. Se administró nuevamente 6TG (10 mg/kg) mediante inyección i.p. 2 h después y cada 3 días posteriormente, a una concentración de 5 mg/kg durante 4 semanas. Se llevó a cabo el trasplante en serie en ratones receptores secundarios utilizando la misma dosis celular y el régimen de preacondicionamiento/quimioselección con 6TG tal como se ha indicado anteriormente, aunque utilizando la MO de ratones receptores primarios que habían sido sometidos a trasplante con quimioselección *in vivo* con 6-TG seis meses antes.

##### Hibridación *in situ* de fluorescencia específica de cromosoma X e Y de ratón

Se llevó a cabo FISH en células de MO y LSP utilizando la sonda de pintura específica de ratón de cromosoma Y completo/mezcla de sondas de ADN RAB9 (XqF1) (Kreatech, Amsterdam, Países Bajos) siguiendo el protocolo del fabricante. Para determinar el porcentaje de células HPRT-wt de donante macho en ratones hembra receptoras C57BL/6J, se contaron 200 núcleos por portaobjetos utilizando un microscopio de fluorescencia (Zeiss) dotado de los filtros apropiados de dos y tres colores. Se aplicaron los criterios siguientes al análisis de FISH: (1) se evaluó la calidad de los núcleos mediante tinción DAPI, (2) se puntuó la señal fluorescente verde para el cromosoma Y, (3) se puntuó la señal fluorescente roja para el cromosoma X, (4) se registró la ausencia de señal fluorescente verde para el núcleo

del cromosoma Y como hembra, incluso cuando sólo era detectable el cromosoma X (figura complementaria S1; ver Experimental Hematology 40:3-13, 2012, para figuras complementarias).

#### Análisis inmunofenotípico de tejidos hematopoyéticos

5 Tras el bloqueo con Mouse BD Fc Block (BD Biosciences, San Jose, CA), se tiñeron células de MO, LSP, timo o bazo con anticuerpos de rata antiratón conjugados con FITC, PE, PerCP o APC contra CD45, CD45.2, CD4, CD8, Mac1/Gr1, B220, Sca-1, c-kit y cóctel de anticuerpos de linaje. Se recibieron anticuerpos de Biolegend (San Diego, CA) o de BD Biosciences. Se captaron los datos de citometría de flujo en un BD LSRII ejecutando BD FACSDiva (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR) (figura complementaria S2).

#### Análisis histopatológico

15 Se llevó a cabo la necropsia de todos los ratones utilizados en el presente estudio y el examen histológico de todos los órganos torácicos y abdominales y la médula ósea en la división del UCLA de Laboratory Animal Medicine Diagnostic Service. Los tejidos fueron procesados rutinariamente o descalcificados en caso necesario y se cortaron secciones en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E).

#### Análisis estadístico

20 Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico QuickCalcs (Graphpad Software Inc.). Se utilizaron pruebas t no apareadas para calcular los valores de p y se consideró  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

#### Resultados

##### Mielotoxicidad aguda de 6TG en ratones HPRT-wt

30 Se predice que los elevados niveles de expresión de HPRT en progenitores hematopoyéticos median en un efecto mielotóxico selectivo de 6TG y permiten su utilización como régimen de acondicionamiento. De acuerdo con lo anterior, los presentes inventores examinaron los efectos a corto plazo sobre la MO tras las inyecciones de bolo de 6TG a diversas dosis en ratones HPRT-wt. Se llevó a cabo la inyección peritoneal de una única dosis de 2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg de 6TG el día 1, o la inyección de dos dosis de 10 mg/kg los días 1 y 3 y se examinó la histología de la MO el día 4. Se observó una mielotoxicidad creciente al incrementar la dosis total de 6TG (fig. 1A). Las estructuras vasculares se tornaron crecientemente prominentes y se redujo el número de células de los linajes eritroide y mieloide. Sólo el endotelio vascular, las células mesenquimales, algunos granulocitos maduros y los macrófagos, y ocasionales células progenitoras hematopoyéticas se mantuvieron a la dosis de 6TG más alta sometida a ensayo (fig. 1B).

40 No se observaron signos clínicos claramente evidentes el día 4 bajo ninguno de los regímenes anteriormente indicados aunque al extender el periodo de observación, se observó pérdida de peso y palidez de las extremidades el día 7. El examen histológico de la MO mostró una severidad creciente entre el día 4 y el día 7 incluso sin administración de dosis adicionales de 6TG (figs. 1A y 2A). En concordancia con los resultados clínicos e histológicos, la MO de los ratones HPRT-wt tratados con dos dosis de 10 mg/kg de 6TG y analizados el día 7, mostraron una reducción cuantitativa significativa en el recuento de células nucleadas de la MO recuperadas de un fémur y tibia ( $4,7 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^6$ ,  $n=3$ ) en comparación con el de ratones HPRT-wt tratados con control de vehículo ( $1,1 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ ,  $n=3$ ) ( $p < 0,01$ ).

50 El análisis inmunofenotípico de las células hematopoyéticas de MO restantes mediante citometría de flujo (Tabla 1) reveló que la proporción relativa de células progenitoras de KLS (lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>/sca-1<sup>+</sup>), que incluían HSC con actividad de reconstitución de multilineaje a largo plazo [24], se redujo significativamente 3 veces el día 4 ( $p < 0,01$ ) y 10 veces el día 7 ( $p < 0,001$ ) (Tabla 1-iii, -iv). El porcentaje relativo de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> maduras se incrementa progresivamente durante el tiempo tras la administración de 6TG, alcanzando hasta 7 veces más que los controles el día 7 ( $p < 0,001$ ), probablemente debido a los vasos sanguíneos masivamente dilatados y el flujo de entrada de sangre periférica/hemorragia, tal como también puede observarse en la histología de la MO. El porcentaje relativo de células B220<sup>+</sup> no mostró ningún cambio significativo el día 4 pero se había doblado en comparación con los controles el día 7 después de la administración de 6TG.

Tabla 1. Análisis inmunofenotípico de células hematopoyéticas de MO tras un régimen de acondicionamiento con 6TG.

Se tiñeron las células de MO con los anticuerpos de rata antiratón siguientes: CD45-FITC, CD4-PE, CD8-APC, B220-PerCP, Mac1/Gr1-PE, Sca-1-PE, y c-kit-FITC, y se examinaron mediante citometría de flujo. Los programas de tratamiento y de análisis indican mediante números romanos en minúscula y son los mismos que en la figura 1. (i): Control de vehículo el día 1, análisis el día 4. (ii) dosis única de 10 mg/kg de 6TG el día 1, análisis el día 4. (iii): Dos dosis de 10 mg/kg de 6TG los días 1 y 3, análisis el día 4. (iv) y (v): Dos dosis de 10 mg/kg de 6TG los días 1 y 3, análisis el día 7. Las dos últimas columnas muestran los resultados de la misma dosis y programa de 6TG (10 mg/kg de 6TG x 2 dosis) en ratones HPRT-wt (iv) y deficientes en

HPRT (v), respectivamente. Los porcentajes de las subpoblaciones de células hematopoyéticas indicadas se expresan como medias (%) ± SD de células CD45<sup>+</sup> totales (n=3 en cada grupo).

Población celular	HPRT de tipo salvaje				deficiente en HPRT
	i	ii	iii	iv	v
CD45 <sup>+</sup>	91,5±2,4	95,7±0,8	95,7±0,1	82,8±5,1	90,0±2,0
CD4 <sup>+</sup>	3,5±0,4	11,9±2,5	9,6±0,6	20,5±3,1	2,9±1,7
CD8 <sup>+</sup>	3,6±0,1	5,3±1,7	5,2±0,4	25,0±2,7	2,7±0,4
B220 <sup>+</sup>	28,4±3,3	23,1±2,2	26,2±1,8	56,3±1,5	10,7±3,5
Mac1 <sup>+</sup> /Gr1 <sup>+</sup>	75,8±1,1	85,4±1,8	81,0±1,3	61,8±3,0	79,3±2,9
KLS (HSC)	4,2±0,6	1,3±0,2	1,4±0,5	0,4±0,2	2,0±0,6

En especial, los enzimas hepáticos no se encontraban elevados tras el régimen de acondicionamiento en ratones HPRT-wt, indicando selectividad de la citotoxicidad de 6TG para los progenitores hematopoyéticos a esta dosis e indicando su potencial de utilización como régimen de acondicionamiento mielosupresor.

