

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 186**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2015 PCT/US2015/027527**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15164750**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2015 E 15783357 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3134130**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar las hemoglobinopatías**

30 Prioridad:

**25.04.2014 US 201461984247 P**  
**21.10.2014 US 201462066783 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.02.2020**

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION**  
**(100.0%)**  
**55 Shattuck Street**  
**Boston, MA 02115 , US**

72 Inventor/es:

**MILSOM, MICHAEL;**  
**WILLIAMS, DAVID A. y**  
**GREGORY, RICHARD**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 744 186 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

Composiciones y métodos para tratar las hemoglobinopatías

Campo técnico

5 Las realizaciones divulgadas en el presente documento se refieren a composiciones y composiciones para uso en el tratamiento de hemoglobinopatías. Más particularmente, las realizaciones se refieren a composiciones y métodos para aumentar la hemoglobina fetal en una célula mediante anulación selectiva del BCL11A endógeno.

Antecedentes

10 Las hemoglobinopatías, incluidas la enfermedad/anemia de célula falciforme (SCD) y la talasemia (THAL), son los trastornos monogénicos hereditarios más prevalentes en el ser humano. Aproximadamente el 5% de la población mundial porta una mutación del gen de la globina. La Organización Mundial de la Salud estima que cada año alrededor de 300,000 bebés nacen con trastornos importantes de la hemoglobina. SCD se ha segregado a poblaciones de África subsahariana, India, Arabia Saudita y países mediterráneos, donde hasta el 2% de todos los niños nacen con la condición, debido a la ventaja de supervivencia contra la transmisión de la malaria conferida por una mutación de  $\beta$ -globina falciforme heterocigótica ( $\beta^S$ ) (Informe de la OMS sobre la anemia de células falciformes - A59.9. 15 Quincuagésima novena Asamblea Mundial de la Salud - Punto 114 del orden del día provisional: Naciones Unidas; 2006: 1-5). Debido a la migración histórica y/o reciente, ahora se puede encontrar un número cada vez mayor de poblaciones de pacientes en los países desarrollados, y las implicaciones de SCD para la salud pública son significativas (Kauf et al., American Journal of Hematology. 2009; 84: 323-327; Amendah et al., American Journal of Preventive Medicine. 2010; 38: S550-556). En los Estados Unidos de América, la supervivencia media de los pacientes que tienen una hemoglobinopatía se estimó en 1994 en 42 años para los hombres y 48 años para las mujeres (Platt et al., New England Journal of Medicine. 1994; 330: 1639-1644). A nivel molecular, la SCD fue la primera enfermedad que se relacionó con una alteración molecular (Pauling et al., Science. 1949; 110: 543-548). Una mutación de un solo nucleótido da como resultado la sustitución de ácido glutámico a valina en la posición 6 de la proteína  $\beta$ -globina. Esta modificación da como resultado la polimerización de la molécula en condiciones desoxigenadas, y la subsecuente "falcitis" del eritrocito que finalmente conduce a la anemia por hemólisis y complicaciones vasooclusivas e isquémicas agudas y crónicas que afectan múltiples órganos, incluidos los riñones, el cerebro, los pulmones y otros. ) Aunque las medidas preventivas (incluido el agente quimioprolifático hidroxiurea) han llevado a una reducción moderada de la carga de grupos de pacientes seleccionados, en la actualidad, la única terapia curativa disponible para SCD es el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT) (Hsieh et al., Nueva Inglaterra Journal of Medicine. 2009; 361: 2309-2317; Hsieh et al., Blood; Pre-publicación electrónica el 31 de junio de 2011). El HSCT se ha asociado desafortunadamente en el contexto de SCD y THAL con una mortalidad y morbilidad significativas, que se debe en parte a la sobrecarga de hierro relacionada con la transfusión previa al HSCT, la enfermedad de injerto contra huésped y las altas dosis de quimioterapia/radiación requeridas para acondicionamiento de trasplante del huésped, entre otros.

35 Se están desarrollando nuevas terapias moleculares. Por ejemplo, la Patente de U.S. No.: 8,383,604 describe que el BCL11A es un regulador clave de los genes de la globina durante el desarrollo. En particular, BCL11A promueve el cambio transicional de la expresión de genes de hemoglobina fetal a la expresión de genes de hemoglobina adulta durante el desarrollo fetal. La supresión de BCL11A reduce este cambio transicional y mantiene una expresión significativamente mayor de los genes de hemoglobina fetal después del desarrollo fetal. La mayor cantidad de genes de hemoglobina fetal expresados mejora los síntomas asociados con diversas hemoglobinopatías.

Resumen

45 En realizaciones ilustrativas particulares, la presente invención proporciona, en parte, composiciones y métodos mejorados para lograr la terapia génica en células hematopoyéticas y células precursoras hematopoyéticas, que incluyen eritrocitos, progenitores eritroides y células madre embrionarias. La invención proporciona además composiciones para uso en métodos mejorados de terapia génica para tratar trastornos relacionados con hematopoyéticos.

50 El objetivo es anular eficientemente BCL11A en células derivadas de células madre hematopoyéticas transducidas e injertables. El éxito en la inducción de  $\gamma$ -globina y, por lo tanto, el aumento simultáneo de HbF y la reducción de HbS mutante dependen de la reducción cuantitativa del transcrito de BCL11A y la proteína. Los inventores han embebido un ARNsh de BCL11A en un bucle mir223. Esta metodología permite que el ARNsh de BCL11A se transcriba a través de promotores de polimerasa II (PolII) en lugar de los promotores de polimerasa III. Esto permite la explotación de la ruta de microARN-biogénesis para generar ARNip que se dirigen a la expresión de BCL11A en las HSC injertables. Los transgenes lentivirales están diseñados para expresar ARNsh que imitan microARN primarios (pri-miARN) y son procesados secuencialmente por los complejos de microprocesador endógeno y Dicer para generar ARN de interferencia corta (ARNip) con complementariedad de secuencia al ARN mensajero BCL11A (ARNm).

55 En un aspecto, se proporcionan composiciones y métodos que anulan eficientemente BCL11A en células derivadas de células madre hematopoyéticas injertables transducidas. En una realización, una reducción cuantitativa del transcrito de BCL11A y la proteína induce la producción de  $\gamma$ -globina y, por lo tanto, un aumento simultáneo de HbF y

una reducción de HbS mutante. En una realización particular, un ARNsh de BCL11A está embebido en un bucle mir223. En realizaciones particulares, un lentivirus está diseñado para expresar ARNsh que simulan pri-miARNs que son procesados secuencialmente por el microprocesador endógeno y los complejos de Dicer para generar ARNip con secuencia complementaria al ARNm de BCL11A.

5 Por consiguiente, en diversas realizaciones ilustrativas, la presente especificación proporciona, en parte, un microARN de BCL11A sintético que comprende un primer segmento de BCL11A, un segmento de bucle y un segundo segmento de BCL11A dispuesto en tándem en una dirección de 5' a 3', en donde el segmento de bucle está entre y directamente vinculado al primer y segundo segmentos BCL11A, y en donde el segundo segmento de BCL11A es complementario al primer segmento de BCL11A de tal manera que el primer y el segundo par de segmentos BCL11A forman un bucle de horquilla con el segmento de bucle que forma la porción de bucle del bucle de horquilla así formado; y el primer segmento de BCL11A comienza con un -GCGC- en el extremo 5' y el segundo segmento de BCL11A termina con un -GCGC- en el extremo 3'.

15 En una realización de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el primer y el segundo segmento de BCL11A tienen una longitud de aproximadamente 18 a 25 nucleótidos. El primer segmento de BCL11A se deriva de una secuencia BCL11A y da lugar a la cadena pasajera durante el procesamiento de ARNsh a un ARNip dúplex y el segundo segmento de BCL11A es complementario al primer segmento de BCL11A, en donde el segundo segmento de BCL11A da lugar a la cadena guía que se incorpora en el Complejo de Especificidad de Interferencia de ARN (RISC) para interferencia de ARN o silenciamiento de gen BCL11A.

20 En una realización de uno cualquiera de los microARN sintéticos de BCL11A descritos aquí, el primer y segundo segmento de BCL11A contienen secuencias que se derivan de la secuencia de ARNm de BCL11A.

En el microARN de BCL11A sintético descrito aquí, el primer segmento de BCL11A comienza con un -GCGC- en el extremo 5' y el segundo segmento de BCL11A termina con un -GCGC- en el extremo 3'.

En el microARN de BCL11A sintético descrito aquí, el primer segmento de BCL11A consiste además en un -GCGC- en el extremo 5' y el segundo segmento de BCL11A termina con un -GCGC- en el extremo 3'.

25 En algunas disposiciones previstas del microARN de BCL11A sintético descrito aquí, el primer segmento de BCL11A comienza con un -GCGA-, -TCTG-, o -TG- en el extremo 5' y el segundo segmento de BCL11A es complementario al primer segmento de BCL11A.

En algunas disposiciones previstas del microARN de BCL11A sintético descrito aquí, el primer segmento de BCL11A consiste además en un -GCGA-, -TCTG- o -TG- en el extremo 5'.

30 En algunas disposiciones previstas de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el segundo segmento de BCL11A termina con un -TTTT- en el extremo 3'.

En el microARN de BCL11A sintético descrito en este documento, el microARN de BCL11A sintético comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42.

35 En una realización de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el microARN de BCL11A sintético comprende una secuencia de nucleótidos o un segmento a partir de los mismos descritos en esta divulgación.

En una realización de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el microARN de BCL11A sintético consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42.

40 En una realización de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el microARN de BCL11A sintético consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42.

45 En una realización de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el primer segmento de BCL11A se selecciona del grupo que consiste en ggcCGCACAGAACAACATG (SEQ. ID. NO: 57; derivado del oligo miR1G5 descrito aquí), GCGCTCGGAGACTCCAGACAA (SEQ. ID. NO: 58; derivado de E3G5 o E3 mod oligo o ARNsh1mod descrito aquí), ggcCCTCCAGGCAGCTCAAA (SEQ. ID. NO: 59; derivado de B5G5 o ARNsh2mod descrito aquí); ggcTCAGGACTAGGTGCAGA (SEQ. ID. NO: 60; derivado de B11G5 o ARNshmod descrito aquí);

ggcGATCGAGTGTGAATAA (SEQ. ID. NO: 61; derivado de 50D12G5, D12G4 o ARNsh5mod descrito aquí); ggcCAGTACCCTGGAGAAAC (SEQ. ID. NO: 62; derivado de 50A5G5 o ARNsh6mod descrito aquí); ggcCACTGTCCACAGGAGAA (SEQ. ID. NO: 63; derivado de 50B11G5 o ARNsh7mod descrito aquí);

50 GCGCTTCTCTTGCAACACGCA (SEQ. ID. NO: 64; derivado de BCL11A D8G5 o D8 mod o ARNsh3mod descrito aquí), y GCGCACAGTACCCTGGAGAAA (SEQ. ID. NO: 65; derivado de BCL11A C4G5, o C4 mod o ARNsh8mod descrito aquí).

En una realización de cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el segmento de bucle se deriva de un microARN. En una realización, el microARN es un microARN específico hematopoyético. Por ejemplo, miR-142, miR-155, miR-181 y miR-223.

En una realización de uno cualquiera de los microARN sintéticos de BCL11A descritos aquí, el microARN es miR223.

- 5 En una realización de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el segmento de bucle es ctccatgtgtagag (SEQ ID NO: 68).

Por consiguiente, en un aspecto, la presente especificación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

- 10 Por consiguiente, en un aspecto, la presente especificación proporciona una composición que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente especificación proporciona una composición que comprende al menos un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

- 15

En una realización de cualquier molécula de ácido nucleico aislada descrita, la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:34.

En una realización de cualquier molécula de ácido nucleico aislada descrita, la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:35.

- 20 En una realización de cualquier molécula de ácido nucleico aislada descrita, la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:36.

En una realización de cualquier molécula de ácido nucleico aislada descrita, la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:37.

- 25 En una realización de cualquier molécula de ácido nucleico aislada descrita, la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:38.

En una realización de cualquier molécula de ácido nucleico aislada descrita, la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:39.

En una realización de cualquier molécula de ácido nucleico aislada descrita, la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:40.

- 30 En una realización de cualquier molécula de ácido nucleico aislada descrita, la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:41.

En una realización de cualquier molécula de ácido nucleico aislada descrita, la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:42.

- 35 En un aspecto, la presente especificación proporciona un vector que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42 o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

En una realización de cualquier vector descrito, el vector comprende además un promotor de virus formador de foco en el bazo, un promotor inducible por tetraciclina o una región de control de locus de  $\beta$ -globina y un promotor de  $\beta$ -globina. El promotor proporciona la expresión dirigida de la molécula de ácido nucleico en el mismo o el microARN de BCL11A sintético en el mismo.

- 40

En un aspecto, la presente especificación proporciona una célula huésped que comprende un vector que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

- 45 En una realización de cualquier célula huésped descrita aquí, la célula huésped es una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética. En una realización, la célula huésped se aísla de un sujeto. En una realización, la célula huésped se aísla de un sujeto que ha sido diagnosticado con una hemoglobinopatía. El diagnóstico puede hacerse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, mediante pruebas genéticas, por RT-PCR y por citología sanguínea.

- 50 En una realización de cualquier célula huésped descrita aquí, la célula huésped es un eritrocito.

En un aspecto, la presente especificación proporciona una célula huésped que comprende un vector o una bacteria que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

5 En un aspecto, la presente especificación proporciona una célula huésped que comprende un virus que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

En una realización de cualquier virus o vector descrito aquí, el virus es un lentivirus.

10 En una realización de cualquier vector o virus descrito aquí, el lentivirus se selecciona del grupo que consiste en: virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), virus de encefalitis por artritis caprina (CAEV), virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV).

15 Por consiguiente, un aspecto de la presente especificación proporciona métodos para aumentar los niveles de hemoglobina fetal expresados por una célula, que comprende las etapas de poner en contacto una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética, o una célula progenitora hematopoyética con una cantidad efectiva de una composición descrita aquí o una cantidad efectiva de al menos una molécula de ácido nucleico aislada descrita aquí, por lo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en la célula, o su progenie, en relación con la célula antes de tal contacto. En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un vector o célula que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí. En una realización, el método comprende además proporcionar una muestra de células madre o células progenitoras para el contacto. En una realización, la muestra de células comprende células CD34+ seleccionadas. En una realización, la composición comprende una mezcla de las secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42. Por ejemplo, la composición tiene 2-5 secuencias de nucleótidos diferentes seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 25 34-42. Por ejemplo, la composición comprende las SEQ ID NOS: 34, 37, 39 y 41.

En un aspecto, la presente especificación proporciona composiciones para su uso en métodos de tratamiento o reducción del riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía, por ejemplo, SCD y THAL, en un sujeto. Los métodos pueden incluir la anulación selectiva del gen BCL11A en las células madre hematopoyéticas de sujetos o individuos. Estos sujetos corren el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía.

30 En una realización de cualquier método descrito, la anulación selectiva del gen BCL11A en las células madre hematopoyéticas comprende usar una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 34-42 o usar un vector (por ejemplo, un vector viral) que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una cualquiera de la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

35 En una realización de cualquier método descrito, la anulación selectiva del gen BCL11A en las células madre hematopoyéticas comprende poner en contacto las células madre hematopoyéticas con una composición que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 34-42, o con una composición que comprende al menos un vector (por ejemplo, un vector viral) que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende cualquiera de la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 40 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí. En una realización, las células madre hematopoyéticas se aíslan antes del contacto.

En una realización de cualquier método descrito, la anulación selectiva del gen BCL11A en las células madre hematopoyéticas se produce in vivo, in vitro o ex vivo. En una realización adicional, la célula progenitora hematopoyética a la que se dirige la anulación selectiva es del linaje eritroide.

45 En una realización de cualquier método descrito, el poner en contacto las células madre hematopoyéticas con cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento se produce in vivo, in vitro o ex vivo. En una realización adicional, la célula progenitora hematopoyética que se pone en contacto es del linaje eritroide.

En una realización de cualquier método descrito, el poner en contacto las células madre hematopoyéticas con cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento se produce in vivo, in vitro o ex vivo.

50 En otras realizaciones de cualquier método descrito, la anulación selectiva del gen BCL11A ocurre en una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea además de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética. En una realización, una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora o una célula de médula ósea se pone en contacto con la composición descrita. La célula madre embrionaria, la célula madre somática, la célula progenitora o la célula de médula ósea se aíslan antes del contacto. En una realización, el poner en contacto la célula madre embrionaria, la célula madre somática, la célula progenitora o la célula de médula ósea con cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento se produce in vivo, in vitro o ex vivo.

En otras realizaciones de cualquier método descrito, las células madre hematopoyéticas se recolectan de sangre periférica, sangre del cordón umbilical, vellosidades coriónicas, líquido amniótico, sangre placentaria o médula ósea.

5 En otras realizaciones de cualquier método descrito, las células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras o células de médula ósea se recolectan de sangre periférica, sangre del cordón umbilical, vellosidades coriónicas, líquido amniótico, sangre placentaria o médula ósea.

10 En un aspecto, la presente especificación proporciona composiciones para uso en un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, comprendiendo el método: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más moléculas de ácido nucleico aisladas descrito aquí, un virus o un vector descrito aquí, o una célula descrita aquí, tratando así, o reduciendo el riesgo de desarrollar la hemoglobinopatía en el sujeto, en donde el virus, el vector o la célula comprende al menos una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí. Por ejemplo, la cantidad efectiva de una o más moléculas de ácido nucleico aisladas descritas aquí, un virus o un vector descrito aquí, o una célula descrita aquí se inyectan directamente en la médula ósea del sujeto.

15 En un aspecto, la presente especificación proporciona composiciones para uso en un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una población de células madre hematopoyéticas in vitro o ex vivo con una composición descrita en este documento o con al menos una o más moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en la presente memoria, un virus o un vector descrito en la presente memoria, e implantar o administrar las células madre hematopoyéticas en contacto o las células de la progenie del mismo al sujeto. En una realización, las células madre hematopoyéticas en contacto o las células de la progenie se injertan en el sujeto. En una realización, las células madre hematopoyéticas en contacto o las células de la progenie de las mismas se implantan con prostaglandina E2 y/o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) para promover los injertos de las células en contacto.

20 En un aspecto, la presente especificación proporciona composiciones para uso en un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, comprendiendo el método expresar al menos un microARN de BCL11A sintético descrito aquí en una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética del sujeto en donde la expresión es ex vivo o in vitro, e implantar o administrar la célula en el sujeto.

25 En un aspecto, la presente especificación proporciona un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal expresados por una célula, así como composiciones para uso en tal método; comprendiendo el método expresar al menos un microARN de BCL11A sintético descrito aquí en una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética de un sujeto en donde la expresión es ex vivo o in vitro o in vivo. En una realización, la expresión es poner en contacto las células con una cantidad efectiva de una composición descrita aquí o una cantidad efectiva de al menos una molécula de ácido nucleico aislada descrita aquí.

30 En un aspecto, la presente especificación proporciona un método para disminuir los niveles de BCL11A expresados por una célula, así como composiciones para uso en tal método; comprendiendo el método expresar al menos un microARN de BCL11A sintético descrito aquí en una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética de un sujeto en donde la expresión es ex vivo o in vitro o in vivo. En una realización, la expresión comprende las etapas de poner en contacto una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética con una cantidad efectiva de una composición descrita en este documento o una cantidad efectiva de al menos una molécula de ácido nucleico aislada descrita en este documento, por lo que la expresión de hemoglobina fetal aumenta en la célula, o su progenie, en relación con la célula antes de dicho contacto. En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un vector o célula que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-10, 13-18, 25-44, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

35 En una realización adicional de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la célula madre hematopoyética o la célula progenitora hematopoyética en contacto es del linaje eritroide.

En una realización de cualquiera de los métodos descritos aquí, la célula madre hematopoyética o la célula progenitora hematopoyética se recolecta de sangre periférica, sangre del cordón umbilical, vellosidades coriónicas, líquido amniótico, sangre placentaria o médula ósea.

40 En una realización adicional de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el sujeto receptor se trata con quimioterapia y/o radiación antes de la implantación de las células contactadas o transfectadas.

45 En una realización, la quimioterapia y/o radiación es para reducir las células madre endógenas para facilitar el injerto de las células implantadas.