5

Falta de mielotoxicidad a la dosis de acondicionamiento de 6TG en ratones deficientes en HPRT

En contraste con los resultados anteriores, al tratar ratones deficientes en HPRT con la dosis máxima (dos dosis de 10 mg/kg de 6TG los días 1 y 3), la histología de la médula ósea se mantuvo completamente no afectada el día 7 (fig. 2A) y era comparable a la del grupo de control de vehículo (fig. 1A). Cabe destacar que el recuento global de células nucleadas de la MO obtenidas de un fémur y tibia de ratones deficientes en HPRT tratados con 6TG ( $1,5 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$ , n=3) también era comparable a la de los ratones HPRT-wt tratados con control de vehículo ( $1,1 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ , n=3), y era significativamente superior a los ratones HPRT-wt tratados con el mismo régimen de 6TG ( $4,7 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^6$ , n=3) (p<0,005).

10

15

Además, las proporciones de subpoblaciones de células hematopoyéticas en la MO de ratones deficientes en HPRT tratados con 6TG (Tabla 1-v) eran comparables a las de los ratones HPRT-wt tratados con control de vehículo (Tabla 1-i) y ratones HPRT-wt no tratados (Tabla 2, columna MO %), así como a las de los ratones deficientes en HPRT no tratados (Tabla 3, columna MO %).

20

Tabla 2. Análisis inmunofenotípico de células hematopoyéticas en ratones HPRT-wt previamente no tratados

Se tiñeron MO, LSP, bazo (S) y timo (T) con los anticuerpos de rata antiratón siguientes: CD45-FITC (MO, LSPL, T, S), CD4-PE (MO, LSP, T, S), CD8-APC (MO, LSP, T, S), Mac1/Gr1-PE (MO, LSP, S), B220-PerCP (MO, LSP, S), Sca-1-PE (MO) y c-kit-FITC (MO) y se examinaron mediante citometría de flujo. Los porcentajes de las subpoblaciones de células hematopoyéticas indicadas se expresan como medias (%) ± SD de células CD45<sup>+</sup> totales (n=3 en cada grupo).

Población celular	MO (%)	LSP (%)	Timo (%)	Bazo (%)
CD45 <sup>+</sup>	92,6±3,2	98,6±0,5	98,7±0,6	97,1±1,0
CD4 <sup>+</sup>	3,9±1,6	12,2±2,6	6,5±2,1	19,7±1,7
CD8 <sup>+</sup>	1,6±0,8	11,4±1,7	3,6±1,2	16,5±0,3
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>			85,6±4,3	
B220 <sup>+</sup>	20,4±8,2	47,8±13,2		54,4±4,9
Mac1 <sup>+</sup> /Gr1 <sup>+</sup>	87,3±8,1	36,1±5,0		18,7±3,9
KLS (HSC)	3,6±2,4			

25

Tabla 3. Análisis inmunofenotípico de células hematopoyéticas en ratones deficientes en HPRT previamente no tratados

Se tiñeron MO, LSP, bazo (S) y timo (T) con los anticuerpos de rata antiratón siguientes: CD45-FITC (MO, LSPL, T, S), CD4-PE (MO, LSP, T, S), CD8-APC (MO, LSP, T, S), Mac1/Gr1-PE (MO, LSP, S), B220-PerCP (MO, LSP, S), Sca-1-PE (MO) y c-kit-FITC (MO) y se examinaron mediante citometría de flujo. Los porcentajes de las subpoblaciones de células hematopoyéticas indicadas se expresan como medias (%) ± SD de células CD45<sup>+</sup> totales (n=3 en cada grupo).

Población celular	MO (%)	LSP (%)	Timo (%)	Bazo (%)
CD45 <sup>+</sup>	92,3±1,3	96,1±2,7	98,7±0,4	94,9±1,8
CD4 <sup>+</sup>	4,9±1,4	15,9±0,8	6,5±1,0	18,4±2,7
CD8 <sup>+</sup>	2,4±0,2	11,7±0,7	2,9±0,1	11,8±1,9
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>			86,9±0,9	
B220 <sup>+</sup>	28,2±2,7	55,7±2,9		51,3±5,5
Mac1 <sup>+</sup> /Gr1 <sup>+</sup>	79,7±2,2	30,1±4,0		9,9±1,8
KLS (HSC)	3,3±0,5			

Conjuntamente, dichos resultados sugieren que podrían utilizarse hasta dos dosis de 10 mg/kg de 6TG como régimen eficaz de acondicionamiento que resultaría bien tolerado durante como máximo 3 días anteriores al HSCT, con mielotoxicidad progresivamente creciente durante un periodo de 7 días.

30

Trasplante de MO deficiente en HPRT tras el acondicionamiento con 6TG en receptores HPRT-wt

5 Basándose en el programa establecido anteriormente, los presentes inventores utilizaron 6TG (10 mg/kg i.p.) como régimen de acondicionamiento en receptores HPRT-wt (CD45.1) con una dosis administrada 48 horas antes (denominado día 2 y no día 1) y una dosis administrada el día del trasplante (denominado día 0 y no día 3) según el programa establecido anteriormente. Tras el acondicionamiento, seguidamente los receptores HPRT-wt recibieron un trasplante de MO procedente de donantes congénicos deficientes en HPRT (CD45.2).

10 El día 4, la médula mostraba una celularidad reducida con menos células progenitoras tempranas y vascularidad incrementada (fig. 2B) y el recuento global de células nucleadas de la MO recuperadas de dichos ratones HPRT-wt acondicionados con 6TG y trasplantados con MO deficiente en HPRT ( $3,8 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ , n=4) todavía era significativamente menor ( $p < 0,001$ ) que el del grupo de HPRT-wt tratado con control de vehículo ( $1,1 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ , n=3). Los análisis de citometría de flujo de la MO mostraron que el día 4 sólo  $17,8\% \pm 4,4\%$  de la población celular total se derivaba de células hematopoyéticas CD45.2<sup>+</sup> deficientes en HPRT donantes.

Umbral de mielotoxicidad tras el tratamiento crónica de dosis bajas de 6TG

20 Debido a que los resultados anteriormente proporcionados de los presentes inventores indicaban que el preacondicionamiento con 6TG por sí solo podría no resultar suficiente para conseguir niveles elevados de injertación, a continuación se llevó a cabo un estudio de establecimiento de dosis en ratones no trasplantados que habían recibido tratamiento crónico con dosis más bajas de 6TG. En ratones HPRT-wt y en ratones deficientes en HPRT (n=3 en cada grupo) se inyectó i.p. Vehículo solo, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg o 5,0 mg/kg de 6TG cada 3 días durante un máximo de 60 días. En ratones HPRT-wt, el grupo de control de vehículo, así como los grupos de 0,25 mg/kg y de 0,5 mg/kg de 6TG mostraron un 100% de supervivencia durante un periodo de 60 días y el examen histológico de la MO en los grupos de 0,25 mg/kg y de 0,5 mg/kg de 6TG mostraron una celularidad normal el día 60 (fig. 3).