- 5 En un aspecto, la presente especificación proporciona composiciones para uso en un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, comprendiendo el método proporcionar células madre hematopoyéticas del sujeto, poner en contacto las células madre hematopoyéticas in vitro o ex vivo con una composición descrita en el presente documento o con al menos una o más moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en el presente documento, un virus o un vector descrito en el presente documento, e implantar o volver a administrar las células madre hematopoyéticas en contacto de nuevo en el mismo sujeto. En una realización, las células madre hematopoyéticas en contacto o las células de la proge nie se injertan en el sujeto.
- 10 En un aspecto de cualquier método, las células madre hematopoyéticas en contacto, las células madre embrionarias, las células madre somáticas, las células progenitoras, las células de la médula ósea o las células de la proge nie de las mismas se tratan ex vivo con prostaglandina E2 y/o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) para promover el injerto subsecuente en un sujeto receptor.
- 15 En un aspecto de cualquier método, la población de células madre hematopoyéticas o células huésped se obtiene de un sujeto en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía o se le ha diagnosticado una hemoglobinopatía.
- En un aspecto de cualquier método, la población de células madre hematopoyéticas es autóloga o alogénica para el sujeto.
- En un aspecto de cualquier método, la población de células madre hematopoyéticas o células huésped se expande ex vivo en cultivo antes de poner en contacto con una composición descrita aquí o con al menos una o más moléculas de ácido nucleico aisladas descritas aquí, un virus o un vector descrito aquí.
- 20 En un aspecto de cualquier método, la población de células madre hematopoyéticas o células huésped se expande ex vivo en cultivo después del contacto con una composición descrita en el presente documento o con al menos una o más moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en el presente documento, un virus o un vector descrito aquí.
- En un aspecto de cualquier método, la población contactada de células madre hematopoyéticas o células huésped se diferencia previamente en vivo en cultivo antes de implantarse en un sujeto.
- 25 En un aspecto de cualquier método, las células madre hematopoyéticas en contacto se expanden in vitro o ex vivo antes de administrarlas al sujeto. En un aspecto de cualquier método, las células madre hematopoyéticas en contacto se criopreservan antes de administrarlas al sujeto. En otro aspecto de cualquier método, las células madre hematopoyéticas en contacto se expanden in vitro o ex vivo y se criopreservan antes de administrarlas al sujeto. En otro aspecto de cualquier método, las células madre hematopoyéticas en contacto se expanden in vitro o ex vivo después de la criopreservación antes de administrarlas al sujeto.
- 30 En un aspecto de cualquier método, el sujeto es un humano. En un aspecto de cualquier método, el sujeto es diagnosticado con una hemoglobinopatía.
- En un aspecto de cualquier método, el método comprende además seleccionar un sujeto diagnosticado con una hemoglobinopatía o un sujeto en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía.
- 35 En un aspecto de cualquier método, la hemoglobinopatía es la enfermedad de células falciformes (SCD) o la talasemia (THAL). Por ejemplo,  $\beta$ -talasemias.
- En un aspecto del método, el método comprende además administrar al sujeto una terapia que comprende oxígeno, hidroxiurea, ácido fólico o una transfusión de sangre.
- 40 En un aspecto, la presente especificación proporciona un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, comprendiendo el método expresar in vivo al menos un microARN de BCL11A sintético descrito aquí en el sujeto.
- En un aspecto de cualquier método, la expresión in vivo se produce en una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.
- 45 En un aspecto de cualquier método, las células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de médula ósea, células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas son autólogas o alogénicas para el sujeto.
- En un aspecto de cualquier método, las células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de médula ósea, células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas que expresan al menos un microARN de BCL11A sintético descrito aquí se expanden in vitro o ex vivo antes de administrarlos al sujeto.
- 50 En una realización adicional, la célula progenitora, la célula de médula ósea, la célula madre hematopoyética y la célula progenitora hematopoyética son del linaje eritroide.
- En un aspecto de cualquier método, las células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de médula ósea, células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas que expresan al

menos un microARN de BCL11A sintético descrito en el presente documento se crioconservan antes de su administración al sujeto.

5 En otro aspecto de cualquier método, las células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de médula ósea, células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas que expresan al menos un microARN de BCL11A sintético descrito aquí se expanden in vitro o ex vivo y se crioconservan antes de su administración al sujeto.

10 En otro aspecto de cualquier método, las células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de médula ósea, células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas que expresan al menos un microARN de BCL11A sintético descrito aquí se expanden in vitro o ex vivo después de la crioconservación antes de su administración al sujeto.

En un aspecto de cualquier método, el al menos un microARN de BCL11A sintético se enlaza operativamente a un promotor y se construye en un vector para la expresión en una célula eucariota.

En un aspecto de cualquier método, el al menos un microARN de BCL11A sintético se expresa a partir de una ARN polimerasa II.

15 En un aspecto de cualquier método, el al menos un microARN de BCL11A sintético no se expresa a partir de una ARN polimerasa III.

En un aspecto de cualquier método, el promotor se selecciona de un grupo que consiste en un promotor de virus formador de foco en el bazo, un promotor inducible por tetraciclina, o una región de control de locus de  $\beta$ -globina y un promotor de  $\beta$ -globina, o un promotor específico hematopoyético.

20 En un aspecto de cualquier método, el vector es un virus.

En un aspecto de cualquier método, el virus es un lentivirus.

25 En un aspecto de cualquier método, el lentivirus se selecciona del grupo que consiste en: virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), virus de encefalitis por artritis caprina (CAEV), infeccioso equino virus de anemia (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV).

En un aspecto de cualquier método, el sujeto es un animal, humano o no humano, y roedor o no roedor. Por ejemplo, el sujeto puede ser cualquier mamífero, por ejemplo, un humano, otro primate, cerdo, roedor tal como ratón o rata, conejo, cobaya, hámster, vaca, caballo, gato, perro, oveja o cabra, o un animal no mamífero tal como un pájaro.

30 En un aspecto de cualquier método, el método comprende obtener una muestra o una población de células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de médula ósea, células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas del sujeto.

35 En una realización, las células madre embrionarias, las células madre somáticas, las células progenitoras, las células de la médula ósea, las células madre hematopoyéticas, las células progenitoras hematopoyéticas se aíslan del sujeto huésped, se transfectan, se cultivan (opcional) y se trasplantan nuevamente al mismo huésped, es decir, un trasplante de células autólogas. En otra realización, las células madre embrionarias, las células madre somáticas, las células progenitoras, las células de la médula ósea, las células madre hematopoyéticas o las células progenitoras hematopoyéticas se aíslan de un donante que es una coincidencia de tipo HLA con un huésped (receptor) al que se le diagnostica con, o en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía. La coincidencia de tipos de antígeno donante-receptor es bien conocida en la técnica. Los tipos HLA incluyen HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-D. Estos representan el número mínimo de coincidencia de antígeno de superficie celular requerido para el trasplante. Es decir, las células transfectadas se trasplantan a un huésped diferente, es decir, alogénico para el sujeto huésped receptor. Las células madre embrionarias del donante o del sujeto, las células madre somáticas, las células progenitoras, las células de la médula ósea, las células madre hematopoyéticas o las células progenitoras hematopoyéticas se pueden transfectar con un vector o ácido nucleico que comprende la molécula de ácido nucleico descrita aquí, las células transfectadas se expanden en cultivo, y luego se trasplantan al sujeto huésped. En una realización, las células trasplantadas se injertan en el sujeto huésped. Las células transfectadas también pueden crioconservarse después de transfectarse y almacenarse, o crioconservarse después de la expansión celular y almacenarse.

45 Como se usa en este documento, tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto significa mejorar al menos un síntoma de hemoglobinopatía. En un aspecto, la invención presenta composiciones para uso en métodos de tratamiento, por ejemplo, reducir la gravedad o la progresión de una hemoglobinopatía en un sujeto. En otro aspecto, las composiciones para uso en los métodos descritos también se pueden usar para reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, retrasar la aparición de síntomas de una hemoglobinopatía en un sujeto o aumentar la longevidad de un sujeto que tiene una hemoglobinopatía. En un aspecto, los métodos pueden incluir seleccionar un sujeto sobre la base de que tienen o corren el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía, pero aún no tienen una hemoglobinopatía o un sujeto con una hemoglobinopatía subyacente. La selección de un sujeto



puede incluir la detección de síntomas de una hemoglobinopatía, un análisis de sangre, pruebas genéticas o registros clínicos. Si los resultados de las pruebas indican que el sujeto tiene una hemoglobinopatía, los métodos también incluyen la administración de las composiciones descritas en este documento, tratando o reduciendo el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en el sujeto. Por ejemplo, un sujeto que es diagnóstico de SCD con genotipo HbSS, talasemia HbS/β0, HbSD o HbSO, y/o HbF <10% por electroforesis.

Como se usa en el presente documento, el término "hemoglobinopatía" se refiere a una condición que implica la presencia de una molécula de hemoglobina anormal en la sangre. Ejemplos de hemoglobinopatías incluyen, pero no se limitan a, SCD y THAL. También se incluyen hemoglobinopatías en las que hay una combinación de hemoglobinas anormales en la sangre (por ejemplo, enfermedad de células falciformes/Hb-C). Un ejemplo ejemplar de tal enfermedad incluye, pero no se limita a, SCD y THAL. SCD y THAL y sus síntomas son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle a continuación. Los sujetos pueden ser diagnosticados por tener una hemoglobinopatía por un proveedor de atención médica, cuidador médico, médico, enfermera, miembro de la familia o conocido, que reconoce, aprecia, reconoce, determina, concluye, opina o decide que el sujeto tiene una hemoglobinopatía.

El término "SCD" se define en el presente documento para incluir cualquier condición anémica sintomática la cual resulta de la formación falciforme de glóbulos rojos. Las manifestaciones de SCD incluyen: anemia; dolor; y/o disfunción orgánica, tal como insuficiencia renal, retinopatía, síndrome torácico agudo, isquemia, priapismo y apoplejía. Como se usa en el presente documento, el término "SCD" se refiere a una variedad de problemas clínicos relacionados con SCD, especialmente en aquellos sujetos que son homocigotos para la sustitución de células falciformes en HbS. Entre las manifestaciones constitucionales a las que se hace referencia en el presente documento mediante el uso del término SCD se encuentran el retraso del crecimiento y el desarrollo, una mayor tendencia a desarrollar infecciones graves, particularmente debido a neumococo, deterioro marcado de la función esplénica, prevención de la anulación efectiva de bacterias circulantes, con infartos recurrentes y eventual destrucción del tejido esplénico. También se incluyen en el término "SCD" los episodios agudos de dolor musculoesquelético, que afectan principalmente a la columna lumbar, el abdomen y el eje femoral, y que tienen un mecanismo y una gravedad similares. En los adultos, estos ataques se manifiestan comúnmente como episodios leves o moderados de corta duración cada pocas semanas o meses intercalados con ataques agonizantes que duran de 5 a 7 días y que ocurren en promedio una vez al año. Entre los eventos conocidos que desencadenan tales crisis se encuentran la acidosis, la hipoxia y la deshidratación, los cuales potencian la polimerización intracelular de HbS (JH Jandl, Blood: Textbook of Hematology, 2nd Ed., Little, Brown and Company, Boston, 1996, páginas 544- 545)

Como se usa en este documento, "THAL" se refiere a un trastorno hereditario caracterizado por una producción defectuosa de hemoglobina. En una realización, el término abarca las anemias hereditarias que se producen debido a mutaciones que afectan la síntesis de hemoglobinas. En otras realizaciones, el término incluye cualquier anemia sintomática resultante de condiciones talasémicas tales como talasemia severa o β, talasemia mayor, talasemia intermedia, α-talasemias tales como enfermedad de hemoglobina H. Las β-talasemias son causadas por una mutación en la cadena de β-globina y pueden presentarse en forma mayor o menor. En la forma principal de β-talasemia, los niños son normales al nacer, pero desarrollan anemia durante el primer año de vida. La forma leve de la β-talasemia produce glóbulos rojos pequeños. Las alfa-talasemias son causadas por la eliminación de un gen o genes de la cadena de globina.

Por la expresión "riesgo de desarrollar enfermedad" se entiende la probabilidad relativa de que un sujeto desarrolle una hemoglobinopatía en el futuro en comparación con un sujeto o población de control (por ejemplo, un sujeto o población sana). Por ejemplo, un individuo portador de la mutación genética asociada con SCD, una mutación A a T del gen de la β-globina, y si el individuo es heterocigoto u homocigoto para esa mutación aumenta el riesgo de ese individuo.

El término "ARN inhibidor" pretende incluir una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia que es complementaria a un ácido nucleico diana (por ejemplo, un microARN diana) que media una disminución en el nivel o actividad del ácido nucleico diana. Ejemplos no limitantes de ARN inhibidores incluyen ARN interferente, ARNsh, ARNsi, ribozimas, antagomirs y oligonucleótidos antisentido. Los métodos para fabricar ARN inhibidores se describen en el presente documento. Se conocen en la técnica métodos adicionales para fabricar ARN inhibidores. En una realización, el microARN de BCL11A descrito aquí es un ARN inhibidor que causa una disminución en la actividad del ARNm de BCL11A.

Como se usa en el presente documento, "un ARN interferente" se refiere a cualquier secuencia de ARN bicatenaria o monocatenaria, capaz, directa o indirectamente (es decir, tras la conversión) de inhibir o subregular la expresión génica por la mediación de la interferencia de ARN. El ARN interferente incluye, pero no se limita a, ARN de interferencia corta ("ARNip") y ARN de horquilla corta ("ARNsh"). La "interferencia de ARN" se refiere a la degradación selectiva de una transcripción de ARN mensajero compatible con la secuencia.

Como se usa en el presente documento, "un ARNsh" (ARN de horquilla corta) se refiere a una molécula de ARN que comprende una región antisentido, una porción de bucle y una región de detección, en la que la región de detección tiene nucleótidos complementarios que se emparejan con la región antisentido para formar un tallo dúplex. Después del procesamiento postranscripcional, el ARN de horquilla corta se convierte en un ARN de interferencia corta por un evento de escisión mediado por la enzima Dicer, la cual es miembro de la familia RNasa III. Como se usa en este

documento, la expresión "procesamiento postranscripcional" se refiere al procesamiento de ARNm que ocurre después de la transcripción y está mediado, por ejemplo, por las enzimas Dicer y/o Drosha.

Un "ARN de interferencia corta" o "ARNip", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula de ARN pequeño capaz de inhibir o subregular la expresión génica mediante la interferencia de ARN de una manera específica de secuencia. El ARN pequeño puede tener, por ejemplo, aproximadamente 18 a 21 nucleótidos de largo. Cada dúplex de ARNip está formado por una cadena guía y una cadena pasajera. La endonucleasa Argonaute 2 (Ago 2) cataliza el desenrollado del dúplex de ARNip. Una vez desenrollado, la cadena guía se incorpora en el Complejo de Especificidad de Interferencia de ARN (RISC), mientras que la cadena pasajera se libera. RISC utiliza la cadena guía para encontrar el ARNm que tiene una secuencia complementaria que conduce a la escisión endonucleolítica del ARNm diana.

Los retrovirus son virus de ARN que utilizan la transcriptasa reversa durante su ciclo de replicación. El término "retrovirus" se refiere a cualquier retrovirus conocido (por ejemplo, retrovirus tipo c, tal como el virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV), el virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), virus de leucemia felina (FLV), virus de espuma, Amigo, virus de células madre murinas (MSCV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Los "retrovirus" de la invención también incluyen virus de leucemia de células T humanas, HTLV-1 y HTLV-2, y la familia lentiviral de retrovirus, tales como virus de inmunodeficiencia humana, VIH-1, VIH-2, virus de inmunodeficiencia simia (SW), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la inmunodeficiencia equina (EIV) y otras clases de retrovirus.

El ARN genómico retroviral se convierte en ADN bicatenario mediante transcriptasa reversa. Esta forma de ADN de doble cadena del virus es capaz de integrarse en el cromosoma de la célula infectada; una vez integrado, se conoce como un "provirus". El provirus sirve como plantilla para la ARN polimerasa II y dirige la expresión de las moléculas de ARN que codifican las proteínas estructurales y las enzimas necesarias para producir nuevas partículas virales.

En cada extremo del provirus hay estructuras llamadas "repeticiones terminales largas" o "LTR". El término "repeticiones terminal larga (LTR)" se refiere a dominios de pares de bases ubicados en los extremos de los ADN retrovirales los cuales, en su contexto de secuencia natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5. Los LTR generalmente proporcionan funciones fundamentales para la expresión de genes retrovirales (por ejemplo, promoción, iniciación y poliadenilación de transcripciones de genes) y para la replicación viral. El LTR contiene numerosas señales reguladoras que incluyen elementos de control transcripcional, señales de poliadenilación y secuencias necesarias para la replicación e integración del genoma viral. El LTR viral se divide en tres regiones llamadas U3, R y U5. La región U3 contiene los elementos potenciadores y promotores. La región U5 es la secuencia entre el sitio de unión del cebador y la región R y contiene la secuencia de poliadenilación. La región R (repeticiones) está flanqueada por las regiones U3 y U5. El LTR compuesto por las regiones U3, R y U5, aparece en los extremos 5' y 3' del genoma viral. En una realización de la invención, el promotor dentro de la LTR, que incluye la LTR 5', se reemplaza con un promotor heterólogo. Ejemplos de promotores heterólogos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, un promotor del virus formador de foco en el bazo (SFFV), un promotor inducible por tetraciclina (TET), una región de control del locus de  $\beta$ -globina y un promotor de  $\beta$ -globina (LCR), y un promotor de citomegalovirus (CMV).

El término "lentivirus" se refiere a un grupo (o género) de retrovirus que dan lugar a una enfermedad de desarrollo lento. Los virus incluidos en este grupo incluyen el VIH (virus de inmunodeficiencia humana; incluido el VIH tipo 1 y el VIH tipo 2), el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA); visna-maedi, el cual causa encefalitis (visna) o neumonía (maedi) en ovejas, el virus de la artritis-encefalitis caprina, el cual causa inmunodeficiencia, artritis y encefalopatía en cabras; virus de la anemia infecciosa equina, el cual causa anemia hemolítica autoinmune y encefalopatía en caballos; virus de inmunodeficiencia felina (FIV), el cual causa inmunodeficiencia en gatos; virus de inmunodeficiencia bovina (BIV), el cual causa linfadenopatía, linfocitosis y posiblemente infección del sistema nervioso central en bovinos; y el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV), el cual causa deficiencia inmunológica y encefalopatía en primates subhumanos. Las enfermedades causadas por estos virus se caracterizan por un largo período de incubación y un curso prolongado. Usualmente, los virus infectan latentemente monocitos y macrófagos, desde los cuales se propagan a otras células. El VIH, FIV y SIV también infectan fácilmente a los linfocitos T, es decir, las células T.

El término "región R" se refiere a la región dentro de las LTR retrovirales que comienzan al inicio del grupo de protección (es decir, el inicio de la transcripción) y terminan inmediatamente antes del inicio del tracto poli A. La región R también se define como flanqueada por las regiones U3 y U5. La región R desempeña un papel importante durante la transcripción reversa al permitir la transferencia de ADN naciente desde un extremo del genoma al otro.

El término "promotor/potenciador" se refiere a un segmento de ADN el cual contiene secuencias capaces de proporcionar funciones tanto de promotor como de potenciador. Por ejemplo, las repeticiones terminales largas de retrovirus contienen tanto funciones promotoras como potenciadoras. El potenciador/promotor puede ser "endógeno", "exógeno" o "heterólogo". Un potenciador/promotor "endógeno" es uno que está naturalmente enlazado con un gen dado en el genoma. Un potenciador/promotor "exógeno" o "heterólogo" es uno que se coloca en yuxtaposición a un gen mediante manipulación genética (es decir, técnicas de biología molecular) de tal manera que la transcripción de ese gen está dirigida por el potenciador/promotor enlazado.

- A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Los métodos y materiales se describen en el presente documento para su uso en la presente invención; pueden usarse también otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y Figuras, y de las reivindicaciones.
- 5 Descripción de los dibujos.
- 10 La Figura 1 es un diagrama de dos realizaciones del micro ARN BCL11A sintético descrito: los oligonucleótidos BCL11A miR1 y BCL11A miR2. La estructura de tallo/bucle es generada por las secuencias complementarias de las secuencias de direccionamiento BCL11A (en negrita en mayúsculas) en los oligonucleótidos. Las secuencias de direccionamiento de BCL11A son los segmentos BCL11A. La estructura del tallo/bucle es entonces clonada en un fondo miR-223/miR-30 (fondo de microARN). La estructura completa de miARN/ARNsh se clona entonces en un casete SFFV/LCR/TET que contiene el vector lentiviral SIN que contiene un indicador transgénico (Venus).
- 15 La Figura 2 es un diagrama esquemático de provirus de vectores lentivirales con promotores SFFV, TET y LCR.
- La Figura 3 es un panel de dos gráficos de barras que muestran que SFFV-LV anula eficientemente BCL11A e induce la expresión de  $\epsilon$ -globina.
- La Figura 4 es un panel de dos gráficos de barras que representan que LCR/TET-LV anula eficientemente BCL11A e induce la expresión de  $\epsilon$ -globina.
- 20 La Figura 5 es un panel de fotomicrografías y gráficos que muestran que los HSC CD34+ transducidas se diferencian ex vivo en eritrocitos y expresan HbF.
- La Figura 6 es un panel de gráficos de dispersión que representan HSC CD34+ transducidas con LCR-LV de pacientes con SCD trasplantado en ratones NSG.
- 25 La Figura 7 es un panel de una microfotografía y gráficos que muestran el estudio de la toxicidad potencial de BCL11A en el desarrollo linfóide.
- Las Figuras 8A-8E muestran la selección y evaluación de ARNshs direccionados a BCL11A en sistemas de expresión pol III y pol II.
- 30 Figura 8A. Representación esquemática de casetes de ARNsh embebidos con ARNsh y miRNA (223) impulsados por ARN polimerasa III (SEQ ID NOS 99-100, respectivamente, en orden de aparición) (pol III, promotor U6, lado izquierdo) y ARN polimerasa II (SEQ ID NOS 101-102, respectivamente, en orden de aparición) (pol II, promotor SFFV, lado derecho) respectivamente. Ambos casetes de expresión fueron diseñados en vectores lentivirus. Los diversos cuadros representan la cadena pasajera, la cadena guía y la estructura del bucle como se indica. El andamio miARN223 se representa con un cuadro de línea de puntos. Se expresaron diferentes secuencias de ARNsh dirigidas a BCL11A en estos dos esqueletos principales y se evaluó la eficacia de anulación.
- 35 Figura 8B. Detección de alto rendimiento de múltiples secuencias de ARNsh dirigidas a diversas regiones en el ARNm de BCL11A (secuencias de isoformas compartidas XL/L, secuencias de codificación única XL y la isoforma 3'-UTR de XL, como se indica) para la eficiencia de anulación utilizando vectores de lentivirus basados en pol III. Tanto la inducción de  $\epsilon$ -y por qPCR como la inducción de informador mCherry por FACS (como un sustituto de la inducción de epsilon-y en una línea celular informadora) se utilizaron como una lectura funcional para la anulación de BCL11A. La expresión normalizada de ARNm de  $\epsilon$ -y en relación con el control no dirigido se representa en el eje y, y la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la expresión de mCherry en relación con el control no transducido se representa en el eje x. Los 11 ARNsh que se probaron adicionalmente están marcados con círculos.
- 40 Figuras 8C y 8D. Comparación de la eficiencia de anulación de los ARNsh seleccionados en sistemas basados en pol III y basados en pol II. Las células MEL se transdujeron con el vector LKO o con el vector LEGO para expresar los ARNsh indicados y las células transducidas se seleccionaron ya sea en presencia de puromicina (LKO) o se clasificaron para la expresión de Venus (LEGO). ARNsh de miR1 previamente informado por Sankaran et al. () Los niveles de proteína BCL11A se muestran (Figura 8C) por inmunotransferencia con  $\beta$ -actina como control. XL y L muestran la posición de cada isoforma de la proteína BCL11A. (Figura 8D) La intensidad de la banda se analizó usando el software ImageJ.
- 45 Figura 8E. La inducción de plegamiento de la expresión normalizada de  $\epsilon$ -y en comparación con el control no dirigido se mide mediante qPCR. Se utilizaron células MEL transducidas con ARNsh no direccionadas y se estableció la expresión en 1. Los datos representan la media  $\pm$  SD de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* P <0.05, \*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001.
- 50

Las Figuras 9A-9F son datos recolectados del análisis de secuenciación de ARN pequeño el cual revela el procesamiento diferencial entre transcripciones pol III vs pol II.

5 Figuras 9A y 9B. El ARN total se aisló de células MEL transducidas, clasificadas o seleccionadas con puromicina que expresaban ya sea ARNsh miR1 o C4. El ARN resultante se sometió luego a secuenciación profunda de ARN. La secuencia de cadena guía y pasajera final procesada transcrita desde (Figura 9A) pol III (LKO) (SEQ ID NO: 103) o (Figura 9B) de pol II (LEGO) (SEQ ID NO: 104) se representa en el eje x y el número correspondiente de lecturas por millón de lecturas totales de cada cadena se trazan en el eje y.

10 Figuras 9C-9F. Las secuencias de cadena de guía variantes procesadas de miR1 transcritas a partir del promotor pol III (Figura 9C) o del promotor pol II (Figura 9D) (SEQ ID NOS 116-126, respectivamente, en orden de aparición) se trazan en el eje y con el número de lecturas totales trazadas en el eje x. La secuencia de especies de cadena guía variantes procesadas de C4 transcritas a partir del promotor pol III (Figura 9E) (SEQ ID NOS 127-134, respectivamente, en orden de aparición) o el promotor pol II (Figura 9F) pol II (SEQ ID NOS 135) 129, 132 y 136-140, respectivamente, en orden de aparición) se trazan en el eje y con el número de lecturas totales trazadas en el eje x.

15 Las Figuras 10A-10D muestran que la modificación de las secuencias de ARNsh conduce a una mayor anulación y una mejor relación de cadena guía/pasajera.

Figura 10 A. Los ARNsh miR1 y C4 (SEQ ID NOS 25, 34, 33 y 42, respectivamente, en orden de aparición) se modificaron de tal manera que se eliminaron cuatro bases 5' y se añadió GCGC en el extremo 3' para producir ARNsh modificado denominado miR1 G5 y C4G5.

20 Figura 10B. Comparación de la eficiencia de anulación de secuencias de ARNsh modificadas y parentales. Las células MEL se transdujeron con LEGO para expresar los ARNsh indicados a través del promotor pol II y las células transducidas se clasificaron para la expresión de Venus. Los niveles de proteína BCL11A se midieron por inmunotransferencia con  $\beta$ -actina como control de carga. XL y L indican la posición de estas isoformas de la proteína BCL11A.

Figura 10C. La intensidad de la banda de inmunotransferencia se analizó utilizando el software ImageJ.

25 La Figura 10D. La inducción de plegamiento de la expresión normalizada en comparación con el control no direccionado de  $\epsilon$ -y por secuencias de ARNsh modificadas/no modificadas medidas por qPCR. Los datos representan la media  $\pm$  SD de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado que muestran resultados similares. \* P <0.05, \*\* P <0.01.

30 Las Figuras 11A-11C muestran que el análisis de secuenciación de ARN de cuatro ARNsh modificados de pares de bases exhibe un procesamiento fiel.

Figura 11A. El ARN pequeño total (SEQ ID NO: 141) se aisló de MEL transducido, clasificado que expresa miR1 modificado y ARNsh C4 modificado y secuenciado. La distribución de frecuencia de las especies de cadena guía procesadas de miR1 modificado (miR1-G5 y C4G5) transcritas desde el promotor pol II se representa en el eje x con la proporción de lecturas por millón de lecturas totales representadas en el eje y.

35 Figuras 11B y 11C. La secuencia de las especies de cadena guía variantes procesadas de miR1-G5 y C4-G5 (SEQ ID NOS 151-156, 129 y 157, respectivamente, en orden de aparición) se muestran en el eje y y se muestra la frecuencia de las lecturas en el eje x.

Figura 12A. Candidatos del cribado de ARNsh direccionada a BCL11A usando el vector pLKO.

40 Figura 12B. Composición y distribución de secuencia de cadena guía en PLKO. Con constructos de pLKO siempre hay un desplazamiento en el extremo 5' el cual puede deberse a la extensión de la secuencia rica en T en el extremo 3'. Las T agregadas son parte de la secuencia de terminación de pol III. Este desplazamiento en la secuencia de ARNsh maduro indica que durante el procesamiento mediado por Dicer la regla de conteo 3' es dominante, lo que significa que la escisión del ARNsh se inicia 21nt desde el extremo 3'. Esto da como resultado un desplazamiento de 3 o 4 pares de bases en el extremo 5' y también en una región de semillas idénticamente desplazada (bases 2-7 de la cadena guía) que es para el reconocimiento del objetivo. La Figura 12B divulga las secuencias "miR1PLKO" como SEQ ID NOS 158 y 117-126, las secuencias "D8 PLKO" como SEQ ID NOS 159-169, las secuencias "E3 PLKO" como SEQ ID NOS 170-180, las secuencias "B11 PLKO" como SEQ ID NOS 181-191, las secuencias "C4 PLKO" como SEQ ID NOS 192, 129, 132, 136-140, 128, 131 y 193, las secuencias "50A5 PLKO" como SEQ ID NOS 194, 137, 195, 128, 196, 137, 197-198, 195, 128 y 199, y las secuencias "B5 PLKO" como SEQ ID NOS 200-210, todas respectivamente, en orden de aparición.

55 Figura 13. Guía de composición y distribución de secuencias de cadena en LEGO. El análisis de secuenciación profunda de ARN pequeño revela un procesamiento diferencial entre transcritos de pol III versus pol II. Con los constructos de lego no hay desplazamiento en el extremo 5' y la cadena guía es procesada fielmente por un dicer que da como resultado el producto predicho. Por consiguiente, la cadena guía final difiere entre constructos impulsados por pol III y pol II. La Figura 13 divulga las secuencias "miR1LEGO" como SEQ ID NOS 105-115, las secuencias "D8

LEGO" como SEQ ID NOS 211-221, las secuencias "E3 LEGO" como SEQ ID NOS 222-232, las secuencias "B11 LEGO" como SEQ ID NOS 233-243, las secuencias "C4 LEGO" como SEQ ID NOS 127-134 y 244-246, las secuencias "50A5 LEGO" como SEQ ID NOS 247, 134 y 248-256, y las secuencias "B5 LEGO" como SEQ ID NOS 257-267, todas respectivamente, en orden de aparición.

5 Figura 14A. Diseño de nuevos ARNsh para imitar cadenas guía maduras producidas en el vector pLKO. Todos los ARNsh se modificaron de tal manera que se eliminaron cuatro bases en 5' y se agregó GCGC en el extremo 3' para producir ARNsh modificado denominado miR1G5, E3G5, B5G5, D8G5, B11G5, 50D12G5, 50B11G5, 50A5G5, 50C4G5. Con la incorporación de este desplazamiento, se observó una mejora significativa con E3G5, D8G5 y C4G5 con respecto a la anulación de BCL11A y la inducción de  $\epsilon$ -y. El "xxxx" representa la posición del desplazamiento de marco de 4 pares de bases (pb) que da como resultado que se eliminen las 4 bases del miR1, E3, B5, D8, B11, 50D12 no modificado (también denominado como D12), 50B11, 50A5 (también denominado como A5) y 50C4 (también denominado como C4).

15 Figura 14B. Composición y distribución de secuencias de cadena guía en LEGO modificado. El análisis de secuenciación profunda de ARN de los ARNsh modificados muestra un procesamiento fiel con un desplazamiento de 4 pb, lo cual indica que al introducir el desplazamiento se puede imitar perfectamente el producto de los vectores pLKO. Como los vectores pLKO se usaron para la detección de ARNshs efectivos, esta modificación imita la secuencia guía de producto madura precisa cuando se transfiere el casete de ARNsh a esqueletos impulsados por pol II. La Figura 14B divulga las secuencias "miR1MODIFICADAS" como SEQ ID NOS 142-144, 144-150 y 268, las secuencias "D8 MODIFICADAS" como SEQ ID NOS 269-279, las secuencias "E3 MODIFICADAS" como SEQ ID NOS 280, 177, 281-282, 175 y 283-285, las secuencias "B11 MODIFICADAS" como SEQ ID NOS 286-296, las secuencias "C4 MODIFICADAS" como SEQ ID NOS 297, 152-156, 129, 157, 298-299, y 132, las secuencias "50A5 MODIFICADAS" como SEQ ID NOS 300-310, y las secuencias "B5 MODIFICADAS" como SEQ ID NOS 311-321, todas respectivamente, en orden de aparición.

25 Figura 15. Comparación de la anulación de BCL11A con secuencias guía modificadas. Comparación de la eficiencia de anulación de secuencias de ARNsh modificadas y parentales. Inmunotransferencia Western que muestra la expresión de BCL11A (isoformas XL y L, panel superior). Los círculos rojos indican ARNshs donde se logró una anulación mejorada de BCL11A tras la introducción de un desplazamiento de 4 pb. Panel inferior: Inducción de plegamiento de la expresión normalizada de  $\epsilon$ -y mediante secuencias de ARNsh modificado/no modificado se comparó con el control no direccionado según lo medido por qPCR.

30 Figura 16. Comparación de la expresión miR con secuencias guía modificadas. Consistente con el aumento en la eficiencia de anulación y la inducción de  $\epsilon$ -y, la expresión de la cadena guía fue alta (lo que conduce a un aumento en la eficiencia de anulación) cuando se realizó la transferencia Northern en constructos modificados en comparación con no modificados, especialmente con E3G5, D8G5 y C4G5.

35 Figura 17. Eficiencia de anulación de BCL11A e inducción  $\epsilon$ -y con vectores LEGO. Comparación de la eficiencia de anulación de ARNsh seleccionados en sistemas basados en pLKO pol III y pLEGO pol II. Las células MEL se transdujeron con los ARNsh indicados ya sea en el vector pLKO o con el vector pLEGO y las células transducidas se seleccionaron ya sea en presencia de puomicina (pLKO) o se clasificaron para la expresión de Venus (pLEGO). Los niveles de proteína BCL11A se midieron por inmunotransferencia con  $\beta$ -actina como control. La inducción de plegamiento de  $\epsilon$ -y normalizado en comparación con el control no dirigido se mide por qPCR. Las células MEL transducidas con ARNsh no direccionadas se usaron como controles negativos. El desplazamiento de marco tiene un fuerte efecto tanto en la eficiencia de anulación como en la inducción de  $\epsilon$ -y. Los ARNsh que direccionan la isoforma XL sola tienen un fuerte efecto sobre la inducción de  $\epsilon$ -y. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. \* P < 0,05.

45 La Figura 18 muestra el procesamiento diferencial en vectores de ARNsh pol-III y vectores de ARNsh adaptados con microARN pol-II. La Figura 18 divulga las secuencias "miR1" como SEQ ID NOS 107, 117, 106 y 143, las secuencias "E3" como SEQ ID NOS 223, 171, 223 y 177, las secuencias "D8" como SEQ ID NOS 214, 160, 212 y 270, las secuencias "B11" como SEQ ID NOS 234, 182, 234 y 287, las secuencias "B5" como SEQ ID NOS 259, 201, 258 y 312, las secuencias "XLC4" como SEQ ID NOS 131, 129, 128 y 152, y las secuencias "XLA5" como SEQ ID NOS 255, 137, 134 y 301, todas respectivamente, en orden de aparición.

50 Las Figuras 19A-19D muestran la selección y evaluación de ARNshs direccionados a BCL11A en sistemas de expresión pol III y pol II.

55 Figura 19A. Representación esquemática de LKO-U6-BCL11A-ARNsh (lado izquierdo) y LEGO-SFFV-BCL11A-ARNshmiR (lado derecho). Ambos casetes de expresión fueron diseñados en vectores lentivirales como se describe en Material y Métodos. Los cuadros de color gris claro representan la cadena en sentido; los cuadros blancos representan la cadena antisentido; los cuadros de color gris oscuro representan la estructura del bucle y el andamio miARN223 se indica mediante una línea de puntos. Las estructuras de horquilla se muestran a continuación (SEQ ID NOS 322-323, respectivamente, en orden de aparición). Se expresaron diferentes secuencias de ARNsh direccionadas a BCL11A en estos dos esqueletos y se evaluó la eficiencia de anulación.

- Figura 19B. Cribado de alto rendimiento de múltiples secuencias de ARNsh direccionadas a ARNm de BCL11A para la eficiencia de anulación utilizando vectores de lentivirus basados en pol III. Tanto la inducción de ARNm de Hbb-y por qRT-PCR como la inducción del informador mCherry por FACS (como un sustituto de la inducción de  $\epsilon$ -y en una línea celular informadora) se usaron como una lectura funcional para la anulación de BCL11A. La expresión normalizada de ARNm de Hbb-y en relación con el control no direccionado se representa en el eje y, y la inducción de plegamiento de la expresión de mCherry (por intensidad de fluorescencia media, MFI) en relación con el control no transducido se representa en el eje x. Los ocho ARNsh de mejor rendimiento aislados del cribado se probaron adicionalmente y están etiquetados como 1 a 8.
- Figura 19C. Comparación de la eficiencia de anulación de ARNsh seleccionados en sistemas basados en pol III (U6) y pol II (SFFV). Las células MEL se transdujeron con U6- (panel superior) o con vectores SFFV- (panel inferior) para expresar los ARNsh indicados y las células transducidas se seleccionaron en presencia de puromicina (pol III) o se clasificaron para la expresión de Venus (pol II). Los niveles de proteína BCL11A se muestran por inmunotransferencia con  $\beta$ -actina como control. XL y L a la izquierda del panel denotan la posición de cada isoforma de la proteína BCL11A.
- Figura 19D. Inducción de plegamiento de la expresión normalizada de Hbb-y en comparación con el control no direccionado medido por qPCR. Se estableció la expresión en células MEL transducidas con ARNsh no direccionado (NT) 1. Las barras negras representan la expresión relativa de los ARNsh impulsados por el promotor U6 y las barras blancas representan los ARNsh impulsados por el promotor SFFV. Los datos representan la media  $\pm$  SD de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* P <0.05.
- Las Figuras 20A y 20B muestran que el análisis de secuenciación de ARN pequeño revela un procesamiento diferencial entre transcritos pol III versus pol II. Resultados de secuenciación de ARN pequeños de células MEL transducidas con U6-ARNshs y SFFV-ARNshmiRs, 2, 3, 4, 7 u 8. Las secuencias de ARN se alinearon con la secuencia de la cadena guía de referencia correspondiente, que se muestra en la parte superior de cada panel en negrita y las secuencias flanqueantes en gris. Las diferentes variantes de cadenas guía producidas a partir de (Figura 20A) U6-ARNshs o (Figura 20B) SFFV-ARNshmiRs se trazan en el eje y. La contribución de porcentaje relativo cada variante se indica en el eje x calculado con base en el número total de lecturas que coinciden con la secuencia de ARNsh de referencia. La Figura 20A divulga las secuencias "ARNsh1" como SEQ ID NOS 170-180, las secuencias "ARNsh2" como SEQ ID NOS 200-210, las secuencias "ARNsh3" como SEQ ID NOS 159-169, las secuencias "ARNsh4" como SEQ ID NOS 181-191, las secuencias "ARNsh6" como SEQ ID NOS 194, 137, 195, 128, 196, 137, 197-198, 195, 128 y 199, y las secuencias "ARNsh8" como SEQ ID NOS 192, 129, 132, 136-140, 128, 131 y 193, todos respectivamente, en orden de aparición. La Figura 20B divulga las secuencias "ARNsh1" como SEQ ID NOS 222-232, las secuencias "ARNsh2" como SEQ ID NOS 257-267, las secuencias "ARNsh3" como SEQ ID NOS 324 y 212-221, las secuencias "ARNsh4" como SEQ ID NOS 233-238, 325, 234 y 241-243, las secuencias "ARNsh6" como SEQ ID NOS 247, 134 y 248-256, y las secuencias "ARNsh8" como SEQ ID NOS 127-134 y 244-246, todos respectivamente, en orden de aparición.
- Las Figuras 21A-21E muestran que la modificación de las secuencias de ARNsh conduce a una anulación aumentada y una relación mejorada de la cadena guía versus la cadena pasajeras en las células MEL.
- Figura 21A. Los SFFV-ARNshmiR se modificaron eliminando las primeras cuatro bases de la secuencia guía y la adición de GCGC al extremo 3' (ARNsh modificado). La Figura 21A divulga las SEQ ID NO 26, 35, 27, 36, 28, 37, 29, 38, 30, 39, 31, 40, 32, 41, 33 y 42, respectivamente, en orden de aparición.
- Figura 21B. Comparación de la eficiencia de anulación de secuencias ARNshmiR modificadas y parentales expresadas a partir de un promotor SFFV-pol II en células MEL. Los niveles de proteína BCL11A se midieron en células transducidas clasificadas por FACS por inmunotransferencia con  $\beta$ -actina como control de carga. XL y L a la izquierda del panel superior indican la posición de estas isoformas de la proteína BCL11A. PIll: vector promotor pol III; PII: vector promotor pol II; PIIM: vector promotor pol II que contiene secuencias de ARNshmiR modificadas.
- Figura 21C. Inducción de plegamiento de Hbb-y en comparación con el control no direccionado por secuencias ARNshmiR no modificadas (barras blancas) y modificadas (barras sombreadas) medidas por qRT-PCR. Los datos representan la media  $\pm$  SD. \*\* P <0.01.
- Figura 21D. Análisis de inmunotransferencia Northern del ARN total extraído de células transducidas con múltiples ARNsh y ARNshmiR. Las sondas (20nt) complementarias a las cadenas guía y pasajera de las posiciones 1 a 20 de ARNshs y ARNshmiRs se utilizaron para medir la abundancia de ARN pequeños procesados. Se usó una sonda complementaria al ARN 5S como control interno para determinar la carga de ARN. PIll: vector promotor pol III; PII: vector promotor pol II; PIIM: vector promotor pol II que contiene secuencias de ARNshmiR modificadas.
- Figura 21E. Resultados de secuenciación de ARN de poblaciones homogéneas de células MEL transducidas que expresan ARNsh1, 2, 3, 4, 7 u 8. Las secuencias de estos ARN se alinearon con la secuencia de cadena de guía de referencia correspondiente que se muestra en la parte superior de cada panel. Las secuencias de diferentes especies de cadenas guía se muestran en el eje y y la frecuencia como porcentaje de lecturas alineadas se muestra en el eje x. La Figura 21E divulga las secuencias "ARNsh # 1" como SEQ ID NOS 280, 177, 281-282, 175 y 283-285, las secuencias "ARNsh # 2" como SEQ ID NOS 311-321, las secuencias "ARNsh # 3" como SEQ ID NOS 269-279, las

secuencias "ARNsh # 4" como SEQ ID NOS 286-296, las secuencias "ARNsh # 6" como SEQ ID NOS 300-310 y las secuencias "ARNsh # 8" como SEQ ID NOS 297, 152-156, 129, 157, 298-299 y 132, todas respectivamente, en orden de aparición.