30 En contraste, en el grupo de HPRT-wt 1,0 mg/kg de 6TG, se produjeron muertes el día 38 (13 mg/kg de dosis total), el día 42 (14 mg/kg de dosis total) y el día 51 (17 mg/kg de dosis total) (Tabla S1). A dosis más altas, los ratones HPRT-wt que recibieron inyecciones repetidas de 2,5 mg/kg o 5 mg/kg de 6TG mostraron consistentemente signos clínicos progresivos de sufrimiento (inactividad, postura encorvada, falta de comportamiento de aseo, anorexia), anemia (palidez de las extremidades) y >10% de pérdida de peso, exigiendo el sacrificio según directrices institucionales el día 28 (grupo de 2,5 mg/kg de 6TG, 22,5 mg/kg de dosis total) y el día 22 (grupo de 5,0 mg/kg de 6TG; 35 mg/kg dosis total), respectivamente. El examen histológico de la MO del grupo de 1,0 mg/kg de 6TG mostraba varias figuras apoptóticas y más blastocitos que en los grupos de dosis más bajas, probablemente reflejando una respuesta de activación inicial frente al daño (fig. 3, día 38). Los grupos de dosis más altas también mostraron una celularidad significativamente reducida y una expansión de las estructuras vasculares, con una severidad de las lesiones proporcional a la dosis acumulada de 6TG en cada grupo. Los ratones tratados con dosis repetidas de 2,5 mg/kg de 6TG mostraban una celularidad reducida y apoptosis generalizada (día 28). A la dosis crónica más alta, de 5 mg/kg, la MO se encontraba marcadamente empobrecida, siendo la mayor parte de las células supervivientes del linaje mielóide (día 22).

45 En contraste con los ratones HPRT-wt, los ratones deficientes en HPRT sobrevivieron a todo el experimento (60 días), con independencia de la dosis de 6TG inyectada (hasta 105 mg/kg, dosis total máxima, administrada siguiendo los mismos programas de administración indicados anteriormente) (Tabla S1). No se observó patología significativa de la MO en ningún ratón deficiente en HPRT, con independencia de la dosis de 6TG, en el punto temporal terminal del experimento el día 60 (fig. 3). No se observaron anomalías significativas relacionadas con los tratamientos en ningún otro tejido examinado, incluyendo corazón, pulmón, hígado, páncreas, riñón y bazo. De esta manera, los ratones deficientes en HPRT no mostraron efectos tóxicos del tratamiento crónico con 6TG a las dosis de 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg y 5,0 mg/kg que causasen mielotoxicidad letal en ratones HPRT-wt.

El acondicionamiento con 6TG y quimioselección *in vivo* en combinación consiguieron una injertación consistente y altamente eficiente de MO deficiente en HPRT

55 Basándose en el estudio anterior de establecimiento de dosis, los presentes inventores se plantearon si el preacondicionamiento con 6TG en combinación con la administración continua de dosis más bajas de 6TG desde inmediatamente después del trasplante de MO deficiente en HPRT en receptores HPRT-wt podía conseguir una amplificación quimioselectiva adicional de las células donantes injertadas. De acuerdo con lo anterior, se preacondicionaron ratones HPRT-wt hembra con 6TG (10 mg/kg, i.p.) con una dosis administrada 48 horas antes (día 2) y una dosis administrada el día del trasplante (día 0) según el programa de acondicionamiento establecido anteriormente. A continuación, se trasplantó una MO macho deficiente en HPRT en receptores HPRT-wt hembra y basándose en los resultados de mielotoxicidad crónica anteriormente proporcionados, los receptores fueron tratados adicionalmente con dosis repetidas de 2,5 mg/kg de 6TG cada 3 días durante 2 semanas (30 mg/kg de dosis total) o durante 4 semanas (42,5 mg/kg) o con dosis repetidas de 5,0 mg/kg de 6TG cada 3 días durante 2 semanas (40 mg/kg

de dosis total) o durante 4 semanas (65 mg/kg de dosis total). Se llevó a cabo el análisis inmediatamente después del periodo de quimioselección *in vivo* a las 2 o 4 semanas, respectivamente (fig. 4).

Tal como se esperaba, los procedimientos de acondicionamiento con 6TG, HSCT y quimioselección *in vivo* con 6TG combinados resultaron bien tolerados y no se observaron indicios de sufrimiento. En todos los grupos tratados con 6TG, el 100% de los animales trasplantados sobrevivió (tratamiento de 2 semanas: n=3 y tratamiento de 4 semanas: n=8). Los pesos corporales se redujeron inicialmente durante la primera semana después del trasplante en los animales tratados con 6TG pero se estabilizaron y todos los animales recuperaron nuevamente el peso normal. El análisis histopatológico mostró que la celularidad global y la hematopoyesis en los animales trasplantados eran indistinguibles del control HPRT-wt no tratado, con independencia de la dosis o duración de la quimioselección con 6TG (fig. 4).

El análisis FISH del cromosoma XY [25, 26] mostró que en los grupos que habían recibido 2 semanas de quimioselección de 6TG, la MO en dicho punto temporal ya había sido reconstituida con médula derivada del donante a niveles de 89,3%±1,7 (grupo de 2,5 mg/kg) y 95,5%±1,2 (grupo de 5 mg/kg). Los porcentajes de leucocitos de sangre periférica (LSP) derivados de donante a las 2 semanas eran de 13,0%±4,6 (grupo de 2,5 mg/kg) y 12,7%±2,9 (grupo de 5,0 mg/kg), respectivamente (Tabla 4). Al continuar la quimioselección *in vivo* durante hasta 4 semanas después del HSCT, se encontró nuevamente que el porcentaje de células de MO derivada de donante era extremadamente elevado tanto en el grupo de 2,5 mg/kg (95,3%±0,9) como en el grupo de 5,0 mg/kg (96,7%±1,2). Cabe destacar que el porcentaje de LSP derivadas de donante era significativamente más elevado en el grupo de 5,0 mg/kg (39,7%±3) que en el grupo de 2,5 mg/kg (29,9%±1,9) a las 4 semanas (p<0,005), así como significativamente más elevado (p<0,0002) que en los grupos que habían recibido 2 semanas de quimioselección a cualquiera de las dosis (Tabla 4). De esta manera, el preacondicionamiento con 10 mg/kg de 6TG los días -2 y 0, en combinación con quimioselección *in vivo* continua con 5 mg/kg de 6TG cada 3 días durante 4 semanas, rindió los niveles máximos de injertación de la MO por células donantes deficientes en HPRT, así como los niveles más altos de LSP derivados de donante; se utilizó este régimen en estudios posteriores.

Tabla 4. Supervivencia e injertación después del acondicionamiento y quimioselección *in vivo* con 6TG combinados.

Los programas de tratamiento para la quimioselección *in vivo* son los indicados. Quimioselección *in vivo* con 2,5 mg/kg de 6TG durante 2 semanas, 5,0 mg/kg de 6TG durante 2 semanas, 2,5 mg/kg de 6TG durante 4 semanas o 5,0 mg/kg durante 4 semanas. Todos los grupos de tratamiento mostraron una supervivencia de 100%. La injertación de células hematopoyéticas de machos deficientes en HPRT en MO y LSP receptoras de hembra HPRT-wt se determinó mediante análisis FISH de cromosoma XY (media % ± SD).

Tratamiento	Supervivencia (%)	Injertación	
		MO (%)	LSP (%)
6TG 2,5 mg/kg x 2 semanas	100 (n=3)	89,3±1,7	13,0±4,6
6TG 5,0 mg/kg x 2 semanas	100 (n=3)	95,5±1,2	12,7±2,9
6TG 2,5 mg/kg x 4 semanas	100 (n=3)	95,3±0,9	29,9±1,9
6TG 5,0 mg/kg x 4 semanas	100 (n=8)	96,7±1,2	39,7±3,0

#### El acondicionamiento con 6TG y quimioselección *in vivo* combinados resulta en la reconstitución a largo plazo de la MO deficiente en HPRT

Se examinó la durabilidad de la injertación con MO de donante deficiente en HPRT utilizando el régimen combinado de acondicionamiento con 6TG y quimioselección *in vivo* establecido anteriormente, 4, 7 o 12 meses después del trasplante (es decir, 3, 6 y 11 meses después del final del periodo de quimioselección *in vivo* de 4 semanas, respectivamente). Todos los animales trasplantados (4 meses: n=8; 7 meses: n=6; 12 meses: n=5) se mantuvieron vivos y bien, sin mostrar signos de ninguna morbilidad o molestia, en todos los puntos temporales examinados. El examen patológico e histológico grueso de estos animales no reveló anomalías significativas.

La reconstitución multilineaje de la linfopoyesis por células progenitoras derivadas de donante se evaluó 4 meses después de la HSCT con preacondicionamiento y quimioselección *in vivo* con 6TG combinados, es decir, 3 meses después del final del periodo de quimioselección de 4 semanas. El inmunofenotipo de MO, LSP, timo y bazo se llevó a cabo en un contexto de trasplante congénico CD45.1/CD45.2 utilizando ratones CD45.2 deficientes en HPRT y ratones HPRT-wt CD45.1 como receptores (n=5). Todos los tejidos hematopoyéticos mostraron una elevada injertación de células donantes CD45.2<sup>+</sup> a niveles superiores a 75% de la médula ósea total (Tabla 5). El inmunofenotipo de la población CD45.2<sup>+</sup> derivada de donantes mostró que los porcentajes relativos de células T (CD4/CD8), células B220<sup>+</sup> y macrófagos/granulocitos (Mac-1/Gr1) eran comparables a los de los controles no tratados previamente (Tablas 2 y 3).

Tabla 5. Análisis inmunofenotípico de los tejidos hematopoyéticos 4 meses después del trasplante utilizando un régimen de acondicionamiento con 6TG y quimioselección *in vivo* en un modelo de trasplante congénico CD45.1/CD45.2. El acondicionamiento y quimioselección *in vivo* con 6TG se llevaron a cabo tal como se ha indicado en el texto. Se tificaron la MO y LSP receptoras con los anticuerpos de rata antiratón siguientes: CD45.2-FITC (MO,

LSP, T, S), CD4-PE (MO, LSP, T, S), CD8-APC (MO, LSP, T, S), Mac1/Gr1-PE (MO, LSP), B220-PerCP (MO, LSP, S) y examinados mediante citometría de flujo. Los porcentajes de las subpoblaciones de células hematopoyéticas indicadas se expresan como medias (%)  $\pm$  SD de células CD45.2<sup>+</sup> totales (n=5 en cada grupo).

Población celular	MO (%)	LSP (%)	Timo (%)	Bazo (%)
CD45.2 <sup>+</sup>	76,1 $\pm$ 9,3	73,8 $\pm$ 5,2	89,7 $\pm$ 8,3	65,9 $\pm$ 5,2
CD4 <sup>+</sup>	3,2 $\pm$ 1,3	17,0 $\pm$ 3,0	10,4 $\pm$ 2,8	22,6 $\pm$ 3,6
CD8 <sup>+</sup>	3,0 $\pm$ 1,3	12,7 $\pm$ 0,9	4,3 $\pm$ 0,8	14,9 $\pm$ 2,1
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>			79,3 $\pm$ 4,2	
B220 <sup>+</sup>	29,3 $\pm$ 6,3	45,4 $\pm$ 3,8		58,2 $\pm$ 8,6
Mac1 <sup>+</sup> /Gr1 <sup>+</sup>	80,68 $\pm$ 6,1	28,2 $\pm$ 3,3		14,1 $\pm$ 1,6

5 También se evaluaron los niveles de injertación mediante FISH de cromosoma XY en los puntos temporales post-trasplante de 4 meses, 7 meses y 12 meses. Se observó una reconstitución duradera estable por MO derivada de donante a niveles elevados en todos los puntos temporales, con niveles de injertación de 97,7% $\pm$ 0,5% (4 meses), 94,7% $\pm$ 1,9% (7 meses) y 93,0% $\pm$ 0,8% (12 meses), respectivamente, después del trasplante (Fig. 5). Además, el porcentaje de LSP derivadas de donante se incrementó significativamente (67,4% $\pm$ 10,6% a los 4 meses, p=0,01; 73,3% $\pm$ 7,9% a los 7 meses, p<0,01; 73,0% $\pm$ 10,7% a los 12 meses, p<0,01) en comparación con el periodo de selección con 6TG de 4 semanas inmediatamente posterior (39,7% $\pm$ 3,0%).

15 Se determinaron los porcentajes relativos de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, células B220<sup>+</sup> y células Mac-1<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup>, así como de HSC KLS (lin<sup>-</sup>/sca-1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>) en MO mediante inmunofenotipado a los 4, 7 y 12 meses (Tabla 6) y se compararon con ratones HPRT-wt hembra no sometidos a tratamiento (Tabla 2) y con ratones de control deficientes en HPRT macho no sometidos a tratamiento (Tabla 3). En los tres puntos temporales el porcentaje relativo de cada población celular era comparable al observado en los controles, aunque las células KLS se encontraban elevadas a los 4 y 7 meses y dentro del intervalo normal a los 12 meses después del HSCT. De esta manera, la médula derivada de donante deficiente en HPRT logró la reconstitución duradera de la hematopoyesis normal durante como mínimo 12 meses después del trasplante.

25 Tabla 6. Análisis inmunofenotípico de la MO a los 4, 7 y 12 meses del trasplante con MO deficiente en HPRT utilizando un régimen de acondicionamiento y quimioselección *in vivo* con 6TG. En los puntos temporales indicados después del HSCT con acondicionamiento y quimioselección *in vivo* con 6TG, se tiñeron las células de MO receptoras con los anticuerpos de rata antirátón siguientes: CD45-FITC, CD4-PE, CD8-APC, Mac1/Gr1-PE, B220-PerCP, Sca-1-PE, y c-kit-FITC, y se examinaron mediante citometría de flujo. Los porcentajes de las subpoblaciones de células hematopoyéticas indicadas se expresan como medias (%)  $\pm$  SD de células CD45<sup>+</sup> totales.

Población celular	4 meses MO (%)	7 meses MO (%)	12 meses MO (%)
CD45 <sup>+</sup>	91,6 $\pm$ 1,9	94,3 $\pm$ 2,1	82,5 $\pm$ 4,9
CD4 <sup>+</sup>	2,5 $\pm$ 0,6	3,8 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 2,7
CD8 <sup>+</sup>	1,9 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,6
B220 <sup>+</sup>	51,8 $\pm$ 2,4	32,9 $\pm$ 3,8	11,5 $\pm$ 2,8
Mac1 <sup>+</sup> /Gr1 <sup>+</sup>	77,0 $\pm$ 13,0	80,8 $\pm$ 2,3	72,3 $\pm$ 5,4
KLS (HSC)	7,8 $\pm$ 1,0	7,0 $\pm$ 1,1	1,8 $\pm$ 0,6

30 Reconstitución hematopoyética de receptores secundarios tras el trasplante en serie de MO de donante deficiente en HPRT con acondicionamiento con 6TG y quimioselección combinados

35 Con el fin de evaluar adicionalmente si el régimen optimizado que combinaba acondicionamiento y quimioselección con 6TG seleccionaba para la repoblación a largo plazo de HSC, los presentes inventores trasplantaron a continuación MO procedente de receptores primarios 7 meses después del trasplante en receptores secundarios [27] utilizando el mismo régimen. A continuación, los receptores secundarios de trasplante se mantuvieron durante 3 meses después del final del curso de 4 semanas de quimioselección *in vivo* con 6TG (figura complementaria S3). Tras el acondicionamiento y quimioselección con 6TG, las células de donantes macho deficientes en HPRT que habían injertado los receptores primarios pudieron repoblar en serie receptores hembra secundarios a niveles elevados (95,5% $\pm$ 1,1%, según determinación mediante análisis FISH de XY). El análisis inmunofenotípico reveló que los porcentajes de todas las poblaciones celulares examinadas en la MO y las LSP de receptores secundarios (Tabla 7) nuevamente eran comparables a los de los controles no sometidos previamente a tratamiento (Tablas 2 y 3).

45 Tabla 7. Análisis inmunofenotípico de células hematopoyéticas en receptores secundarios tras el trasplante en serie de MO deficiente en HPRT con acondicionamiento y quimioselección *in vivo* con 6TG. El trasplante en serie con régimen de acondicionamiento y quimioselección *in vivo* con 6TG se llevó a cabo tal como se indica en la figura S3. Se tiñeron la MO y LSP de receptores secundarios con los anticuerpos de rata antirátón siguientes: CD45-FITC (MO, LSP), CD4-PE (MO, LSP), CD8-APC (MO, LSP), Mac1/Gr1-PE (MO, LSP) y B220-PerCP (MO, LSP) y se examinaron mediante citometría de flujo. Los porcentajes de las subpoblaciones de células hematopoyéticas indicadas se expresan como medias (%)  $\pm$  SD de células CD45<sup>+</sup> totales (n=6 en cada grupo).