- 5 Las Figuras 22A-22E muestran que los ARNshmiR modificados conducen a una eficacia aumentada de anulación de BCL11A y a la inducción de gammaglobina en células eritroides derivadas de CD34+ humanas.
- Figura 22A. Las células CD34+ transducidas con vectores pol III o pol II que expresan diferentes ARNsh con y sin modificación se seleccionaron en presencia de puomicina (pol III) o se clasificaron para la expresión de Venus (pol II y pol II modificadas). La expresión de BCL11A se midió por inmunotransferencia con  $\beta$ -actina como control de carga el día 11 de diferenciación.
- 10 Figura 22B. La inducción de ARNm de  $\gamma$ -globina se determinó el día 18 de diferenciación por qRT-PCR. Los datos representan el porcentaje de  $\gamma$ -globina de la producción total de  $\beta$ -locus ( $\gamma$  +  $\beta$ -globina) para pol III (barras negras), pol II (barras blancas) y pol II modificado (barras grises). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .
- Figura 22C. La cuantificación y el análisis estadístico de los marcadores de diferenciación eritroide (CD71, GpA) y la enucleación se evaluaron mediante citometría de flujo. CTRL: vectores de control SFFV-ARNshmiRNT y SEW; PIII: vectores pol III; PII: vectores pol II; PIIM: vectores pol II que contienen secuencias de ARNshmiR modificadas. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*\*\*  $p < 0.001$ .
- 15 Figura 22D. La hemoglobina F de los lisados celulares se midió por HPLC el día 18 de diferenciación. La flecha indica los picos de HbF y el porcentaje de HbF de la hemoglobina total se muestra debajo del cromatograma.
- Figura 22E. Gráfico de correlación de la expresión de ARNm de  $\gamma$ -globina evaluada por qRT-PCR versus HbF por HPLC. Los círculos negros representan vectores pol III, los círculos abiertos y grises representan pol II o ARNshmiR modificados, respectivamente. El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) se muestra para todos los datos.
- 20 Las Figuras 23A-23I muestran que el impacto negativo de la anulación de BCL11A en las HSC in vivo se previene restringiendo la expresión a las células eritroides.
- Figura 23A. Las células de médula ósea negativas de linaje aisladas de ratones  $\beta$ -YAC (CD45.2) se transdujeron ex vivo con vectores LeGO que expresan ARNshmiR\* direccionado a BCL11A o un vector de control no direccionado (SFF-ARNshmiRNT) y se trasplantaron en receptores BoyJ irradiados letalmente (CD45). 1) Las células de control no transducidas se trasplantaron como control. El análisis de injerto se realizó 4, 8 y 12 semanas después del trasplante en sangre periférica y médula ósea, respectivamente. (n = 4 ratones por grupo)
- 25 Figura 23B. La fracción de células modificadas genéticamente (células Venus +) en estos ratones se determinó 4, 8 y 12 semanas después del trasplante en sangre periférica y médula ósea.
- Figura 23C. Los trasplantes competitivos se realizaron usando células donantes CD45.1 y CD45.2 transducidas con los vectores indicados y trasplantadas en ratones heterocigotos CD45.1/2 (paneles superiores). Alternativamente, se utilizó un vector neutro que codifica la proteína fluorescente azul (SFFV-BFP) para identificar la población competidora en un donante CD45.1 en la configuración del receptor CD45.2 (paneles inferiores). Se muestran manchas de puntos representativas de diferentes poblaciones mixtas utilizadas para trasplante tres días después de la transducción. Los dos vectores competidores se indican arriba de cada panel, el primero indica las poblaciones transducidas CD45.2 o SFFV-BFP, respectivamente.
- 30 Figura 23D. La contribución de las células modificadas genéticamente en ratones repoblados competitivamente se analizó a las 4 y 8 semanas después del trasplante en sangre periférica (PB) o en la semana 12 en médula ósea (BM) y bazo (Spl). Se muestra la contribución relativa de las células modificadas genéticamente transducidas con los dos vectores competidores. El primer vector mencionado dominó la salida hematopoyética. Cada punto representa un ratón receptor individual.
- Figura 23E. Una comparación por pares de la fracción de células B de la médula ósea dentro de la fracción de células transducidas entre los vectores de direccionamiento de BCL11A versus los vectores de control (SFF-ARNshmiRNT y SFFV-BFP, panel izquierdo). Del mismo modo, se analizó el contenido de LSK dentro de las fracciones celulares transducidas. Cada punto representa un receptor individual. \* y \*\* indican valores  $p \leq 0.05$  y  $0.01$ , respectivamente.
- 35 Figura 23F. Configuración del vector LCR-ARNshmiR utilizado para la expresión específica de eritroides (detalles en texto).
- Figura 23G. El perfil de expresión in vivo del vector LCR se analizó en diversos linajes hematopoyéticos 12 semanas después del trasplante. Los porcentajes de células Venus + en cada ratón se normalizaron a células eritroides CD71 +/Ter119 + (n = 4).
- 40 Figura 23H. Se realizó un experimento de trasplante competitivo como se describe en c y d usando los vectores LCR o SFFV que expresan ARNshmiR\*. Cada punto representa un receptor individual.
- 45
- 50

- Figura 23I. Las células CD34+ de sangre periférica movilizadas se transdujeron con LCR-ARNshmiR\*, 3 y 8 o un vector simulado SFFV-GFP y se sometieron a diferenciación eritroide in vitro. En el día 7 después de la transducción, se evaluó la actividad promotora de los vectores SFFV-GFP y LCR en diferentes subpoblaciones eritroides. Se muestran diagramas de flujo representativos. Barras de error en todas las Figuras = SD. Análisis estadístico: prueba t.
- Las Figuras 24A-24F muestran la anulación de BCL11A específica de linaje y la inducción de gammaglobina por ARNshmiR modificados.
- Figura 24A. Los HSPC CD34+ transducidos con LCR-ARNshmiR 3, 8 o el vector simulado SFFV-GFP se clasificaron por FACS para la expresión de informador fluorescente y la expresión de BCL11A se midió por inmunotransferencia con  $\beta$ -actina como control de carga el día 11 de diferenciación.
- Figura 24B. La inducción de ARNm de  $\gamma$ -globina se determinó el día 18 de diferenciación por qRT-PCR. Los datos representan el porcentaje de globina  $\gamma/(\gamma + \beta)$ .
- Figura 24C. Cuantificación y análisis estadístico de marcadores de diferenciación eritroide (CD71, GpA) y enucleación mediante análisis de citometría de flujo. CTRL: vector de control SFFV-GFP; LCRM: ARNshmiR modificados que se muestran en la Figura 23A expresados a través del promotor LCR. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.
- Figura 24D. El nivel de HbF de los lisados celulares se midió por HPLC el día 18 de diferenciación. Las flechas indican los picos de HbF y el porcentaje de HbF de la hemoglobina total se muestra debajo del cromatograma.
- Figura 24E. Gráfico de correlación de la inducción de  $\gamma$ -globina por qRT-PCR versus HbF por HPLC. Las barras de error indican  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.
- Figura 24F. Los HSPC CD34+ de médula ósea se transdujeron con LCR-ARNshmiR3 o NT y se trasplantaron en ratones NSG irradiados subletalmente (n = 3 por grupo). Las células no transducidas se usaron como control. Catorce semanas después, las células CD34 se aislaron de la médula ósea de animales trasplantados y se sometieron a diferenciación eritroide in vitro durante 14 días. Se evaluó la expresión de  $\gamma$ -globina y  $\beta$ -globina en células clasificadas para la expresión del informador de Venus.
- La Figura 25 muestra la secuenciación profunda de 247 productos TRC ARNsh procesados en cuatro líneas celulares.
- La Figura 26 muestra el perfil de expresión in vivo del vector LCR-ARNsh<sup>miR</sup>.
- La Figura 27A es una inmunotransferencia Western de células eritroides diferenciadas in vitro derivadas de células CD34+ transducidas de donantes sanos que muestran isoformas de BCL11A (L y XL) y  $\beta$ -ACTINA como control de carga y demuestran la anulación efectiva de BCL11A XL. El VCN determinado por PCR de ADN se muestra debajo de cada línea.
- La Figura 27B muestra la cuantificación de la anulación de BCL11A en células eritroides. Los datos se derivan de inmunotransferencias Western como se muestra en la Figura 27A. Los datos resumen tres experimentos independientes utilizando células de un solo donante. (Barras de error: SD)
- La Figura 27C muestra la inducción de gamma globina en células eritroides según lo evaluado por RT-qPCR y la hemoglobina (HbF) evaluada por HPLC. (Barras de error: SD)
- La Figura 28 muestra la inducción de gamma globina en células eritroides según lo evaluado por RT-qPCR. La cantidad de inducción de gammaglobina en las células eritroides es una medida de la anulación in vivo de BCL11A en las células. Barras de error: SD. Se muestran los datos de tres animales trasplantados por grupo.
- La Figura 29A muestra inmunotransferencias Western que muestran BCL11A (isoformas L y XL) y  $\beta$ -ACTINA como control de carga y demuestra la anulación efectiva de BCL11A-XL. Cada panel (marcado 1-6 debajo de la línea) representa un experimento independiente que usa células de un solo donante.
- La Figura 29B muestra la cuantificación de la anulación de BCL11A en células eritroides. Los datos se derivan de las inmunotransferencias Western que se muestran en la Figura 29A. (Barra de error: SD)
- La Figura 29C muestra la inducción resultante de HbF por HPLC. (Barras de error: SD)
- La Figura 30 muestra las secuencias utilizadas tanto en los esqueletos de SFFV como de LCR para la anulación de BCL11A en células eritroides diferenciadas CD34+.
- La Figura 31 muestra transferencias Western de la anulación de BCL11A en células eritroides diferenciadas CD34+.

Descripción detallada



La divulgación descrita en el presente documento se basa, en parte, en el desarrollo de vectores de terapia génica lentiviral que expresan selectivamente el ARNsh direccionado a BCL11A en la progenie de células madre hematopoyéticas (HSC). En consecuencia, la divulgación abarca novedosos 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 hemoglobinopatías, incluidas SCD y THAL, mediante la inducción de  $\gamma$ -globina mediante la inhibición del producto del gen BCL11A. En realizaciones particulares, se proporcionan vectores de terapia génica lentiviral que expresan selectivamente el ARNsh direccionado a BCL11A en la progenie de las HSC, células progenitoras hematopoyéticas u otras células madre tales como células embrionarias.

La hemoglobina adulta normal comprende cuatro proteínas de globina, dos de las cuales son proteínas alfa ( $\alpha$ ) y dos de las cuales son proteínas beta ( $\beta$ ). Durante el desarrollo fetal de mamíferos, particularmente en humanos, el feto produce hemoglobina fetal, la cual comprende dos proteínas gamma ( $\gamma$ ) -globina en lugar de las dos proteínas  $\beta$ -globina. En algún momento durante el desarrollo fetal, ocurre un cambio fetal de globina en cuyo punto los eritrocitos en el feto cambian de producir predominantemente  $\gamma$ -globina a producir predominantemente  $\beta$ -globina. El cambio en el desarrollo de la producción de hemoglobina predominantemente fetal o HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) a la producción de hemoglobina adulta o HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) comienza aproximadamente a 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 del aumento de la transcripción de los genes de la  $\beta$ -globina. En promedio, la sangre de un adulto normal contiene solamente aproximadamente 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: 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 (RBCs). Estos también incluyen defectos genéticos que dan como resultado la producción de hemoglobinas anormales con una capacidad alterada concomitante para mantener la concentración de oxígeno. Algunos de tales trastornos implican la incapacidad de producir  $\beta$ -globina normal en cantidades suficientes, mientras que otros implican la incapacidad de producir  $\beta$ -globina normal por completo. Estos trastornos asociados con la proteína  $\beta$ -globina se denominan generalmente hemoglobinopatías. Por ejemplo, SCD resulta de una mutación puntual en el gen estructural de la  $\beta$ -globina, lo que lleva a la producción de hemoglobina (HbS) anormal (falciforme). Los glóbulos rojos de HbS son más frágiles que los RBC normales y se someten a hemólisis con mayor facilidad, lo que finalmente conduce a anemia (Atweh, Semin. Hematol. 38 (4): 367-73 (2001)). THAL resulta de un defecto parcial o completo en la expresión del gen de la  $\beta$ -globina, que conduce a una HbA deficiente o ausente.

La búsqueda de tratamiento dirigido a la reducción del desequilibrio de la cadena de globina en pacientes con hemoglobinopatías se ha centrado en la manipulación farmacológica de la HbF fetal. El potencial terapéutico de tales metodologías se demuestra mediante observaciones de que ciertas poblaciones de pacientes adultos con anomalías de la cadena  $\beta$  y niveles de HbF superiores a lo normal experimentan un curso clínico más leve de la enfermedad que los pacientes con niveles normales de HbF en adultos. Por ejemplo, un grupo de pacientes con anemia de células falciforme de Arabia Saudita que expresan 20-30% de HbF tienen solo manifestaciones clínicas leves de la enfermedad (Pembrey, et al., Br. J. Haematol. 40: 415-429 (1978)). Ahora se acepta que las hemoglobinopatías, tales como SCD y THAL, se mejoran por el aumento de la producción de HbF (Jane et al., Br. J. Haematol. 102: 415-422 (1998); Bunn, N. Engl. J. Med. 328: 129-131 (1993)).

El represor transcripcional BCL11A representa un objetivo terapéutico para las  $\beta$ -hemoglobinopatías. La interferencia de ARN se aplicó utilizando ARN de horquilla corta expresados por el promotor pol III (ARNsh) para reducir la expresión de BCL11A en células hematopoyéticas. La anulación de BCL11A en células madre hematopoyéticas murinas (HSC) deteriora el injerto a largo plazo. Para evitar la toxicidad por HSC, la expresión de BCL11A en las células eritroides se suprimió selectivamente a través de ARNsh adaptado por microARN expresado por el promotor pol II (ARNshmiR). Con secuencias idénticas coincidentes con el objetivo, se observó una anulación notablemente reducida usando vectores pol II debido a diferencias de 3-5 nt en las cadenas guía entre los sistemas que influyen fuertemente en la anulación del objetivo. Un desplazamiento de 4 nt correspondiente se diseñó en cadenas guía de ARNshmiR que mejoraron de forma sorprendente e inesperada la anulación de BCL11A y la desrepresión de Hbb-y, un homólogo funcional del gen de la  $\gamma$ -globina humana en una línea celular eritroide murina. Los ARNshmiR modificados se expresaron de forma específica para eritroides para eludir los efectos adversos sobre el injerto de HSC murino, y esto condujo a una anulación eficiente de BCL11A y altos niveles de HbF en células eritroides derivadas de CD34 humano. Se desarrolló una estrategia para el diseño prospectivo de ARNshmiR derivados de selecciones de ARNsh expresadas en pol III. Esta estrategia constituye un enfoque mejorado para la terapia genética en hemoglobinopatías y otras enfermedades que requieren la expresión específica de linaje de secuencias de silenciamiento génico.

Vectores retrovirales y lentivirales

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones y métodos mejorados para tratar hemoglobinopatías usando vectores de suministro de genes basados en retrovirus, por ejemplo, basados en lentivirus que logran una expresión sostenida de alto nivel de genes terapéuticos transferidos en células eritroides o células precursoras eritroides. En una realización de la invención, el vector comprende un miARN artificial que comprende secuencias de direccionamiento a BCL11A clonadas en el bucle del tallo de la secuencia miR-223 endógena (Amendola et al., Mol Ther 17: 1039-52, 2009). En algunas disposiciones previstas, la estructura de tallo/bucle de los

- 5 presentes vectores se genera mediante secuencias complementarias de los oligonucleótidos de las SEQ ID NOS: 34-42 divulgadas aquí. Véase las Figuras. 1, 12A, 14A, 21A y Ejemplo 11. Esta estructura de tallo/bucle se clonó en un fondo miR-223/miR-30. La estructura completa de miARN/ARNsh se clonó luego en un casete con un promotor SFFV, TET o LCR que contenía el vector auto-inactivador (SIN). Los vectores lentivirales particulares de la invención son descritos por Pawliuk et al. (2001) Science 294: 2368 e Imren et al. (2002) PNAS 99: 14380.
- 10 Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona aquí un microARN de BCL11A sintético que comprende un primer segmento de BCL11A, un segmento de bucle y un segundo segmento de BCL11A dispuesto en tándem en una dirección de 5' a 3', en donde el segmento de bucle está entre y directamente enlazado al primer y segundo segmento de BCL11A, y en donde el segundo segmento de BCL11A es complementario al primer segmento de BCL11A de tal manera que el primer y el segundo par base de segmentos BCL11A forman un bucle de horquilla con el segmento de bucle que forma la porción del bucle de horquilla así formado, y el primer segmento de BCL11A comienza con un -GCGC- en el extremo 5' y el segundo segmento de BCL11A termina con un -GCGC- en el extremo 3'.
- 15 En una realización de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el primer y el segundo segmento de BCL11A son de una longitud de aproximadamente 18 a 25 nucleótidos. El primer segmento de BCL11A se deriva de una secuencia de BCL11A y da lugar a la cadena pasajera durante el procesamiento de ARNsh a un ARNip dúplex y el segundo segmento de BCL11A es complementario al primer segmento de BCL11A, en donde el segundo segmento de BCL11A da lugar a la cadena guía que se incorpora en el Complejo de Especificidad de Interferencia de ARN (RISC) para la interferencia de ARN o el silenciamiento del gen BCL11A.
- 20 En una realización de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el primer y segundo segmento de BCL11A se derivan de la secuencia de ARNm de BCL11A.
- De acuerdo con la invención, el primer segmento de BCL11A comienza con un -GCGC- en el extremo 5' y el segundo segmento de BCL11A termina con un -GCGC- en el extremo 3'.
- 25 En una realización de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el primer segmento de BCL11A consiste además en un -GCGC- en el extremo 5' y el segundo segmento de BCL11A termina con un -GCGC- en el extremo 3'.
- En disposiciones previstas de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el primer segmento de BCL11A comienza con un -GCGA-, -TCTG- o -TG- en el extremo 5' y el segundo segmento de BCL11A es complementario al primer segmento de BCL11A.
- 30 En disposiciones previstas de cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el primer segmento de BCL11A consiste además en un -GCGA-, -TCTG- o -TG- en el extremo 5'.
- En disposiciones previstas de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el segundo segmento de BCL11A termina con un -TTTT- en el extremo 3'.
- 35 En disposiciones previstas de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el microARN de BCL11A sintético comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-10,13-18, 25-44. En algunas realizaciones, el microARN de BCL11A sintético comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 34-42.
- En disposiciones previstas de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el microARN de BCL11A sintético consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-10,13-18, 25-44.
- 40 En disposiciones previstas de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el microARN de BCL11A sintético consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-10,13-18, 25-44.
- 45 En las disposiciones previstas de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el primer segmento de BCL11A se selecciona del grupo que consiste en CGCACAGAACTCATGGATT (SEQ. ID. NO: 46; derivado del oligo BCL11A miR1 descrito aquí), CCAGAGGATGACGATTGTTTA (SEQ. ID. NO: 47; derivado del oligo BCL11A miR2 descrito aquí), TCGGAGACTCCAGACAATCGC (SEQ. ID. NO: 48; derivado del oligo BCL11A E3 o ARNsh1 o E3 descrito aquí), CCTCCAGGCAGCTCAAAGATC, (SEQ. ID. NO: 49; derivado de ARNsh2 o B5 descrito aquí), TCAGGACTAGGTGCAGAATGT (SEQ. ID. NO: 50; derivado de ARNsh4 o B11 descrito aquí), TTCTCTTGCAACACGCACAGA (SEQ. ID. NO: 51; derivado de oligo BCL11A D8 o ARNsh3 o D8 descrito aquí),
- 50 GATCATAT (GATCATA SEQ. ID. NO: 52; derivado de ARNsh5 o 50D12 o D12 descrito aquí), CAGTACCCTGGAGAAACACAT (SEQ. ID. NO: 53; derivado de ARNsh5 o 50A5 descrito aquí), CACTGTCCACAGGAGAAGCCA (SEQ. ID. NO: 54; derivado de ARNsh7 o 50B11 descritos aquí), ACAGTACCCTGGAGA AACACA (SEQ. ID. NO: 55; derivado de BCL11A XLC4, ARNsh8 y 50C4 descritos aquí), CAACAAGATGAAGAGCACCAA (SEQ. ID. NO: 56; derivado de oligos no direccionados de BCL11A descritos aquí),
- 55 gcgcCGCACAGAACTCATG (SEQ. ID. NO: 57; derivado de oligo miR1G5 descrito aquí), GCGCTCGGAGACTCCAGACAA (SEQ. ID. NO: 58; derivado de oligo E3G5 o E3 mod o ARNsh1mod descrito aquí),

gcgcCCTCCAGGCAGCTCAAA (SEQ. ID. NO: 59; derivado de B5G5 o ARNsh2mod descrito aquí);  
 gcgcTCAGGACTAGGTGCAGA (SEQ. ID. NO: 60; derivado de B11G5 o ARNsh4mod descrito aquí);  
 gcgcGATCGAGTGTGAATAA (SEQ. ID. NO: 61; derivado de 50D12G5, D12G4 o ARNsh5mod descrito aquí);  
 5 gcgcCAGTACCCTGGAGAAAC (SEQ. ID. NO: 62; derivado de 50A5G5o ARNsh6mod descrito aquí);  
 gcgcCACTGTCCACAGGAGAA (SEQ. ID. NO: 63; derivado de 50B11G5 o ARNsh7mod descrito aquí);  
 GCGCTTCTCTTGCAACACGCA (SEQ. ID. NO: 64; derivado de BCL11A D8G5 o D8 mod o ARNsh3mod descrito  
 aquí), GCGCACAGTACCCTGGAGAAA (SEQ. ID. NO: 65; derivado de BCL11A C4G5, o C4 mod o ARNsh8mod  
 descrito aquí), CGCACAGAACACTCATGGATT ID. NO: 66; derivado de BCL11A D12G5-2 descrito aquí), y  
 10 ACGCTCGCACAGAACACTCATGGATT (SEQ. ID. NO: 67; derivado de BCL11A D12G5-2 descrito aquí). En algunas  
 realizaciones, el primer segmento de BCL11A se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 57, 58, 59, 60,  
 61, 62, 63, 64.

En una realización de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el segmento de bucle se  
 deriva de un microARN. En una realización, el microARN es un microARN específico hematopoyético. Por ejemplo,  
 miR-142, miR-155, miR-181 y miR-223.

15 En una realización de uno cualquiera de los microARN sintéticos de BCL11A descritos aquí, el microARN es miR223.

En una realización de uno cualquiera de los microARN de BCL11A sintéticos descritos aquí, el segmento de bucle es  
 ctccatgtgtag (SEQ ID NO: 68).

20 La presente especificación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de  
 nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42. También se describe en el presente  
 documento una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del  
 grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-18, 25-44, o un microARN de BCL11A sintético descrito en este documento.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente especificación proporciona una composición que comprende al menos  
 una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste  
 en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

25 Por consiguiente, en un aspecto, la presente especificación proporciona una composición que comprende al menos  
 un vector o una bacteria que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos  
 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

30 En un aspecto, la presente especificación proporciona una célula huésped que comprende un vector o virus que  
 comprende al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del  
 grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

En un aspecto, la presente especificación proporciona una célula huésped que comprende un vector, virus o una  
 bacteria que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos  
 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

En una realización, el vector es un vector viral o un virus.

35 La interferencia de ARN (ARNi) mediada por ARN de interferencia corta (ARNip) o microARN (miARN) es un método  
 poderoso para la regulación postranscripcional de la expresión génica. El ARNi se ha utilizado ampliamente para el  
 estudio de procesos biológicos en células de mamíferos y podría constituir una metodología terapéutica para  
 enfermedades humanas en las que sería deseable la modulación selectiva de la expresión génica. Dependiendo del  
 40 grado de complementariedad entre las secuencias de miARN y de ARNm diana, la pérdida de la expresión génica se  
 produce induciendo la degradación del ARNm afín o mediante atenuación traduccional. Los miARN endógenos se  
 transcriben como transcripciones primarias y subsecuentemente son procesados por la enzima ARNasa III Drosha,  
 (1) para crear una estructura de bucle tallo. La exportación y escisión nuclear por Dicer genera una molécula madura  
 de doble cadena corta (ARNip) que se separa en cadenas de guía y pasajero. La cadena guía se carga en el complejo  
 45 silenciador inducido por ARN (RISC), la escisión mediadora del complejo efector de ARNm diana con la cadena guía  
 funcional que se une a las proteínas RISC (2) mientras que la cadena pasajera se degrada [revisado en (3)]. La carga  
 de cadenas guía versus pasajera en RISC depende en gran medida de la estabilidad del extremo 5' del ARNip, con la  
 cadena menos estable incorporada preferentemente en RISC (4, 5), aunque la regulación exacta en células de  
 mamíferos no se comprende completamente. El extremo 5' de la cadena guía contiene la "región de semillas", la cual  
 es crítica para la identificación del objetivo (6, 7). La escisión precisa por Drosha y Dicer es crítica para la generación  
 50 de los ARN guía con regiones de semillas definidas que median la unión eficiente a los ARNm diana apropiados. El  
 procesamiento inexacto da como resultado la unión a moléculas fuera del objetivo, pero un desplazamiento en los  
 sitios de escisión también altera la composición de nucleótidos de los extremos dúplex, lo que puede tener un profundo  
 efecto sobre la carga de la cadena en RISC (8).

55 La inhibición de la expresión de polipéptidos diana seleccionados es mediante el uso de agentes de interferencia de  
 ARN. La interferencia de ARN (ARNi) utiliza pequeños dúplex de ARN interferente (ARNip) que se dirigen al ARN  
 mensajero que codifica el polipéptido objetivo para la degradación selectiva. El silenciamiento post-transcripcional de  
 la expresión génica dependiente de ARNip implica la escisión de la molécula de ARN mensajero diana en un sitio

guiado por el ARNip. El 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 secuencia o el silenciamiento genético postranscripcional específico (PTGS) del ARN mensajero (ARNm) transcrito desde ese gen direccionado (véase Coburn, G. y Cullen, B. (2002) *J. Virology* 76 (18): 9225), inhibiendo así la expresión del gen diana. En una realización, el ARN es ARN bicatenario (ARNbc). Este proceso se ha descrito en plantas, invertebrados y células de mamíferos. En la naturaleza, el ARNi es iniciado por el Dicer de la endonucleasa específica de ARNbc, que promueve la escisión procesiva de ARNbc largo en fragmentos bicatenarios denominados ARNIP. Los ARNip se incorporan a un complejo proteico (denominado "complejo silenciador inducido por ARN" o "RISC") que reconoce y escinde los ARNm diana. El ARNi también puede iniciarse mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, ARNIP sintéticos o agentes interferentes de ARN, para inhibir o silenciar la expresión de genes diana. Como se usa en el presente documento, "inhibición de la expresión del gen diana" incluye cualquier disminución en la expresión o actividad de proteína o nivel del gen o proteína diana codificada por el gen diana en comparación con una situación en la que no se ha inducido ninguna interferencia de ARN. La disminución será de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 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 el cual no ha sido direccionado por un agente interferente de ARN.

Los términos "agente de interferencia de ARN" e "interferencia de ARN", tal como se usan en el presente documento, pretenden abarcar aquellas formas de silenciamiento génico mediadas por ARN bicatenario, independientemente de si el agente interferente de ARN comprende un ARNip, miARN, ARNsh u otra molécula de ARN de doble cadena múltiple. El ARNip se define como un agente de ARN que funciona para inhibir la expresión de un gen diana, por ejemplo, por ARNi. Un ARNip puede sintetizarse químicamente, puede producirse por transcripción *in vitro* o puede producirse dentro de una célula huésped. En una realización, el ARNip es una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 28 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente de aproximadamente 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos de longitud, y pueden contener un saliente de 3' y/o 5' en cada cadena que tiene una longitud de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos. La longitud del saliente está independiente entre los dos cadenas, es decir, la longitud del saliente en una cadena no depende de la longitud del saliente en la segunda cadena. Preferiblemente, el ARNip es capaz de promover la interferencia de ARN a través de la degradación o el silenciamiento genético postranscripcional específico (PTGS) del ARN mensajero diana (ARNm).

Los ARNip también incluyen ARN de horquilla corta (también llamados bucles del tallo) (ARNsh). En una realización, estos ARNsh están compuestos por una cadena antisentido corta (por ejemplo, de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos), seguida de un bucle de nucleótidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 nucleótidos, y la cadena en sentido análogo. Alternativamente, la cadena en sentido puede preceder a la estructura de bucle de nucleótidos y la cadena antisentido puede seguir. Estos ARNsh pueden estar contenidos en plásmidos, retrovirus y lentivirus y expresarse, por ejemplo, del promotor pol III U6 u otro promotor (véase, por ejemplo, Stewart, et al. (2003) *RNA April*; 9 (4): 493-501). El gen o secuencia diana del agente interferente de ARN puede ser un gen celular o una secuencia genómica, por ejemplo, la secuencia de BCL11A. Un ARNip puede ser sustancialmente homólogo al gen diana o la secuencia genómica, o un fragmento del mismo. Como se usa en este contexto, el término "homólogo" se define como sustancialmente idéntico, suficientemente complementario o similar al ARNm diana, o un fragmento del mismo, para efectuar la interferencia de ARN del objetivo. Además de las moléculas de ARN nativas, el ARN adecuado para inhibir o interferir con la expresión de una secuencia diana incluye derivados de ARN y análogos. Preferiblemente, el ARNip es idéntico a su objetivo. El ARNip preferiblemente se dirige solo a una secuencia. Cada uno de los agentes que interfieren con el ARN, tal como los ARNip, se puede analizar en busca de posibles efectos fuera del objetivo mediante, por ejemplo, el perfil de expresión. Tales métodos son conocidos por un experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Jackson et al. *Nature Biotechnology* 6: 635-637, 2003. Además del perfil de expresión, también se pueden examinar las secuencias diana potenciales para secuencias similares en las bases de datos de secuencias para identificar secuencias potenciales las cuales pueden tener efectos fuera del objetivo. Por ejemplo, 15, o tal vez tan solo 11 nucleótidos contiguos, de identidad de secuencia son suficientes para silenciar directamente las transcripciones no dirigidas. Por lo tanto, se puede seleccionar inicialmente los ARNip propuestos para evitar el posible silenciamiento fuera del objetivo utilizando el análisis de identidad de secuencia mediante cualquier método de comparación de secuencia conocido, tal como BLAST. Las secuencias de ARNip se eligen para maximizar la captación de la cadena antisentido (guía) del ARNip en RISC y, por lo tanto, maximizar la capacidad de RISC para dirigir el ARNm de BCL11A para la degradación. Esto se puede lograr escaneando las secuencias que tienen la energía libre de unión más baja en el terminal 5' de la cadena antisentido. La energía libre más baja conduce a una mejora del desenrollado del extremo 5' de la cadena antisentido del dúplex de ARNip, asegurando así que la cadena antisentido será absorbida por RISC y dirigirá la escisión específica de secuencia del ARNm de BCL11A humano. Las moléculas de ARNip no necesitan limitarse a aquellas moléculas que contienen solo ARN, sino que, por ejemplo, abarca además nucleótidos y no nucleótidos modificados químicamente, y también incluyen moléculas en las que una molécula de azúcar ribosa se sustituye por otra molécula de azúcar o una molécula la cual realiza una acción similar. función. Además, se puede usar un enlace no natural entre residuos de nucleótidos, tal como un enlace de fosforotioato. La cadena de ARN puede derivarse con un grupo funcional reactivo de un grupo informador, tal como un fluoróforo. Los derivados particularmente útiles se modifican en un término o en los términos de una cadena de

ARN, típicamente el término 3' de la cadena de sentido. Por ejemplo, el 2'-hidroxilo en el terminal 3' puede derivarse fácil y selectivamente con una variedad de grupos. Otros derivados de ARN útiles incorporan nucleótidos que tienen unidades estructurales de carbohidratos modificados, tales como residuos 2'-O-alquilados o derivados de 2'-O-metil ribosilo y derivados de 2'-O-fluoro ribosilo. Las bases de ARN también pueden modificarse. Se puede usar cualquier base modificada útil para inhibir o interferir con la expresión de una secuencia diana. Por ejemplo, se pueden incorporar bases halogenadas, tales como 5-bromouracilo y 5-yodouracilo. Las bases también se pueden alquilar, por ejemplo, se puede incorporar 7-metilguanosa en lugar de un residuo de guanosina. También se pueden incorporar bases no naturales que producen una inhibición exitosa. Las modificaciones de ARN más preferidas incluyen 2'-desoxi-2'-fluorouridina o nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA) y dúplex de ARN que contienen ya sea fosfodiéster o un número variable de enlaces de fosforotioato. Tales modificaciones son conocidas por un experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Braasch et al., *Biochemistry*, 42: 7967-7975, 2003. La mayoría de las modificaciones útiles a las moléculas de ARN se pueden introducir utilizando productos químicos establecidos para tecnología de oligonucleótidos antisentido. Preferiblemente, las modificaciones implican una modificación mínima de 2'-O-metilo, preferiblemente excluyendo tal modificación. Las modificaciones también excluyen preferiblemente modificaciones de los grupos 5'-hidroxilo libres del ARN. Los ejemplos en el presente documento proporcionan ejemplos específicos de agentes interferentes de ARN, tales como moléculas de ARNsh que se dirigen efectivamente al ARNm de BCL11A.

Los ARN de horquilla corta (ARNsh) impulsados por polimerasa (pol) III se usan más comúnmente en entornos biológicos experimentales. Los ARNsh imitan la estructura de los precursores intermedios de miARN y, por lo tanto, omiten el primer paso de escisión mediado por Drosha. Los ARNsh pueden expresarse abundantemente para proporcionar una anulación eficiente. Sin embargo, a altas multiplicidades de infección (MOI), se ha informado que la sobresaturación de la maquinaria de ARNi endógeno en algunos casos se asocia con efectos citotóxicos debido a la desregulación de los miARN endógenos (9-11). Dos componentes del procesamiento de microARN, Exportin5 y Ago2, parecen limitar la capacidad de esta vía, y la sobreexpresión de estas proteínas da como resultado una mayor capacidad de anulación (12-15). Adicionalmente, la activación de respuestas inmunes innatas desencadenadas por ARN pequeños de una manera de secuencia específica así como no específica puede mediar los efectos secundarios citotóxicos (16, 17), revisados en (18). Estos efectos han dado como resultado un aumento de la mortalidad en ratones en algunos sistemas de modelos transgénicos experimentales, según los informes, como un efecto secundario directo de la sobreexpresión de ARNsh (14, 19).

Para la traducción clínica de terapias basadas en ARNi, probablemente se requerirán sistemas de expresión alternativos que utilicen promotores de polimerasa II. Esta clase de promotores permite la utilización de elementos reguladores apropiados para el linaje o incluso la expresión específica de tipo celular. También podría proporcionar niveles de expresión más bajos en comparación con los promotores de pol III, lo que puede evitar la saturación excesiva de la maquinaria de procesamiento que se ha informado en las células transducidas a MOI altos). Para complicar el uso de los promotores de pol II para la expresión de ARNsh, se requiere embeber las secuencias de ARNsh en secuencias flanqueantes generalmente derivadas de precursores de miARN endógenos para un procesamiento eficiente. Los ARNsh flanqueados por un andamio de miARN imitan la estructura de los miARN endógenos (10, 20). Hasta la fecha, las regiones flanqueantes derivadas de miARN-30 y miARN-223 humanos se han utilizado ampliamente para la incorporación de ARNsh recombinantes para la expresión en células de mamíferos, y se han realizado numerosos esfuerzos para comprender mejor y mejorar esta estrategia de expresión (21). Se ha demostrado que el último miARN es particularmente efectivo cuando se usa como andamio para la expresión de ARNsh en células hematopoyéticas y media una anulación sustancial de los ARNm objetivo como resultado del procesamiento eficiente y baja actividad de la cadena pasajera en varios tipos de células hematopoyéticas (21, 22).

En esta divulgación, los inventores utilizaron BCL11A como objetivo para estudiar el procesamiento y la optimización de ARNshmiR para posibles aplicaciones terapéuticas. BCL11A es un objetivo terapéutico validado para la reactivación del gen de la  $\gamma$ -globina y, por lo tanto, la expresión de HbF en las principales hemoglobinopatías, enfermedad de células falciformes (SCD) y  $\beta$ -talasemias. La modulación descendente o la anulación genética de BCL11A alivia la represión de la  $\gamma$ -globina (23) y la inactivación de BCL11A en el linaje eritroide previene el fenotipo SCD y la toxicidad de los órganos en ratones genéticamente modificados (24). El gen Hbb-y embrionario de ratón es un homólogo funcional del gen de la  $\gamma$ -globina humana y, por lo tanto, sirve como un sustituto conveniente para la evaluación del efecto de la anulación de BCL11A en las células de eritroleucemia murina (MEL). Inicialmente, se observó una eficiencia notablemente reducida de la anulación de BCL11A tras la expresión de ARNsh usando vectores basados en pol II en comparación con vectores basados en pol III. Los diseños de ARNshmiR Pol III y pol II incorporan típicamente 21 secuencias coincidentes del sitio objetivo de bases dentro del tallo de la horquilla palindrómica, pero se espera que las transcripciones de estos dos tipos de casetes de expresión se procesen de manera diferente (25). Los transcritos de ARNshmiR pol II ingresan a la ruta de procesamiento de RNAi corriente arriba del procesamiento de Drosha, mientras que se espera que los productos pol III mucho más cortos entren a la ruta corriente abajo de Drosha y sean escindidos solo en el extremo del bucle por Dicer. Sobre la base de las secuencias de ARN pequeños procesados derivados de los promotores pol III y pol II, se observa que los casetes de ARNsh pol III y los casetes de ARNshmiR pol II producían diferentes ARNsh procesados con respecto al posicionamiento relativo de las 21 secuencias de bases coincidentes con el objetivo. Los ARNshmiR rediseñados que imitaban las secuencias de cadena de guía maduras producidas por ARNsh efectivos impulsados por pol III condujeron a una mejora en la eficiencia del procesamiento y la inhibición del ARNm objetivo. La incorporación de estas modificaciones en un vector de expresión de mamífero específico de eritroides condujo a una anulación significativa de la proteína BCL11A y la reinducción de

la hemoglobina fetal. Esta estrategia también evitó la toxicidad en las células madre hematopoyéticas y los compartimentos de linaje de células B que acompañaron la expresión de ARNsh panhematopoyético. En resumen, los datos demuestran características críticas del procesamiento de ARN relevantes para el uso de ARNsh en diferentes contextos vectoriales, y también proporcionan una estrategia para la anulación de genes específicos del linaje que evita las consecuencias adversas de la expresión generalizada. Los hallazgos de los inventores tienen implicaciones importantes para el diseño de ARNsh embebidos en microARN y su aplicación en metodologías de terapia génica basados en ARNi.