Población celular	MO (%)	LSP (%)
CD45 <sup>+</sup>	84,6±4,7	95,8±1,4
CD4 <sup>+</sup>	4,1±1,0	7,0±3,3
CD8 <sup>+</sup>	2,4±0,8	7,0±3,2
B220 <sup>+</sup>	19,1±2,9	33,3±12,3
Mac1 <sup>+</sup> /Gr1 <sup>+</sup>	78,3±4,7	31,6±11,7

Los presentes inventores han desarrollado un régimen optimizado que utiliza 6TG como agente único para el acondicionamiento pretrasplante así como la quimioselección *in vivo* continua post-trasplante de HSC de donante deficiente en HPRT. Esta estrategia de acondicionamiento y quimioselección con 6TG combinados consiguió una injertación de HSC eficiente con una toxicidad global baja, mediante un procedimiento de sustitución progresivo y simultáneo en el que los huéspedes receptores mostraron poco o ningún sufrimiento y 100% de supervivencia, mientras que su MO resultó rápida sustituida prácticamente por completo por células donantes deficientes en HPRT, consiguiendo consistentemente una injertación de 95% según el análisis FISH de XY y >75% según el inmunofenotipado de CD45.2. El porcentaje de LSP derivadas de donante se incrementó significativamente durante el tiempo (4 y 7 meses después del trasplante) en comparación con el porcentaje inmediatamente después del periodo de selección con 6TG de 4 semanas. Las células receptoras residuales en LSP probablemente reflejan una renovación más baja de las células maduras que no se dividen en LSP. La reconstitución duradera estable de la MO se consiguió tanto en receptores primarios como en receptores secundarios. El análisis de inmunofenotipado de MO, LSP, bazo y timo demostró que, tras la reconstitución duradera, la diferenciación hematopoyética no resultó afectada por la quimioselección *in vivo* con 6TG.

Estos resultados confirman además la observación anterior de los presentes inventores de que, a las concentraciones apropiadas, 6TG aparentemente induce una mielotoxicidad selectiva sin ningún efecto adverso sobre los tejidos extra-hematopoyéticos. HPRT se expresa a niveles bajos en todas las células somáticas [30] y la pérdida heredada de HPRT da lugar al síndrome de Lesch-Nyhan [31], que se manifiesta como retardo mental severo y anomalías del comportamiento, ya que se han encontrado niveles más altos de expresión y actividad de HPRT en el sistema nervioso central, en particular durante el desarrollo neurológico [32]. Sin embargo, debido a que las neuronas totalmente diferenciadas no experimentan replicación, dichos niveles más elevados no se traducen en una neurotoxicidad de 6TG más elevada en adultos maduros.

En un trabajo anterior de Porter y DeGregori [22], se utilizó una irradiación de cuerpo completo de 4,5 Gy para conseguir la mieloablación y se utilizó 6TG únicamente para la quimioselección en periodos de tiempo posteriores. En contraste, en el régimen de los presentes inventores, 6TG como agente único satisface la doble función de acondicionamiento (citorreducción de la MO del huésped) y fármaco quimioselectivo (amplificación de la MO del donante). Es conocido que la toxicidad de 6TG requiere dos rondas de replicación de ADN para resultar en la apoptosis [33] y, por lo tanto, muestra un efecto retardado. Los resultados de los presentes inventores también indicaban un efecto mielotóxico dependiente de la dosis y del tiempo de 6TG. De esta manera, el acondicionamiento con 10 mg/kg de 6TG antes del trasplante podría mejorar el resultado de la quimioselección *in vivo* con 6TG mediante la compensación del retardo en la mielotoxicidad de 6TG y proporcionando un nicho adecuado para las HSC en el momento del trasplante. Además, Porter et al. utilizó 6TG a dosis mucho más bajas comprendidas entre 0,25 y 2 mg/kg durante periodos de tiempo cortos, partiendo de más de un mes después del trasplante y resultando en niveles de injertación variables comprendidos entre 5% y 50%. En el presente estudio los presentes inventores confirmaron que los ratones trasplantados con BO deficiente en *Hprt* podían tolerar dosis de 6TG 5 a 40 veces más elevadas con la administración del fármaco quimioselectivo administrado inmediatamente después del trasplante y continuando la administración durante periodos de selección considerablemente más largos.

Con el fin de traducir la utilización de la estrategia de quimioselección *in vivo* con 6TG en un enfoque clínicamente viable, resulta necesario desarrollar métodos para manipular genéticamente las HSC normales y convertirlas en deficientes en HPRT y, de esta manera, resistentes a 6TG. Además, debe destacarse que el estudio actual de los presentes inventores se limitaba a utilizar dicha estrategia para el trasplante de médula ósea en ratones singénicos, que modeliza la situación en el contexto de un trasplante autólogo. Está por ver si dicha estrategia resultará igualmente útil en el contexto alogénico, ya que los regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida se están utilizando rutinariamente para evitar la toxicidad de los regímenes mieloablativos tradicionales. Entre los potenciales problemas que podría resultar necesario resolver se incluyen la posibilidad de resistencia espontánea a 6TG que aparezca en células leucémicas después del trasplante alogénico para neoplasias malignas hematopoyéticas y la posible exacerbación de la enfermedad del injerto contra el huésped en el caso de que las células donantes alogénicas se amplifiquen selectivamente *in vivo*.

#### Referencias

- [1] Biffi A, Cesani M. *Curr Gene Ther.* 2008;8:135-146.
- [2] Persons DA, Nienhuis AW. *Curr Opin Mol Ther.* 2002;4:491-498.
- [3] Williams DA, Hsieh K, DeSilva A, Mulligan RC. *J Exp Med.* 1987;166:210-218.
- [4] Mickisch GH, Aksentijevich I, Schoenlein PV, et al. *Blood.* 1992;79:1087-1093.
- [5] Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, et al. *Science.* 1992;257:99-103.

- [6] Zaboikin M, Srinivasakumar N, Schuening F. *Cancer Gene Ther.* 2006;13:335-345.
- [7] Southgate T, Fairbairn LJ. *Expert Rev Mol Med.* 2004;6:1-24.
- [8] Milsom MD, Williams DA. *DNA Repair (Amst).* 2007;6:1210-1221.
- [9] Neff T, Beard BC, Kiem HP. *Blood.* 2006;107:1751-1760.
- 5 [10] Schambach A, Baum C. *DNA Repair (Amst).* 2007;6:1187-1196.
- [11] Aubrecht J, Goad ME, Schiestl RH. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282:1102-1108.
- [12] Stout JT, Caskey CT. *Annu Rev Genet.* 1985;19:127-148.
- [13] Fontenelle LJ, Henderson JF. *Biochim Biophys Acta.* 1969;177:175-176.
- [14] Holmsen H, Rozenberg MC. *Biochim Biophys Acta.* 1968;157:266-279.
- 10 [15] Lajtha LG, Vane JR. *Nature.* 1958;182:191-192.
- [16] Lowy BA, Ramot B, London IM. *J Biol Chem.* 1960;235:2920-2923.
- [17] Elion GB. *Science.* 1989;244:41-47.
- [18] Ansell JD, Samuel K, Whittingham DG, et al. *Development.* 1991;112:489-498.
- [19] Torres RJ, Puig JG. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:48.
- 15 [20] van der Zee SP, Schretlen ED, Monnens LA. *Lancet.* 1968;1:1427.
- [21] Seegmiller JE, et al.. *Adv Exp Med Biol.* 1977;76A:412-433.
- [22] Porter CC, DeGregori J. *Blood.* 2008;112:4466-4474.
- [23] Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M. *Nature.* 1987;326:292-295.
- [24] Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. *Am J Pathol.* 2006;169:338-346.
- 20 [25] Rondon G, Giral S, Pereira M, et al. *Leuk Lymphoma.* 1997;25:463-467.
- [26] Brazelton TR, Blau HM. *Stem Cells.* 2005;23:1251-1265.
- [27] Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. *Cell.* 2001;105:369-377.
- [28] Olsen NJ, Kovacs WJ. *Immunol Res.* 2001;23:281-288.
- [29] Olsen NJ, Gu X, Kovacs WJ. *J Clin Invest.* 2001;108:1697-1704.
- 25 [30] Kelley WN, Wyngaarden, J.B. en: J.B. Stanbury JBW, et al., ed. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 5th ed. New York: McGraw Hill; 1983. p. 1115-1143.
- [31] Lesch M, Nyhan WL. *Am J Med.* 1964;36:561-570.
- [32] Lo YF, Palmour RM. *Biochem Genet.* 1979;17:737-746.
- [33] Mojas N, Lopes M, Jiricny J. *Genes Dev.* 2007;21:3342-3355.
- 30 [34] An DS, Qin FX, Auyeung VC, et al. *Mol Ther.* 2006;14:494-504.
- [35] Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. *Nature.* 2006;441:537-541.