En una realización, el agente de interferencia de ARN se suministra o administra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden agregar agentes portadores adicionales, tales como liposomas, al portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, el agente de interferencia de ARN se suministra mediante un vector que codifica ARN de horquilla pequeña o corta (ARNsh) en un vehículo farmacéuticamente aceptable para las células en un órgano de un individuo. El ARNsh es convertido por las células después de la transcripción en ARNip capaz de dirigirse, por ejemplo, a BCL11A.

En una realización, el agente de interferencia de ARN es una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-18 y 25-44, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

En una realización, el vector es un vector regulable, tal como el vector inducible por tetraciclina. Se pueden usar los métodos descritos, por ejemplo, en Wang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5103-5106, que usan vectores pTet-On (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, California). En una realización, los agentes de interferencia de ARN utilizados en los métodos descritos en el presente documento son absorbidos activamente por las células in vivo después de la inyección intravenosa, por ejemplo, inyección hidrodinámica, sin el uso de un vector, que ilustra el suministro eficiente in vivo de los agentes de interferencia de ARN. Un método para suministrar los ARNsi es el cateterismo del vaso sanguíneo del órgano diana. También se pueden emplear otras estrategias para el suministro de los agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, los ARNip o ARNsh utilizados en los métodos de la invención, tal como, por ejemplo, el suministro por un vector, por ejemplo, un plásmido o un vector viral, por ejemplo, un vector lentiviral. Tales vectores se pueden usar como se describe, por ejemplo, en Xiao-Feng Qin et al. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 100: 183-188. Otros métodos de suministro incluyen la administración de los agentes interferentes de ARN, por ejemplo, los ARNip o ARNsh de la invención, usando un péptido básico conjugando o mezclando el agente interferente de ARN con un péptido básico, por ejemplo, un fragmento de un péptido TAT, mezclando con lípidos catiónicos o formulando en partículas. Los agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, los ARNsi que se dirigen al ARNm de BCL11A, pueden suministrarse individualmente o en combinación con otros agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, ARNip, tales como, por ejemplo, ARNip dirigidos a otros genes celulares. Los ARNip de BCL11A también se pueden administrar en combinación con otros agentes farmacéuticos que se usan para tratar o prevenir enfermedades o trastornos asociados con el estrés oxidativo, especialmente enfermedades respiratorias, y más especialmente asma. Las moléculas sintéticas de ARNip, incluidas las moléculas de ARNsh, se pueden obtener utilizando una serie de técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la molécula de ARNip puede sintetizarse únicamente o producirse de manera recombinante utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como el uso de fosoramiditos de ribonucleósidos adecuadamente protegidos y un sintetizador de ADN/ARN convencional (véase, por ejemplo, Elbashir, S. M. et al. (2001) Nature 411:494-498; Elbashir, S. M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001) Genes & Development 15:188-200; Harborth, J. et al. (2001) J. Cell Science 114:4557-4565; Masters, J. R. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98:8012-8017; and Tuschl, T. et al. (1999) Genes & Development 13:3191-3197). Alternativamente, hay disponibles varios proveedores comerciales de síntesis de ARN que incluyen, pero no se limitan a, Proligo (Hamburg, Germany), Dharmacon Research (Lafayette, Colo., USA), Pierce Chemical (part of Perbio Science, Rockford, Ill., USA), Glen Research (Sterling, Va., USA), ChemGenes (Ashland, Mass., USA), and Cruachem (Glasgow, Reino Unido). Como tal, las moléculas de ARNip no son demasiado difíciles de sintetizar y se proporcionan fácilmente en una calidad adecuada para ARNi. Además, los ARNbc pueden expresarse como estructuras de bucle de tallo codificadas por vectores plasmídicos, retrovirus y lentivirus (Paddison, PJ et al. (2002) Genes Dev. 16: 948-958; McManus, MT et al. (2002) RNA 8: 842-850; Paul, CP et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20: 505-508; Miyagishi, M. et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20: 497-500; Sui, G. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU. 99: 5515-5520; Brummelkamp, T. y otros (2002) Cancer Cell 2: 243; Lee, NS, y otros (2002) Nat. Biotechnol. 20 : 500-505; Yu, JY, et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU. 99: 6047-6052; Zeng, Y., y otros (2002) Mol. Cell. 9: 1327- 1333; Rubinson, DA, et al. (2003) Nat. Genet. 33: 401-406; Stewart, SA, et al (2003) RNA 9: 493-501). Estos vectores generalmente tienen un promotor polIII corriente arriba del ARNbc y pueden expresar cadenas de ARN en sentido y antisentido por separado y/o como estructuras de horquilla. Dentro de las células, Dicer procesa el ARN de horquilla corta (ARNsh) en ARNip efectivo. La región diana de la molécula de ARNip de la presente invención se puede seleccionar de una secuencia de genes diana dada, por ejemplo, una secuencia codificante de BCL11A, que comienza de aproximadamente 25 a 50 nucleótidos, de aproximadamente 50 a 75 nucleótidos, o de aproximadamente 75 a 100 nucleótidos corriente abajo del codón de inicio. Las secuencias de nucleótidos pueden contener UTR 5' o 3' y regiones cercanas al codón de inicio. Un método para diseñar una molécula de ARNsi de la presente invención implica identificar los motivos de la secuencia de 23 nucleótidos y seleccionar aciertos con al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75% de contenido G/C. Alternativamente, si no se encuentra tal secuencia, la búsqueda puede extenderse utilizando el motivo NA (N21), donde N puede ser cualquier nucleótido. En esta situación, el extremo 3' del ARNip en sentido se puede convertir a TT para permitir la generación de un dúplex simétrico con respecto a la

- composición de secuencia de los colgantes 3' en sentido y antisentido. La molécula de ARNip antisentido se puede sintetizar como complemento de las posiciones de nucleótidos 1 a 21 del motivo de la secuencia de 23 nucleótidos. El uso de colgantes simétricos TT 3' puede ser ventajoso para garantizar que las pequeñas partículas de ribonucleoproteína interferentes (siRNP) se formen con relaciones aproximadamente iguales de siRNP de escisión del ARN objetivo y antisentido (Elbashir et al., (2001) supra y Elbashir et al. al., 2001 supra). El análisis de las bases de datos de secuencias, que incluyen, pero no se limitan a NCBI, BLAST, Derwent y GenSeq, así como las compañías de oligosíntesis disponibles comercialmente, tales como OLIGOENGINE®, también se pueden utilizar para seleccionar secuencias de ARNip contra bibliotecas EST para garantizar que solo un gen esté direccionado.
- Los vectores lentivirales de la invención incluyen, pero no se limitan a, virus de inmunodeficiencia humana (por ejemplo, VIH-1, VIH-2), virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia simia (SIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). Estos vectores pueden construirse y manipularse utilizando técnicas reconocidas en el arte para aumentar su seguridad para su uso en terapia e incluir elementos de expresión adecuados y genes terapéuticos, tales como los descritos a continuación, los cuales codifican ARNip para el tratamiento de condiciones que incluyen, pero no se limitan a, hemoglobinopatías.
- Teniendo en cuenta la posible toxicidad de los lentivirus, los vectores pueden diseñarse de diferentes maneras para aumentar su seguridad en aplicaciones de terapia génica. Por ejemplo, el vector puede hacerse más seguro separando los genes lentivirales necesarios (por ejemplo, gag y pol) en vectores separados como se describe, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 6,365,150. Por lo tanto, el retrovirus recombinante puede construirse de tal manera que la secuencia de codificación retroviral (gag, pol, env) sea reemplazada por un gen de interés que haga que la replicación del retrovirus sea defectuosa. El retrovirus defectuoso de replicación se empaqueta luego en viriones mediante el uso de un virus auxiliar o una línea celular de empaquetamiento, mediante técnicas estándar. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células in vitro o in vivo con tales virus se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio estándar.
- Un prerequisite importante para el uso de virus como vectores de suministro de genes es garantizar la seguridad de su uso, particularmente con respecto a la posibilidad de propagación de virus de tipo silvestre en la población celular. El desarrollo que empaqueta las líneas celulares, que producen solo retrovirus con replicación defectuosa, ha aumentado la utilidad de los retrovirus para la terapia génica, y los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para uso en la transferencia génica con fines de terapia génica (para una revisión, véase Miller, AD (1990) Blood 76: 271). Por consiguiente, en una realización de la invención, las líneas celulares de empaquetamiento se usan para propagar vectores (por ejemplo, vectores lentivirales) de la invención para aumentar el título del virus vector. El uso de líneas celulares de empaquetamiento también se considera una forma segura de propagar el virus, ya que el uso del sistema reduce la probabilidad de que ocurra una recombinación para generar virus de tipo silvestre. Además, para reducir la toxicidad a las células causada por la expresión de proteínas de empaquetamiento, se pueden usar sistemas de empaquetamiento en los que los plásmidos que codifican las funciones de empaquetamiento del virus solo se transfectan transitoriamente, por ejemplo, por medios químicos.
- En otra realización, el vector puede hacerse más seguro reemplazando ciertas secuencias lentivirales con secuencias no lentivirales. Por lo tanto, los vectores lentivirales de la presente divulgación pueden contener secuencias lentivirales de genes parciales (por ejemplo, divididas) y/o secuencias no lentivirales (por ejemplo, secuencias de otros retrovirus) siempre que su función (por ejemplo, título viral, infectividad, integración y capacidad para conferir altos niveles y duración de la expresión terapéutica de genes) no se reducen sustancialmente. Los elementos que pueden clonarse en el vector viral incluyen, pero no se limitan a, promotor, señal de empaquetamiento, LTR(s), tramos de polipurina y un elemento de respuesta inversa (RRE).
- En una realización de la divulgación, la región LTR se modifica reemplazando el promotor LTR viral con un promotor heterólogo. En una realización, el promotor del 5' LTR se reemplaza con un promotor heterólogo. Ejemplos de promotores heterólogos los cuales se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, un promotor del virus formador de foco en el bazo (SFFV), un promotor inducible por tetraciclina (TET), una región de control del locus de  $\beta$ -globina y un promotor de  $\beta$ -globina (LCR) y un promotor de citomegalovirus (CMV).
- En algunas realizaciones, los vectores lentivirales de la divulgación también incluyen vectores que se han modificado para mejorar la seguridad en el uso de los vectores como agentes de suministro génico en terapia génica. En una realización de la invención, una región LTR, tal como la 3' LTR, del vector se modifica en las regiones U3 y/o U5, en donde se crea un vector SIN. Tales modificaciones contribuyen a un aumento en la seguridad del vector para fines de suministro de genes. En una realización, el vector SIN de la invención comprende una delección en el 3' LTR en donde una porción de la región U3 se reemplaza con un elemento aislante. El aislante evita que las secuencias potenciadoras/promotoras dentro del vector influyan en la expresión de genes en el genoma cercano, y viceversa, para evitar que las secuencias genómicas cercanas influyan en la expresión de los genes dentro del vector. En una realización adicional de la invención, el 3' LTR se modifica de tal manera que la región U5 se reemplaza, por ejemplo, con una secuencia de poli(A) ideal. Debe observarse que las modificaciones a las LTR, tales como modificaciones a la 3' LTR, la 5' LTR, o ambas 3' y 5' LTR, también se incluyen en la invención.

El promotor del vector lentiviral puede ser uno que sea naturalmente (es decir, como ocurre con una célula in vivo) o no asociado naturalmente con la región flanqueante 5' de un gen particular. Los promotores pueden derivarse de genomas eucariotas, genomas virales o secuencias sintéticas. Los promotores pueden seleccionarse como no específicos (activos en todos los tejidos) (por ejemplo, SFFV), específicos de tejido (por ejemplo, LCR), regulados por procesos reguladores naturales, regulados por fármacos aplicados exógenamente (por ejemplo, TET) o regulados por estados fisiológicos específicos tales como aquellos promotores que se activan durante una respuesta de fase aguda o aquellos que se activan solo en células replicantes. Ejemplos no limitantes de promotores en la presente invención incluyen el promotor del virus formador de foco en el bazo, un promotor inducible por tetraciclina, una región de control de locus de  $\beta$ -globina y un promotor de  $\beta$ -globina (LCR), un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor LTR retroviral, un promotor temprano inmediato de citomegalovirus, un promotor SV40 y un promotor de dihidrofolato reductasa. El promotor también se puede seleccionar de los que se muestran para expresar específicamente en los tipos de células seleccionados que pueden encontrarse asociados con condiciones que incluyen, pero no se limitan a, hemoglobinopatías. En una realización de la invención, el promotor es específico de células de tal manera que la expresión génica se limita a los glóbulos rojos. La expresión específica de eritrocitos se logra utilizando la región promotora de  $\beta$ -globina humana y la región de control de locus (LCR).

Los profesionales expertos reconocerán que la selección del promotor para expresar el polinucleótido de interés dependerá del vector, el casete de ácido nucleico, el tipo de célula que se va a tratar y el efecto biológico deseado. Los profesionales expertos también reconocerán que en la selección de un promotor, los parámetros pueden incluir: lograr niveles suficientemente altos de expresión génica para lograr un efecto fisiológico; mantener un nivel crítico de expresión génica; lograr la regulación temporal de la expresión génica; lograr la expresión específica del tipo celular; lograr la regulación farmacológica, endocrina, paracrina o autocrina de la expresión génica; y prevenir niveles de expresión inapropiados o indeseables. Cualquier conjunto de requisitos de selección dependerá de las condiciones, pero puede determinarse fácilmente una vez que se determinen los requisitos específicos. En una realización de la invención, el promotor es específico de la célula, de tal manera que la expresión génica está restringida a los glóbulos rojos. La expresión específica de eritrocitos se logra utilizando la región promotora de  $\beta$ -globina humana y la región de control de locus (LCR).

Las técnicas estándar para la construcción de vectores de expresión adecuados para uso en la presente invención son bien conocidas por los expertos en la técnica y se pueden encontrar en publicaciones tales como Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor, Nueva York. Hay una variedad de estrategias disponibles para ligar fragmentos de ADN, cuya elección depende de la naturaleza de los terminales de los fragmentos de ADN y qué selecciones puede hacer fácilmente el experto en la técnica.

Los vectores de terapia génica de la presente invención, tales como los vectores lentivirales anteriores, pueden usarse para expresar una variedad de ARNip terapéuticos en células eritroides transformadas. En una realización, el ARNip de interés que se expresará en el vector se deriva de un gen que puede usarse para tratar una hemoglobinopatía, tal como un ARNip para BCL11A.

Los constructos particulares de terapia génica de la invención incluyen, pero no se limitan a, las mostradas en la Figura 2. Los tres vectores lentivirales descritos en este documento se muestran esquemáticamente con un tallo del ARNsh que contiene la secuencia de direccionamiento de ARNm de BCL11A, mientras que el bucle es específico de miR223. Todos contienen un marcador de fluorocromo (Venus) y están integrados en un esqueleto delta-U3 LEGO de autoactivación (SIN) (Ferhse Lab, Alemania). Para evaluar la funcionalidad y la toxicidad del ARNsh direccionado, se utilizó un lentivirus constitutivo de anulación, donde el ARNsh direccionado se expresa a través del muy potente promotor SFFV expresado de forma ubicua. Se usó un lentivirus de anulación inducible, donde el ARNsh se expresa a través de un promotor inducible por tetraciclina PGK, se usó para evaluar los efectos funcionales, dependientes de la dosis y de la programación del ARNsh direccionado. Un lentivirus específico de linaje, donde el ARNsh se expresa a través de un promotor LCR de  $\beta$ -globina (sitios hipersensibles de ADN HS2/3, Naldini Lab, Italia) es una opción terapéutica para validar en sistemas in vivo. Las regiones LTR comprenden además una región U3 y U5, así como una región R. Las regiones U3 y U5 pueden modificarse juntas o de forma independiente para crear un vector el cual se autoinactiva, aumentando así la seguridad del vector para uso en el suministro de genes. Las regiones U3 y U5 pueden modificarse adicionalmente para comprender un elemento aislante.

la etapa de facilitar la producción de partículas virales infecciosas en las células puede llevarse a cabo utilizando técnicas convencionales, tales como técnicas estándar de crecimiento de cultivos celulares. Si lo desea el profesional experto, se pueden preparar soluciones madre lentivirales usando los vectores y métodos de la presente invención. Los métodos para preparar soluciones madre virales son conocidos en la técnica y se ilustran, por ejemplo, por Y. Soneoka et al. (1995) *Nucl. Acidos Res.* 23: 628-633, y N. R. Landau et al. (1992) *J. Virol.* 66: 5110-5113. En el método de producción de una solución madre en la presente invención, las células lentivirales permisivas (denominadas en el presente documento células productoras) se transfectan con el sistema vector de la presente invención. Luego, las células se cultivan bajo condiciones de cultivo celular adecuadas, y las partículas lentivirales se recolectan ya sea de las propias células o de los medios celulares como se describió anteriormente. Las líneas celulares productoras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, la línea celular de riñón embrionario humano 293, la línea celular de dermis equina NBL-6 y la línea celular de timo fetal canino Cf2TH.



la etapa de recolectar las partículas de virus infecciosos también se puede llevar a cabo utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas se pueden recoger por lisis celular, o la recolección del sobrenadante del cultivo celular, como se conoce en la técnica. Opcionalmente, las partículas de virus recolectadas pueden purificarse si se desea. Las técnicas de purificación adecuadas son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Se pueden encontrar otros métodos relacionados con el uso de vectores virales en terapia génica, por ejemplo, Kay, M. A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.): 1385-1425; Ferry, N. and Heard, J. M. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975-81; Shiratory, Y. et al. (1999) *Liver* 19:265-74; Oka, K. et al. (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179-86; Thule, P. M. and Liu, J. M. (2000) *Gene Ther.* 7:1744-52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335-56; Alt, M. (1995) *J. Hepatol.* 23:746-58; Brody, S. L. and Crystal, R. G. (1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 716:90-101; Strayer, D. S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43-49; y Lee, H. C. et al. (2000) *Nature* 408:483-8.

Los vectores retrovirales, incluidos los vectores lentivirales, como se describe anteriormente o las células que los comprenden, se pueden administrar in vivo a los sujetos por cualquier vía adecuada, como es bien conocido en la técnica. El término "administración" se refiere a la ruta de introducción de un vector formulado en el cuerpo. Por ejemplo, la administración puede ser intravascular, intraarterial, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, o mediante una pistola de genes o instrumentación de hipoaspersión. Por lo tanto, la administración puede ser directa a un tejido objetivo o mediante administración sistémica. La administración puede ser inyección directa en la médula ósea. La administración directa al tejido objetivo puede implicar inyección de aguja, hipoaspersión, electroporación, o la pistola génica. Véase, por ejemplo, WO 93/18759.

Alternativamente, los vectores retrovirales de la invención pueden administrarse ex vivo o in vitro a células o tejidos usando técnicas de transfección estándar bien conocidas en la técnica.

En una realización, los vectores retrovirales de la invención también se pueden transducir en células huésped, que incluyen células madre embrionarias, células madre somáticas o células progenitoras. Ejemplos de células huésped progenitoras las cuales pueden ser transducidas por los vectores retrovirales de la invención incluyen precursores de eritrocitos y células madre hematopoyéticas. En otra realización, la célula huésped es un eritrocito. Las células huésped transducidas pueden usarse como un método para lograr la expresión específica del eritroide del gen de interés en el tratamiento de las hemoglobinopatías.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas de los vectores lentivirales de la invención. En una realización, la composición incluye un vector lentiviral en una cantidad terapéuticamente efectiva suficiente para tratar o reducir el riesgo de desarrollo (por ejemplo, mejorar los síntomas de una hemoglobinopatía) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado, tal como el tratamiento o la prevención de una condición hemoglobinopática. Una cantidad terapéuticamente efectiva de vector lentiviral puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del vector lentiviral para provocar una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos compensan cualquiera de los efectos tóxicos o perjudiciales del vector lentiviral. La toxicidad potencial de los vectores lentivirales de la invención se puede analizar usando ensayos basados en células o modelos animales reconocidos en la técnica y se puede seleccionar un modulador terapéuticamente efectivo que no exhiba toxicidad significativa. En una realización preferida, una cantidad terapéuticamente efectiva de un vector lentiviral es suficiente para tratar una hemoglobinopatía.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el vector lentiviral en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

Cabe señalar que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la condición a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se pueden ajustar con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación establecidos en este documento son de ejemplo solamente y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada. En una realización, la dosificación oscila entre  $10^3$ - $10^8$  partículas virales/50 kg de peso. En otras realizaciones, la dosificación oscila entre  $10^3$ - $10^5$  partículas virales/50 kg en peso,  $10^4$ - $10^6$  partículas virales/50 kg en peso,  $10^5$ - $10^7$  partículas virales/50 kg en peso,  $10^3$ - $10^8$  partículas virales/50 kg en peso. En una realización, la dosificación es de aproximadamente  $10^4$  partículas virales/50 kg en peso.

La cantidad de vector viral en la composición puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas durante el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinar tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos. Sin embargo, para cualquier caso dado, un experto en la técnica puede determinar una "cantidad efectiva" apropiada usando solo experimentación de rutina.

La presente invención contempla, en realizaciones particulares, células genéticamente modificadas para expresar los polipéptidos terapéuticos y los ARN inhibidores contemplados en este documento, para uso en el tratamiento de hemoglobinopatías. Como se usa en el presente documento, el término "manipulado genéticamente" o "modificado genéticamente" se refiere a la adición, anulación o modificación del material genético en una célula. Los términos "células genéticamente modificadas", "células modificadas" y "células redirigidas" se usan indistintamente. En realizaciones particulares, las células transducidas con vectores contemplados en el presente documento se modifican genéticamente. Como se usa en este documento, el término "terapia génica" se refiere a la introducción de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula que restaura, corrige o modifica la fisiología de la célula para proporcionar un resultado terapéutico deseado.

En diversas realizaciones, las células genéticamente modificadas contempladas en el presente documento se transducen *in vitro* o *ex vivo* con vectores de la invención, y opcionalmente se expanden *ex vivo*. Las células transducidas se administran luego a un sujeto que necesita terapia génica.

Las células adecuadas para la transducción y administración en los métodos de terapia génica contemplados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, células madre, células progenitoras y células diferenciadas. En ciertas realizaciones, las células transducidas son células madre embrionarias, células madre de médula ósea, células madre del cordón umbilical, células madre placentarias, células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, células progenitoras eritroides y células eritroides.

Las células madre hematopoyéticas (HSC) dan lugar a células progenitoras hematopoyéticas comprometidas (HPC) que son capaces de generar todo el repertorio de células sanguíneas maduras durante la vida útil de un organismo. El término "célula madre hematopoyética" o "HSC" se refiere a las células madre multipotentes que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas de un organismo, incluidos los mieloides (por ejemplo, monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linajes linfoides (por ejemplo, células T, células B, células NK), y otros conocidos en la técnica (véase Fei, R., et al., Patente U.S. N° 5,635,387; McGlave, et al., Patente U.S. No. 5,460,964; Simmons, P., et al., Patente U.S. No. 5,677,136; Tsukamoto, et al., Patente U.S. No. 5,750,397; Schwartz, et al., Patente U.S. No. 5,759,793; DiGuisto, et al., Patente U.S. No. 5,681,599; Tsukamoto, et al., Patente U.S. No. 5,716,827). Cuando se trasplantan a animales o humanos irradiados letalmente, las células madre hematopoyéticas y las células progenitoras pueden repoblar el grupo de células hematopoyéticas eritroides, neutrófilos-macrófagos, megacariocitos y linfoides.

En algunas realizaciones, las células transducidas son células madre hematopoyéticas y/o células progenitoras aisladas de la médula ósea, la sangre del cordón umbilical o la circulación periférica. En realizaciones particulares, las células transducidas son células madre hematopoyéticas aisladas de médula ósea, sangre de cordón umbilical o circulación periférica.

En una realización, las células hematopoyéticas son células CD34+.

En una realización, las células hematopoyéticas son células progenitoras eritroides.

En una realización, las células hematopoyéticas son células eritroides.

Las células de la invención pueden ser autólogas/autogénicas ("propias") o no autólogas ("no propias", por ejemplo, alogénicas, singénicas o xenogénicas). "Autólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a células del mismo sujeto. "Alogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de la misma especie que difieren genéticamente de la célula en comparación. Singénico, como se usa en el presente documento, se refiere a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación. "Xenogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de una especie diferente a la célula en comparación. En realizaciones preferidas, las células de la invención son alogénicas. Una "célula aislada" se refiere a una célula que se ha obtenido de un tejido u órgano *in vivo* y está sustancialmente libre de matriz extracelular.

Los ejemplos ilustrativos de células genéticamente modificadas adecuadas para las terapias basadas en células contempladas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: células madre embrionarias, células madre de médula ósea, células madre del cordón umbilical, células madre placentarias, células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, progenitoras hematopoyéticas células, progenitores mieloides, progenitores eritroides y otras células eritroides.

5 En las realizaciones preferidas, las células adecuadas para terapias basadas en células contempladas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: células madre o progenitoras hematopoyéticas, proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos, eritroblastos ortocromáticos, eritrocitos policromáticos y eritrocitos (RBCs), o cualquier combinación de los mismos.

10 Métodos para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía

La presente invención proporciona composiciones y métodos mejorados para aumentar la producción de HbF en una célula, administrando vectores que inhiben la expresión de BCL11A. Los datos demuestran que la inhibición de BCL11A conduce a una mayor expresión de los genes de  $\gamma$ -globina. Como se divulga en el presente documento, es un objeto de la presente invención proporcionar métodos para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en una célula y composiciones para uso en tales métodos. En algunas realizaciones, la célula es una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética, una célula progenitora hematopoyética o una progenie de las mismas.

Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona métodos para aumentar los niveles de hemoglobina fetal expresados por una célula y composiciones para uso en tales métodos, que comprenden las etapas de poner en contacto una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética, o una hematopoyética con una cantidad efectiva de una composición que comprende al menos un virus o vector que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en este documento, por lo que la expresión de BCL11A se reduce y la expresión de hemoglobina fetal aumenta en la célula, o su progenie, en relación con la célula antes de tal contacto. En una realización, el vector o virus expresa un agente de interferencia de ARN el cual es un microARN de BCL11A lo cual inhibe BCL11A, reduciendo así la expresión de BCL11A.

En relación con poner en contacto una célula con un inhibidor de BCL11A, "aumentar los niveles de hemoglobina fetal" en una célula indica que la HbF es al menos un 5% más alta en las poblaciones tratadas con un inhibidor de BCL11A, que en una población de control comparable, en la que no está presente el inhibidor de BCL11A. Se prefiere que el porcentaje de expresión de HbF en una población tratada con inhibidor de BCL11A sea al menos 10% más alto, al menos 20% más alto, al menos 30% más alto, al menos 40% más alto, al menos 50% más alto, al menos 60% más alto, al menos 70% más alto, al menos 80% más alto, al menos 90% más alto, al menos 1 vez más alto, al menos 2 veces más alto, al menos 5 veces más alto, al menos 10 veces más alto, al menos 100 veces más alto, al menos 1000 veces más alto, o más que una población tratada de control de tamaño comparable y condiciones de cultivo. El término "población tratada de control" se usa en el presente documento para describir una población de células que se ha tratado con medios idénticos, inducción viral, secuencias de ácido nucleico, temperatura, confluencia, tamaño de matraz, pH, etc., con la excepción de un oligonucleótido no direccionado.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos aquí, se sospecha que el sujeto tiene, están riesgo de tener o tiene una hemoglobinopatía, por ejemplo, SCD o THAL. Está dentro de las habilidades de un profesional con experiencia normal reconocer un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía.

40 Los sujetos también pueden ser aquellos que se someten a una variedad de tratamientos de terapia adicionales. Así, por ejemplo, los sujetos pueden ser aquellos tratados con oxígeno, hidroxiurea, ácido fólico o una transfusión de sangre.

Los métodos para suministrar agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, un ARNip, o vectores que contienen un agente de interferencia de ARN, a las células objetivo, por ejemplo, eritrocitos u otras células objetivo deseadas, para la absorción incluyen la inyección de una composición que contiene el agente de interferencia de ARN, por ejemplo, un ARNip, o directamente en contacto con la célula, por ejemplo, un eritrocito, con una composición que comprende un agente de interferencia de ARN, por ejemplo, un ARNip. En otra realización, el agente de interferencia de ARN, por ejemplo, un ARNip puede inyectarse directamente en cualquier vaso sanguíneo, tal como vena, arteria, vénula o arteriola, por ejemplo, mediante inyección hidrodinámica o cateterismo. La administración puede ser mediante una sola inyección o mediante dos o más inyecciones. El agente de interferencia de ARN se suministra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden usar uno o más agentes de interferencia de ARN simultáneamente. En una realización preferida, solo se usa un ARNip que se dirige a BCL11A humano. En una realización, las células específicas se direccionan con interferencia de ARN, lo que limita los posibles efectos secundarios de la interferencia de ARN causados por el direccionamiento no específico de la interferencia de ARN. El método puede usar, por ejemplo, un complejo o una molécula de fusión que comprende una unidad estructural direccionada a la célula y una unidad estructural de unión a la interferencia de ARN que se usa para suministrar la interferencia de ARN de manera efectiva en las células. Por ejemplo, una proteína de fusión anticuerpo-protamina cuando se mezcla con ARNip, se une a ARNip y suministra selectivamente el ARNip a las células que expresan un antígeno reconocido por el anticuerpo, lo que resulta en el silenciamiento de la expresión génica solo en aquellas células que expresan el antígeno. La unidad

estructural de unión a la molécula inductora de interferencia de ARN o ARNip es una proteína o un dominio de unión a ácido nucleico o fragmento de una proteína, y la unidad estructural de unión se fusiona a una porción de la unidad estructural de direccionamiento. La ubicación de la unidad estructural de direccionamiento puede estar ya sea en el extremo carboxilo terminal o amino terminal del constructo o en el medio de la proteína de fusión. También se puede emplear un mecanismo de suministro mediado por virus para suministrar ARNip a las células in vitro e in vivo como se describe en Xia, H. et al. (2002) *Nat Biotechnol* 20 (10): 1006). Los mecanismos de suministro mediados por plásmidos o virales de ARNsh también pueden emplearse para suministrar ARNsh a células in vitro e in vivo como se describe en Rubinson, D. A., et al. ((2003) *Nat. Genet.* 33: 401-406) y Stewart, S. A., et al. ((2003) *RNA* 9: 493-501). Los agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, los ARNip o ARNsh, se pueden introducir junto con los componentes que realizan una o más de las siguientes actividades: mejorar la absorción de los agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, ARNip, mediante la célula, por ejemplo, linfocitos u otras células, inhiben la fusión de cadenas individuales, estabilizan cadenas individuales o de otra manera facilitan el suministro a la célula diana y aumentan la inhibición del gen diana, por ejemplo, BCL11A. La dosis del agente interferente de ARN particular será una cantidad necesaria para efectuar la interferencia de ARN, por ejemplo, silenciamiento genético postraduccional, del gen diana particular, lo que conducirá a la inhibición de la expresión génica diana o la inhibición de la actividad o nivel de la proteína codificada por el gen diana.

En una realización de cualquiera de los métodos descritos aquí, la célula madre embrionaria, la célula madre somática, la célula progenitora, la célula de médula ósea o la célula progenitora hematopoyética, o la célula madre hematopoyética (HSC) se pone en contacto ex vivo o in vitro. En una realización específica, la célula en contacto es una célula del linaje eritroide. En una realización, la composición inhibe la expresión de BCL11A.

En una realización de cualquiera de los métodos descritos aquí, la célula madre embrionaria, la célula madre somática, la célula progenitora, la célula de médula ósea o la célula progenitora hematopoyética, o HSC se aísla del sujeto antes de entrar en contacto con la composición descrita en este documento o entrar en contacto con el virus o vector que lleva una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de un grupo que consiste en la SEQ ID NOS: 34-42, o entrar en contacto con el virus o vector que expresa un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

Las células sanguíneas maduras tienen una duración de vida finita y deben reemplazarse continuamente durante toda la vida. Las células sanguíneas son producidas por la proliferación y diferenciación de una población muy pequeña de células madre hematopoyéticas (HSC) pluripotentes que también tienen la capacidad de reponerse por autorrenovación. Las HSC son células progenitoras multipotenciales y de renovación automática que se desarrollan a partir de células de hemangioblastos mesodérmicos. Las HSC son las células sanguíneas que dan lugar a todas las demás células sanguíneas, que incluyen todas las células sanguíneas diferenciadas de los linajes eritroides, linfoides y mieloides. Las HSC se encuentran en la médula ósea adulta, la sangre periférica y la sangre del cordón umbilical.

Durante la diferenciación, la progenie de HSC progresa a través de diversas etapas intermedias de maduración, generando células progenitoras hematopoyéticas multipotenciales y células progenitoras hematopoyéticas comprometidas con el linaje, antes de alcanzar la madurez. La médula ósea (BM) es el sitio principal de hematopoyesis en humanos y, bajo condiciones normales, solo se pueden encontrar pequeñas cantidades de HSC y células progenitoras hematopoyéticas en la sangre periférica (PB). El tratamiento con citoquinas (en particular, factor estimulante de colonias de granulocitos; G-CSF), fármacos mielosupresores utilizados en el tratamiento del cáncer y compuestos que interrumpen la interacción entre las células hematopoyéticas y las células estromales de BM pueden movilizar rápidamente grandes cantidades de células madre y progenitoras hacia la circulación..

"Célula progenitora hematopoyética", como se usa el término en este documento, se refiere a células de un linaje de células madre hematopoyéticas que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas, incluidas las mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y los linajes linfoides (células T, células B, células NK). Una "célula del linaje eritroide" indica que la célula en contacto es una célula que se somete a 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, eritroides, linfoides y mieloides, que se originan en las células progenitoras hematopoyéticas de la 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 intermedios del linaje eritroide, en glóbulos rojos. Por lo tanto, las células del "linaje eritroide", como se usa el término en el presente documento, comprenden células progenitoras hematopoyéticas, rubriblastos, prorubricitos, eritroblastos, metarubricitos, reticulocitos y eritrocitos.

En alguna realización de cualquiera de los métodos descritos aquí, la célula progenitora hematopoyética tiene 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.

En alguna realización de cualquiera de los métodos descritos aquí, las células progenitoras hematopoyéticas del linaje eritroide tienen el marcador de superficie celular característico del linaje eritroide: CD71 y Ter119.

En alguna realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la HSC tiene 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+.

5 Las HSC, similares a las células progenitoras hematopoyéticas, son capaces de proliferar y dar lugar a más células progenitoras que tienen la capacidad de generar una gran cantidad de células madre que a su vez pueden dar lugar a células hijas diferenciadas o diferenciables. Se puede inducir a las células hijas a proliferar y producir progenie que subsecuentemente se diferencian en uno o más tipos de células maduras, al tiempo que retienen 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, de diferenciarse a un fenotipo más especializado o diferenciado, y que conserva la capacidad, bajo 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 diferentes direcciones, por diferenciación, por ejemplo, al adquirir caracteres completamente individuales, como ocurre en la diversificación progresiva de células y tejidos embrionarios. La diferenciación celular es un proceso complejo que típicamente ocurre a través de muchas divisiones celulares. Una célula diferenciada puede derivar de una célula multipotente la cual a su vez se deriva de una célula multipotente, y así sucesivamente. Si bien cada una de estas células multipotentes puede considerarse células madre, el rango de tipos de células a las que puede dar lugar puede variar considerablemente. Algunas células diferenciadas también tienen la capacidad de dar lugar a células de mayor potencial de desarrollo. Tal capacidad puede ser natural o puede ser inducida artificialmente tras el tratamiento con diversos factores. En muchos casos biológicos, las células madre también son "multipotentes" porque pueden producir progenie de más de un tipo de células distintas, pero esto no es necesario para la "condición de madre". La autorrenovación es la otra parte clásica de la definición de células 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 que retiene el estado del tallo y la otra hija que expresa otras funciones y fenotipos específicos distintos. Alternativamente, algunas de las células madre en una población pueden dividirse simétricamente en dos tallos, manteniendo así algunas células madre en la población en su conjunto, mientras que otras células de la población dan lugar a una progenie diferenciada solamente. En general, las "células progenitoras" tienen un fenotipo celular que es más primitivo (es decir, se encuentra en una etapa anterior a lo largo de una ruta de desarrollo o progresión que una célula completamente diferenciada). A menudo, las células progenitoras también tienen un potencial proliferativo significativo o muy alto. Las células progenitoras pueden dar lugar a múltiples tipos de células diferenciadas distintas o a un solo tipo de células diferenciadas, dependiendo de la vía de desarrollo y del entorno en el cual las células se desarrollan y diferencian.

En una realización de cualquiera de los métodos descritos aquí, la célula madre hematopoyética o la célula progenitora hematopoyética se recolecta de sangre periférica, sangre del cordón umbilical, vellosidades coriónicas, líquido amniótico, sangre placentaria o médula ósea.

35 En una realización de cualquiera de los métodos descritos aquí, la célula madre embrionaria, la célula madre somática, la célula progenitora o la célula de médula ósea se recolecta de sangre periférica, sangre del cordón umbilical, vellosidades coriónicas, líquido amniótico, sangre placentaria o médula ósea.

40 Las células progenitoras de sangre periférica (PBPC) se han convertido en la fuente preferida de células progenitoras hematopoyéticas para el trasplante alogénico y autólogo debido a la facilidad técnica de recolección y al menor tiempo requerido para el injerto. Tradicionalmente, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) se ha utilizado para estimular más PBPC y la liberación de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea. Aunque los regímenes que usan G-CSF usualmente logran recolectar cantidades adecuadas de PBPC de donantes sanos, 5% - 10% movilizarán mal las células madre y pueden requerir aféresis de gran volumen múltiple o extracción de médula ósea.

45 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos aquí, la célula madre embrionaria, la célula madre somática, la célula progenitora, la célula de médula ósea o la célula progenitora hematopoyética, o HSC se selecciona para el marcador de superficie CD34+ antes del contacto.

50 Por consiguiente, en una realización de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la célula madre embrionaria CD34+ aislada, la célula madre somática CD34+ aislada, la célula progenitora CD34+ aislada, la célula progenitora ósea CD34+ aislada, la célula progenitora hematopoyética CD34+ aislada o el HSC CD34+ aislada se ponen en contacto con la composición descrita en el presente documento o contactado con el virus o vector que porta una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de un grupo que consiste en la SEQ ID NOS: 34-42, o contactado con el virus o vector que expresa un microARN de BCL11A sintético descrito en el presente documento.

55 En una realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la célula madre embrionaria, la célula madre somática, la célula progenitora, la célula de médula ósea o la célula progenitora hematopoyética, o HSC se crioconserva antes de cualquier contacto con la composición descrita en este documento o con el virus o vector que porta una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de un grupo que consiste en la SEQ ID NOS: 34-42, o en contacto con el virus o vector que expresa un microARN de BCL11A sintético descrito en este documento.

60

En una realización de cualquiera de los métodos descritos aquí, el contacto es in vitro, ex vivo o in vivo.

En una realización de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el contacto se repite al menos una vez. Es decir, después del primer contacto inicial de las células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras, células de médula ósea o células progenitoras hematopoyéticas, o HSC con la composición descrita en el presente documento o en contacto con el virus o vector que porta una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de un grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o en contacto con el virus o vector que expresa un microARN de BCL11A sintético descrito aquí, la célula se lava, y la célula lavada se pone entonces en contacto por segunda vez con la composición descrita en el presente documento o contactada con el virus o vector que porta una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de un grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o contactada con el virus o vector que expresa un microARN de BCL11A sintético descrito en el presente documento.

En otras realizaciones, el contacto se repite al menos dos veces después del primer contacto inicial.

En una realización de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, después del contacto, la célula madre embrionaria, la célula madre somática, la célula progenitora, la célula de médula ósea o la célula progenitora hematopoyética o HSC en contacto, se crioconservan antes del uso, por ejemplo, expansión ex vivo y/o implantación en un sujeto.

En una realización de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, después del contacto, la célula madre embrionaria, la célula madre somática, la célula progenitora, la célula de médula ósea o la célula progenitora hematopoyética o HSC en contacto se expande en cultivo ex vivo antes del uso, por ejemplo, crioconservación, y/o implantación/injerto en un sujeto.