Ejemplo 2: creación de células deficientes en HPRT

35 El presente ejemplo se refiere a la aplicación traslativa a la terapia génica ex vivo en el contexto autólogo, utilizando tanto vectores lentivíricos de tercera generación que expresan diferentes secuencias candidatas de ARNhp con diana en HPRT, como también la nucleofección de nucleasas de dedo de cinc (ZFN, por sus siglas en inglés) con diana en HPRT. Este último enfoque resulta ventajoso ya que sólo se requiere la expresión transitoria del constructo de ZFN para conseguir una desactivación permanente del gen diana, mitigando de esta manera el potencial de mutagénesis por inserción como resultado del procedimiento de manipulación genética. En el presente contexto, dicha estrategia es única para proporcionar una ventaja selectiva a las células trasplantadas mediante una deficiencia enzimática y no mediante la inserción de un nuevo transgén para conseguir la quimiorresistencia. El ARNhp con diana en HPRT tuvo éxito en la regulación negativa de HPRT hasta niveles indetectables. Además, HPRT ha podido desactivarse con éxito utilizando ZFN.

40

45

La invención no se encuentra limitada excepto por las reivindicaciones adjuntas.

50

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Análogo de base purina para la utilización en un método de trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) sin radiación, en el que el análogo de base purina es la 6-tioguanina (6TG) y en el que el método comprende:
- (a) administrar en un sujeto mamífero una o dos dosis de entre 2 y 10 mg/kg de peso corporal del análogo de base purina a modo de etapa de precondicionamiento,
- 10 (b) injertar HSC del donante en el sujeto deficientes en hipoxantina-guanín fosforibosiltransferasa (HPRT) dentro de las 48 a 72 horas posteriores a la etapa de precondicionamiento, y
- (c) administrar en el sujeto 1 a 5 mg/kg del análogo de base purina cada dos a cuatro días durante dos a ocho semanas después de la etapa de injertación,
- en el que el método se lleva a cabo en ausencia de precondicionamiento mediante radiación.
- 15 2. Análogo de base purina según la reivindicación 1, en el que la dosis total de 6TG administrada en el sujeto mediante la combinación de la etapa (a) y la etapa (c) no excede 105 mg/kg.
3. Análogo de base purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la dosis total de 6TG administrada en el sujeto mediante la combinación de la etapa (a) y la etapa (c) no excede 75 mg/kg.
- 20 4. Análogo de base purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la administración de la etapa (c) se lleva a cabo cada 3 días y durante no más de cuatro semanas después de la etapa de injertación.
- 25 5. Análogo de base purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto muestra más de 75% de células hematopoyéticas modificadas genéticamente.
6. Análogo de base purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto muestra más de 95% de células hematopoyéticas modificadas genéticamente.
- 30 7. Análogo de base purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las HSC deficientes en HPRT que deben trasplantarse se han convertido en deficientes en HPRT mediante la introducción de secuencias codificantes de nucleasas de dedo de cinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador transcripcional (TALEN), cadenas molde de recombinación homóloga de fragmentos pequeños (SFHR), ARN inhibidores (ARNip) o microARN (ARNmi), ARN antisentido, ARN de corte y empalme en trans, ribozimas, anticuerpos intracelulares o proteínas inhibitoras dominantes-negativas o competitivas.
- 35 8. Análogo de base purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las HSC deficientes en HPRT que deben trasplantarse han sido modificadas genéticamente.
- 40 9. Análogo de base purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las HSC trasplantadas son autólogas o singénicas.
- 45 10. Análogo de base purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las HSC trasplantadas son alogénicas.
11. Análogo de base purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto no se somete a tratamiento de radiación mieloablativa.
- 50 12. Análogo de base purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto presenta un trastorno hereditario o genético, una enfermedad adquirida que afecta a las células linfhematopoyéticas o una neoplasia maligna linfhematopoyética.
- 55 13. Análogo de base purina para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es un ser humano.

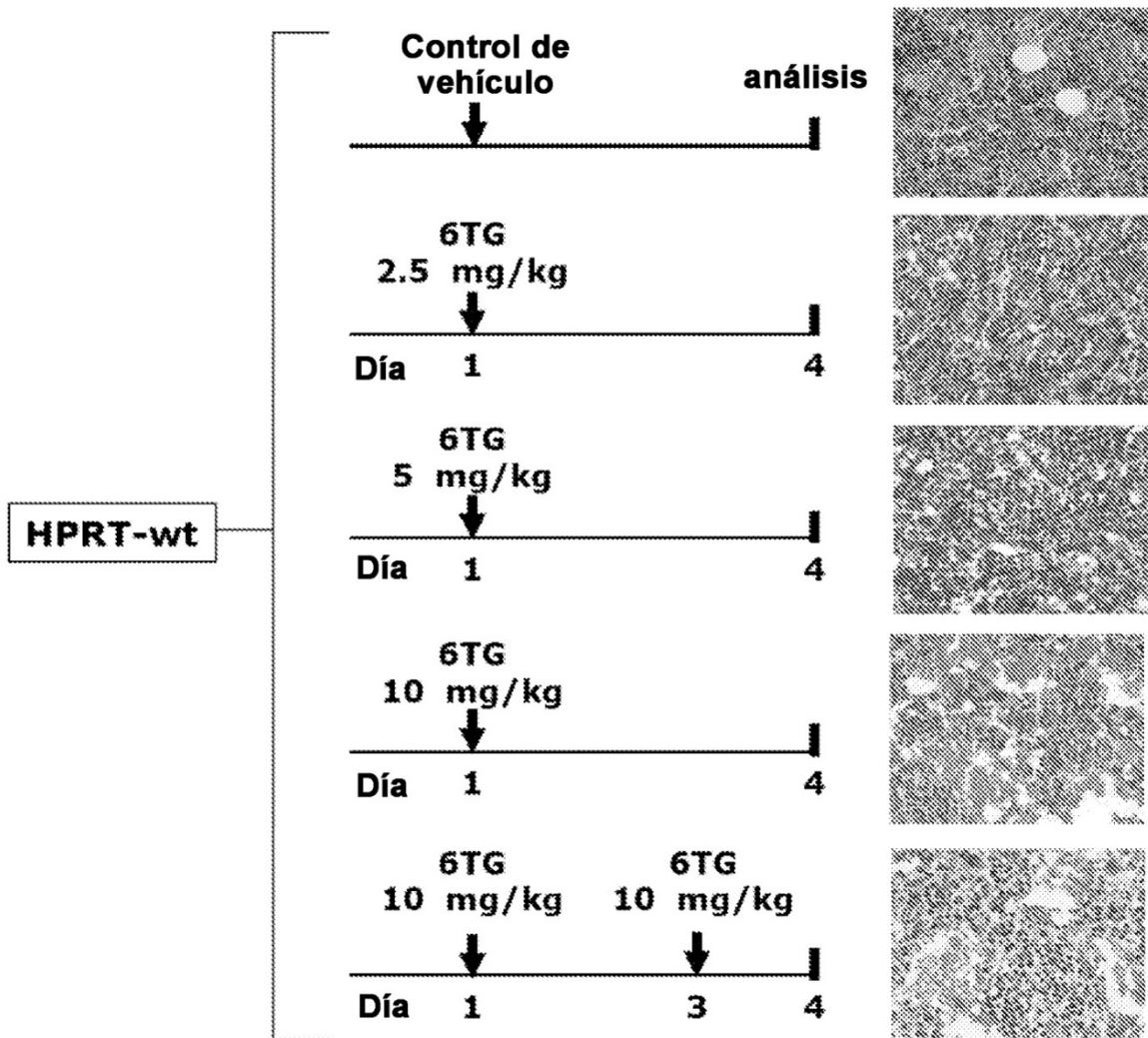


Figura 1A

**HPRT-wt**

---

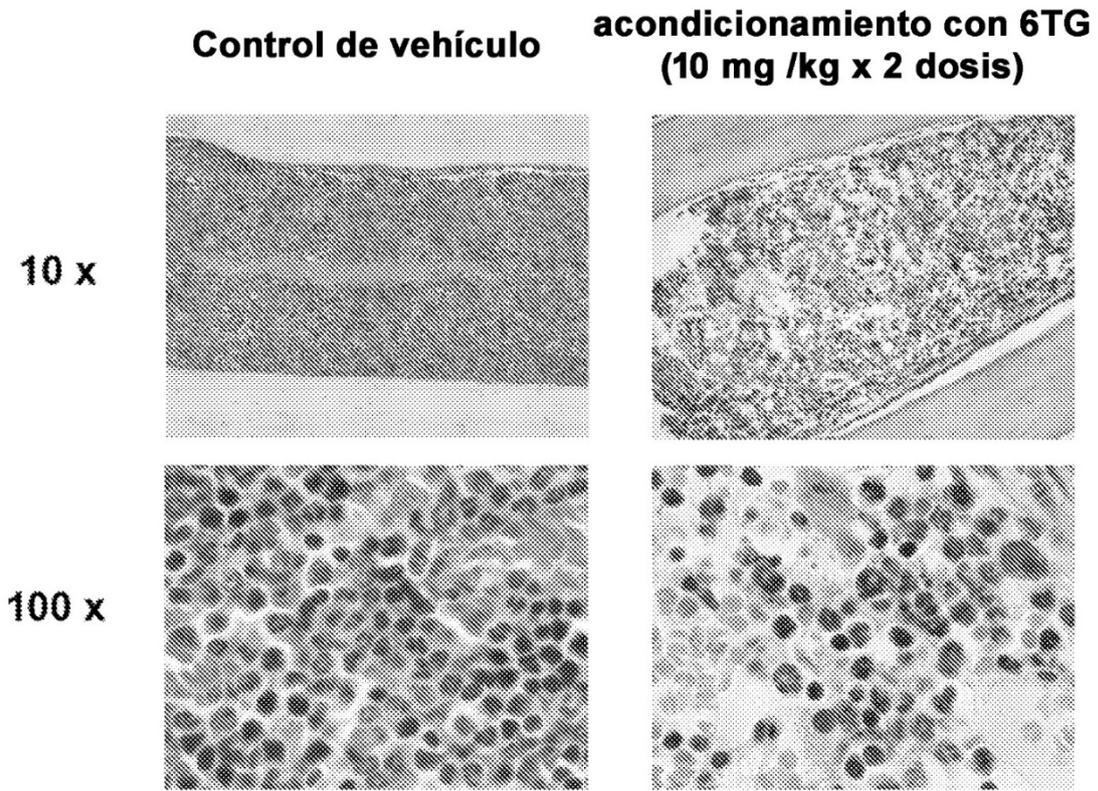
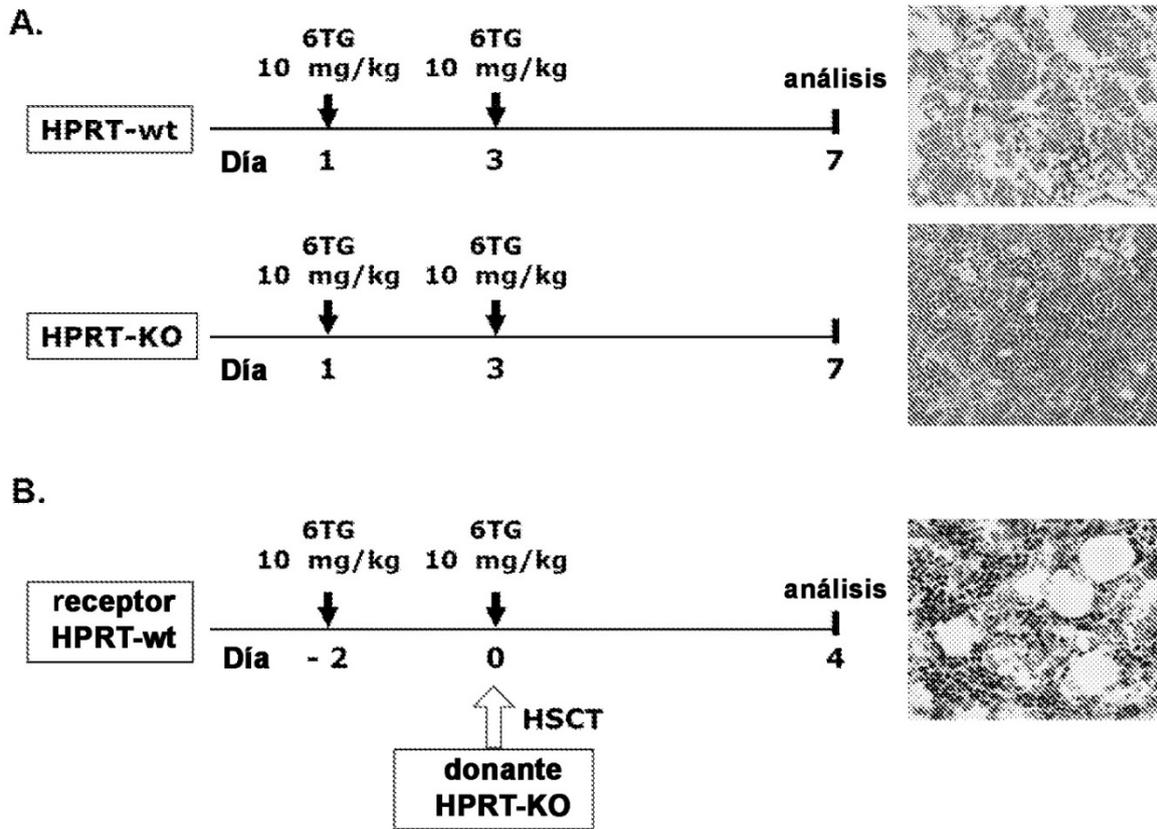


Figura 1B



Figuras 2A-2B

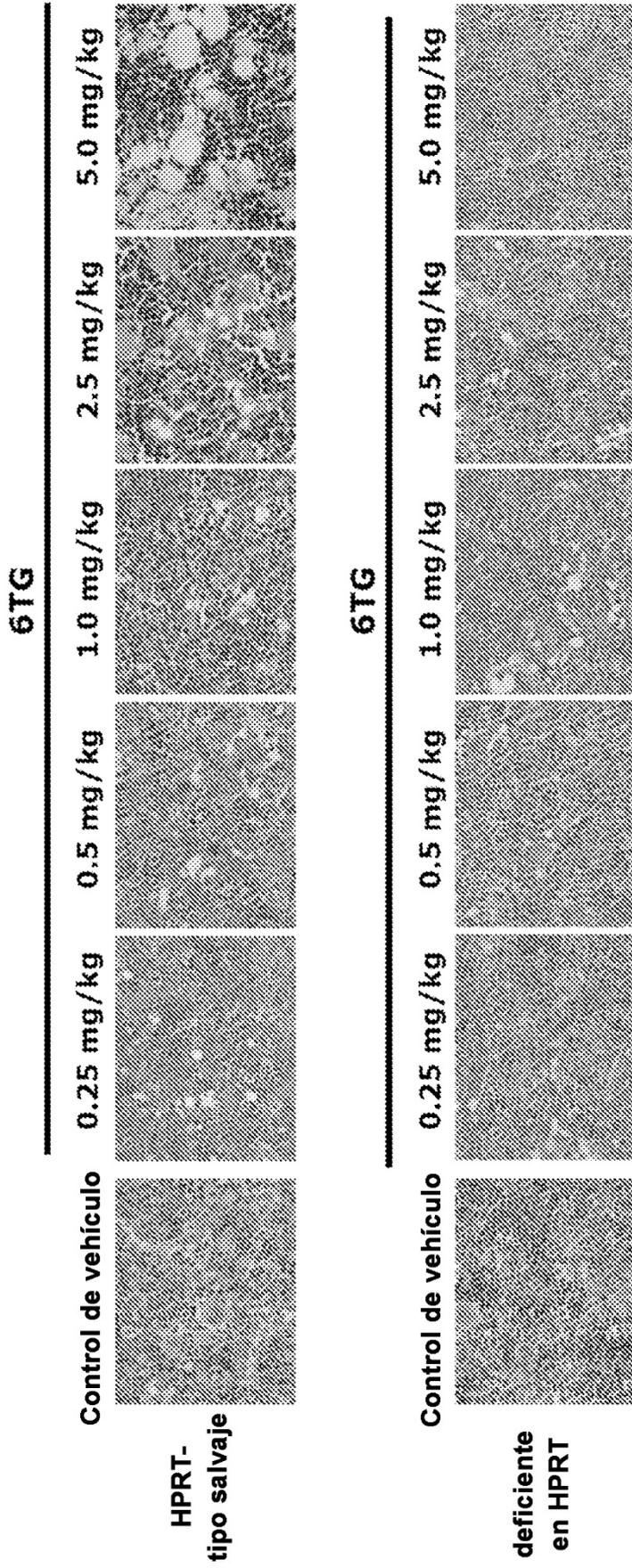
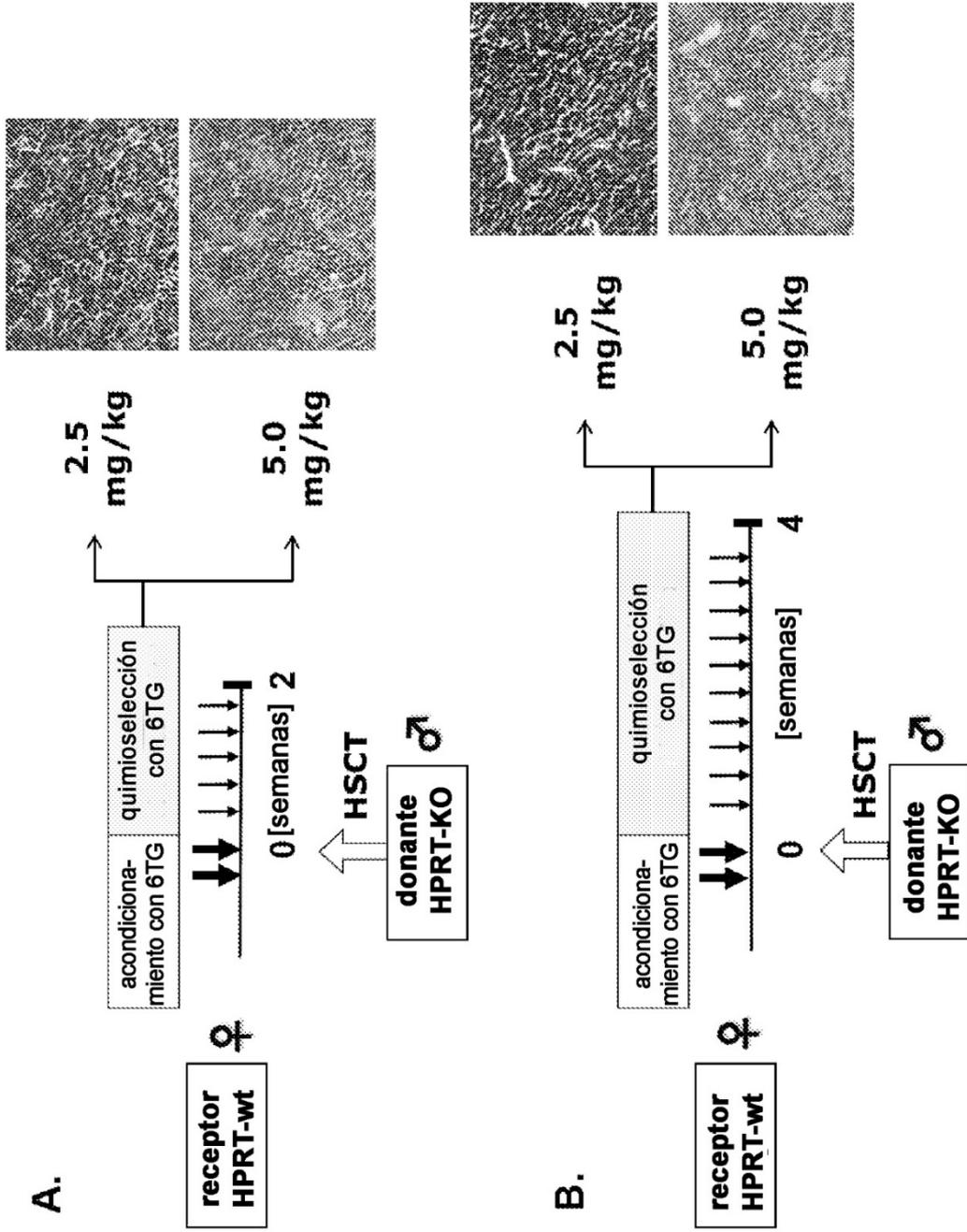


Figura 3



Figuras 4A-4B

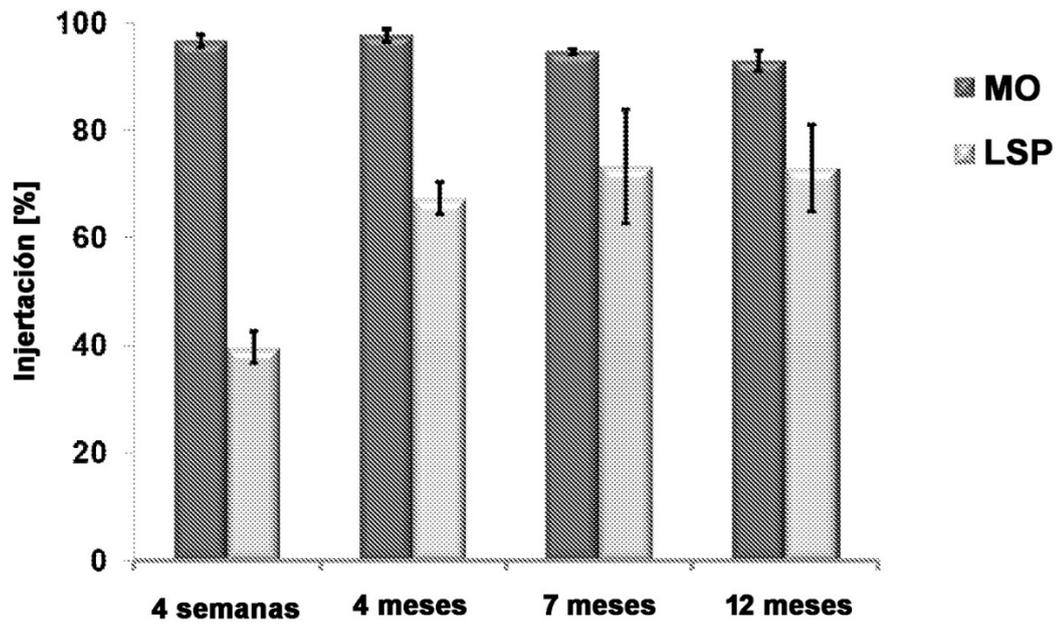


Figura 5