En una realización de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, después del contacto, la célula madre embrionaria, la célula madre somática, la célula progenitora, la célula de médula ósea o la célula progenitora hematopoyética, o HSC en contacto se diferencia en el cultivo ex vivo antes del uso, por ejemplo, criopreservación, y/o implantación/injerto en un sujeto.

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

En una realización, el inhibidor de la expresión de BCL11A es un agente de interferencia de ARN específico de BCL11A, o un vector que codifica dicho agente de interferencia de ARN específico de BCL11A. En una realización específica, el agente de interferencia de ARN comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 34-42.

Un "ácido nucleico", 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 ácido nucleico, por ejemplo, péptido-ácido nucleico (PNA), PNA pseudocomplementario (pc-PNA) y ácido nucleico bloqueado (LNA). Tales secuencias de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, proteínas que codifican secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, que actúan como represores transcripcionales, moléculas antisentido, ribozimas, pequeñas secuencias inhibitoras de ácido nucleico, por ejemplo, pero no se limitan a ARNi, ARNshi, ARNip, microARNi (miARN) y oligonucleótidos antisentido.

Como se describe en el presente documento, es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones para uso en un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un sujeto.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona composiciones para uso en un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto una célula progenitora hematopoyética o una HSC en el sujeto con una cantidad efectiva de composición que comprende un inhibidor de BCL11A, mediante el cual se incrementa la expresión de HbF, en relación con la expresión antes de tal contacto. En una realización, el inhibidor de BCL11A es un agente de interferencia de ARN que comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

En relación con el contacto de una célula en un sujeto con un inhibidor de BCL11A, "aumentar los niveles de HbF en un sujeto" indica que la HbF en el sujeto es al menos un 5% más alta en las poblaciones tratadas con un inhibidor de BCL11A, que una población de control comparable, en donde no hay inhibidor de BCL11A presente. Se prefiere que la expresión de hemoglobina fetal en un sujeto tratado con inhibidor de BCL11A sea al menos 10% más alta, al menos 20% más alta, al menos 30% más alta, al menos 40% más alta, al menos 50% más alta, al menos 60% más alta, al menos 70% más alta, al menos 80% más alta, al menos un 90% más alta, al menos 1 vez más alta, al menos 2

veces más alta, al menos 5 veces más alta, al menos 10 veces más alta, al menos 100 veces más alta, al menos 1000 veces más alta o más que un sujeto tratado con control comparable. El término "sujeto tratado con control comparable" se usa en el presente documento para describir un sujeto que ha sido tratado de manera idéntica, con la excepción de la adición de un oligonucleótido no direccionado.

- 5 En consecuencia, en una realización, el sujeto ha sido diagnosticado con una hemoglobinopatía. En una realización adicional, la hemoglobinopatía es una SCD. Tal como se usa en el presente documento, la SCD puede ser anemia de células falciformes, enfermedad de la hemoglobina C falciforme (HbSC), beta-plus-talasemia falciforme (HbS/β +) o beta-cero-talasemia falciforme (HbS/β0) En otra realización preferida, La hemoglobinopatía es THAL.

- 10 El tratamiento en el cual las composiciones de acuerdo con la presente invención son para uso mejora uno o más síntomas asociados con el trastorno al aumentar 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 de hematocritos, eritropoyesis ineficaz, recuento anormal de reticulocitos (eritrocitos), carga anormal de hierro, presencia de sideroblastos en anillo, esplenomegalia, hepatomegalia, flujo de sangre periférica deteriorada, disnea, aumento de la hemólisis, ictericia, crisis de dolor anémico, síndrome torácico agudo, secuestro esplénico, priapismo, accidente cerebrovascular, síndrome mano-pie y dolor tal como angina de pecho.

15 En una realización, la célula progenitora hematopoyética o HSC se pone en contacto ex vivo o in vitro, y la célula o su progenie se administra al sujeto. En una realización adicional, la célula progenitora hematopoyética es una célula del linaje eritroide.

- 20 En una realización, la célula progenitora hematopoyética o HSC se pone en contacto con una composición que comprende un inhibidor de BCL11A y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición se administra por inyección, infusión, instilación o ingestión. En una realización, la composición se administra por inyección directa en la médula ósea.

- 25 En una realización de cualquiera de los métodos descritos, el método de terapia génica se usa para tratar, prevenir o mejorar una hemoglobinopatía que se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de hemoglobina C, enfermedad de células falciformes de hemoglobina (SCD), anemia de células falciformes, anemia hereditaria, talasemia, β-talasemia, talasemia mayor, talasemia intermedia, α-talasemia y enfermedad de hemoglobina H.

- 30 En diversas realizaciones de cualquier método descrito, los vectores retrovirales se administran por inyección directa a una célula, tejido u órgano de un sujeto que necesita terapia génica, in vivo. En diversas otras realizaciones de cualquier método descrito, las células se transducen in vitro o ex vivo con los vectores de la invención, y opcionalmente se expanden ex vivo. Las células transducidas se administran luego a un sujeto que necesita terapia génica.

- 35 Un "sujeto", como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que muestre un síntoma de una enfermedad, trastorno o condición monogénica que pueda tratarse con los vectores de terapia génica, la terapéutica basada en células y los métodos divulgados en otro lugar del presente documento. En realizaciones preferidas, un sujeto incluye cualquier animal que muestre síntomas de una enfermedad, trastorno o condición del sistema hematopoyético, por ejemplo, una hemoglobinopatía, que puede tratarse con los vectores de terapia génica, la terapéutica basada en células y los métodos contemplados en el presente documento. Los sujetos adecuados (por ejemplo, pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratones, ratas, conejos o conejillos de Indias), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tales como gatos o perros). Se incluyen primates no humanos y, preferiblemente, pacientes humanos. Los sujetos típicos incluyen animales que exhiben cantidades aberrantes (cantidades menores o mayores que un sujeto "normal" o "sano") de una o más actividades fisiológicas que pueden ser moduladas por la terapia génica.

- 40 En una realización, como se usa en el presente documento "tratamiento" o "tratar", incluye cualquier efecto beneficioso o deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o condición patológica, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o condición que se va a tratar. En otra realización, el tratamiento puede implicar opcionalmente la reducción o mejora de los síntomas de la enfermedad o condición, o el retraso de la progresión de la enfermedad o condición. El "tratamiento" no indica necesariamente la erradicación o cura completa de la enfermedad o condición, o los síntomas asociados de la misma.

- 45 En una realización, como se usa en el presente documento, "prevenir" y palabras similares tales como "prevenido", "prevenir", etc., indican un enfoque para prevenir, inhibir o reducir la probabilidad de aparición o recurrencia de una enfermedad o condición. En otra realización, el término se refiere a retrasar la aparición o recurrencia de una enfermedad o condición o retrasar la aparición o recurrencia de los síntomas de una enfermedad o condición. En otra realización, como se usa en el presente documento, "prevención" y palabras similares incluyen la reducción de la intensidad, efecto, síntomas y/o carga de una enfermedad o condición antes del inicio o recurrencia de la enfermedad o condición.

- 55 En una realización de cualquier método descrito, el método comprende además seleccionar un sujeto que necesita la terapia génica descrita. Por ejemplo, un sujeto que presenta síntomas o citología de una hemoglobinopatía se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de hemoglobina C, enfermedad de células falciformes de hemoglobina (SCD), anemia de células falciformes, anemia hereditaria, talasemia, β-talasemia, talasemia mayor,

talasemia intermedia,  $\alpha$ -talasemia y enfermedad de hemoglobina H. Alternativamente, el sujeto porta una mutación genética que está asociada con una hemoglobinopatía, una mutación genética descrita en este documento. Por ejemplo, un diagnóstico de sujeto de SCD con genotipo HbSS, talasemia HbS/ $\beta$ 0, HbSD o HbSO, y/o con HbF <10% por electroforesis.

- 5 En diversas realizaciones de cualquier método descrito, a un sujeto que necesita terapia génica se le administra una población de células que comprende una cantidad efectiva de células genéticamente modificadas contempladas en el presente documento. Esa es una célula genéticamente modificada que expresa una o más de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 1-10,13-18, 25-44, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

10 Como se usa en el presente documento, el término "cantidad" se refiere a "una cantidad efectiva" o "una cantidad efectiva" de un virus o célula terapéutica transducida para lograr un resultado profiláctico o terapéutico beneficioso o deseado, que incluye resultados clínicos.

15 Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad de virus o célula terapéutica transducida efectiva para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva es menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

20 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un virus o una célula terapéutica transducida puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de las células madre y progenitoras para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es aquella en la cual los efectos terapéuticamente beneficiosos compensan cualesquiera de los efectos tóxicos o perjudiciales del virus o las células terapéuticas transducidas. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" incluye una cantidad que es efectiva para "tratar" a un sujeto (por ejemplo, un paciente).

25 En una realización, la presente invención proporciona composiciones para uso en un método para proporcionar una célula transducida a un sujeto que comprende administrar, por ejemplo, parenteralmente, una o más células transducidas con un vector contemplado en el presente documento en el sujeto. En una realización, el vector es uno que transporta una o más de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 1-10,13-18, 25-44, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

30 En una realización particular, se proporcionan composiciones para uso en un método para prevenir, mejorar o tratar una hemoglobinopatía en un sujeto. El método comprende administrar una población de células que comprenden células hematopoyéticas transducidas con un vector contemplado en el presente documento. En una realización, el vector es uno que transporta una o más de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 1-10,13-18, 25-44, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

35 En realizaciones particulares, una población de células administradas a un sujeto comprende células madre hematopoyéticas o células progenitoras, proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos, eritroblastos ortocromáticos, eritrocitos policromáticos y eritrocitos (RBCs), o cualquier combinación de los mismos, y cualquier proporción de los cuales puede ser modificado genéticamente por los vectores contemplados en el presente documento. En una realización, el vector es uno que transporta una o más de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 1-10,13-18, 25-44, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

40 Las células genéticamente modificadas pueden administrarse como parte de un trasplante de médula ósea o de sangre del cordón umbilical en un individuo que se haya sometido o no a una terapia de ablación de la médula ósea. En una realización, las células genéticamente modificadas contempladas en el presente documento se administran en un trasplante de médula ósea a un individuo que se ha sometido a terapia de médula ósea quimioablative o radioablative.

En una realización, se administra una dosis de células genéticamente modificadas a un sujeto por vía intravenosa. En una realización, las células hematopoyéticas modificadas genéticamente se administran por vía intravenosa a un sujeto.

45 En realizaciones particulares, los pacientes reciben una dosis de células genéticamente modificadas, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/kg, aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/kg, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $4 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $6 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $7 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $9 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/kg, aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/kg, aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/kg, o más en una sola dosis intravenosa. En ciertas realizaciones, los pacientes reciben una dosis de células genéticamente modificadas, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, de al menos  $1 \times 10^5$  células/kg, al menos  $5 \times 10^5$  células/kg, al menos  $1 \times 10^6$  células/kg, al menos  $2 \times 10^6$  células/kg, al menos  $3 \times 10^6$  células/kg, al menos  $4 \times 10^6$  células/kg, al menos  $5 \times 10^6$  células/kg, al menos  $6 \times 10^6$  células/kg, al menos  $7 \times 10^6$  células/kg, al menos  $8 \times 10^6$  células/kg, al menos  $9 \times 10^6$  células/kg, al menos  $1 \times 10^7$  células/kg, al menos  $5 \times 10^7$  células/kg, al menos  $1 \times 10^8$  células/kg, o más en una sola dosis intravenosa.



En una realización adicional, los pacientes reciben una dosis de células genéticamente modificadas, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/kg hasta aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/kg, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/kg hasta aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/kg, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/kg hasta aproximadamente  $9 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/kg hasta aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/kg hasta aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/kg hasta aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/kg hasta aproximadamente  $4 \times 10^8$  células/kg, o cualquier dosis intermedia de células/kg.

En diversas realizaciones, los métodos de la invención proporcionan una terapia génica más robusta y segura que los métodos existentes y comprenden administrar una población o dosis de células que comprenden aproximadamente 5% de células transducidas, aproximadamente 10% de células transducidas, aproximadamente 15% de células transducidas, aproximadamente 20% de células transducidas, aproximadamente 25% de células transducidas, aproximadamente 30% de células transducidas, aproximadamente 35% de células transducidas, aproximadamente 40% de células transducidas, aproximadamente 45% de células transducidas, o aproximadamente 50% de células transducidas, a un sujeto.

En una realización, la invención proporciona células genéticamente modificadas, tales como una célula madre, por ejemplo, una célula madre hematopoyética, con el potencial de expandir o aumentar una población de células eritroides. En realizaciones particulares, las células madre hematopoyéticas se transducen con un vector de la invención y se usan en la administración a un individuo que necesita terapia para la hemoglobinopatía. Las células madre hematopoyéticas son el origen de las células eritroides y, por lo tanto, son preferidas. En una realización, el vector es uno que transporta una o más de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NOS: 1-10, 13-18, 25-44, o un microARN de BCL11A sintético descrito aquí.

Como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" y las variaciones gramaticales de los mismos, ya que se refieren a composiciones, portadores, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales son capaces de administrarse a un sujeto o sobre él sin producir efectos fisiológicos indeseables tales como náuseas, mareos, malestar gástrico y similares. Cada portador también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Un portador farmacéuticamente aceptable no promoverá el aumento de una respuesta inmune a un agente con el cual se mezcla, a menos que se desee. La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersados en la misma se entiende bien en la técnica y no necesita limitarse con base a la formulación. La formulación farmacéutica contiene un compuesto de la invención en combinación con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables. El portador 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 como solución o suspensiones, en líquido antes del uso. La preparación también se puede emulsionar o presentar como una composición de liposomas. El ingrediente activo se puede mezclar con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades adecuadas para uso en los métodos terapéuticos descritos en este documento. Los 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 los cuales mejoran la efectividad del ingrediente activo. La composición terapéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de sus componentes. 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 férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares. Los portadores fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Los portadores líquidos de ejemplo son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los ingredientes activos y el agua, o contienen un regulador tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambas, tales como solución salina regulada con fosfato. Todavía además, los portadores 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 del agua. Ejemplos de tales fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón y emulsiones de agua-aceite. La cantidad de un agente activo usado en la invención que será efectiva en el tratamiento de un trastorno o condición particular dependerá de la naturaleza del trastorno o condición, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La expresión "portador o diluyente farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un agente de relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, involucrado en llevar o transportar los agentes sujetos desde un órgano o porción del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo.

En una realización de cualquiera de los métodos descritos, como se usa en el presente documento, "administrado" se refiere a la colocación de un inhibidor de BCL11A en un sujeto mediante un método o ruta que da como resultado una localización al menos parcial del inhibidor en un sitio deseado. Un agente el cual inhibe BCL11A puede administrarse por cualquier ruta apropiada que da como resultado un tratamiento efectivo en el sujeto, es decir, la administración da

como resultado el suministro a una ubicación deseada en el sujeto donde se suministra al menos una porción de la composición, es decir, al menos un agente, que inhibe BCL11A, está activo en el sitio deseado durante un período de tiempo. El período de tiempo que el inhibidor está activo depende de la vida media in vivo después de la administración a un sujeto, y puede ser tan corto como unas pocas horas, por ejemplo, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 6 horas, al menos 8 horas, al menos 10 horas, al menos 12 horas, al menos 18 horas, al menos 24 horas, hasta algunos días, hasta varios años. Los modos de administración incluyen inyección, infusión, instilación o ingestión. "Inyección" incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebro, espinal e intraesternal e infusión.

En una realización, la composición para uso descrita en el presente documento, o el virus o vector que lleva una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de un grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-10,13-18, 25-44, o el virus o vector que expresa un microARN de BCL11A sintético descrito aquí, se inyecta en la médula ósea.

En una realización, la célula progenitora hematopoyética o HSC de un sujeto que necesita tratamiento se pone en contacto con una composición que inhibe la expresión de BCL11A. En otras realizaciones, la composición comprende un virus o vector que lleva una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de un grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-10,13-18, 25-44, o un virus o vector que expresa un microARN sintético de BCL11A descrito aquí. El sujeto que necesita tratamiento es uno diagnosticado con una hemoglobinopatía tal como SCD o THAL.

Por "inhibe la expresión de BCL11A" se entiende que la cantidad de expresión de BCL11A es al menos un 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 un 10% más bajo, al menos un 20% más bajo, al menos un 30% más bajo, al menos un 40% más bajo, al menos un 50% más bajo, al menos un 60% más bajo, al menos un 70% más bajo, al menos un 80% más bajo, al menos un 90% más bajo, al menos 1 vez más bajo, al menos 2 veces más bajo, al menos 5 veces más bajo, al menos 10 veces más bajo, al menos 100 veces más bajo, al menos 1000 veces más bajo, o más de una población tratada de control comparable en la que no se agrega inhibidor de BCL11A.

En una realización, el ácido nucleico es un agente de interferencia de ARN específico de BCL11A o un vector que codifica el agente de interferencia de ARN. En una realización, el agente de interferencia de ARN comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 34-42.

Como ejemplo de una composición para uso en un método de tratamiento de un sujeto o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una composición que comprende células modificadas por ingeniería genética que comprenden un vector que lleva una secuencia de ácidos nucleicos seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A descrito aquí. En una realización, el método comprende además identificar a un sujeto que tiene una hemoglobinopatía o está en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía. En otra realización, el método comprende además seleccionar el sujeto identificado que tiene una hemoglobinopatía o está en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía.

Como otro ejemplo de una composición para uso en un método de tratamiento de un sujeto o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, el método comprende las siguientes etapas: movilizar las células madre hematopoyéticas y progenitoras hematopoyéticas en un sujeto; recoger y recolectar sangre periférica del sujeto, selección positiva de células CD34+ de la sangre periférica, transducir o transfectar las células seleccionadas CD34+ in vitro con un vector que lleva una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A descrito aquí; lavar las células CD34+ transducidas seleccionadas; y administrar las células al sujeto. En una realización, el método comprende además identificar a un sujeto que tiene una hemoglobinopatía o está en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía. En una realización, el método comprende además seleccionar el sujeto que tiene una hemoglobinopatía o está en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía. En otra realización, el método comprende además expandir en cultivo las células seleccionadas CD34+ lavadas y transducidas in vitro antes de administrar al sujeto. En otra realización, el método comprende además diferenciar en cultivo las células CD34+ seleccionadas lavadas y transducidas in vitro antes de administrarlas al sujeto.

Como otro ejemplo de una composición para uso en un método de tratamiento de un sujeto o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, el método comprende las siguientes etapas: movilizar las células madre hematopoyéticas y progenitoras hematopoyéticas en un sujeto donante; recoger y recolectar sangre periférica del sujeto donante, selección positiva de células CD34+ de la sangre periférica, transducir o transfectar las células seleccionadas CD34+ in vitro con un vector que lleva una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A descrito aquí; lavar las células transducidas CD34+ seleccionadas; y administrar las células en un sujeto receptor. En una realización, el método comprende además seleccionar un sujeto receptor que tenga una hemoglobinopatía o esté en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía. En otra realización, el método comprende además expandir en cultivo las células seleccionadas CD34+ lavadas y transducidas in vitro antes de administrarlas al sujeto receptor. En otra realización, el método comprende además

diferenciar en cultivo las células seleccionadas CD34+ lavadas y transducidas in vitro antes de administrarlas al sujeto receptor.

5 Como otro ejemplo de una composición para uso en un método de tratamiento de un sujeto o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, el método comprende las siguientes etapas: cultivar y recoger la sangre de la médula ósea de un sujeto, selección positiva de células CD34+ de la sangre de la médula ósea, transducir o transfectar las células seleccionadas CD34+ in vitro con un vector que lleva una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A descrito aquí; lavar las células transducidas CD34+ seleccionadas; y administrar las células al sujeto. En una realización, el método comprende además identificar un sujeto que tiene una hemoglobinopatía o que está en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía. En una realización, el método comprende además seleccionar el sujeto que tiene una hemoglobinopatía o está en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía. En otra realización, el método comprende además expandir en cultivo las células seleccionadas CD34+ lavadas y transducidas in vitro antes de administrar al sujeto. En otra realización, el método comprende además diferenciar en cultivo las células CD34+ seleccionadas lavadas y transducidas in vitro antes de administrarlas al sujeto.

15 Como otro ejemplo de una composición para uso en un método de tratamiento de un sujeto o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, el método comprende las siguientes etapas: cultivar y recolectar la sangre de la médula ósea de un sujeto donante, selección positiva de células CD34+ de la sangre de la médula ósea, transducir o transfectar las células seleccionadas CD34+ in vitro con un vector que porta una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-10, 13-18 y 25-44, o un microARN de BCL11A descrito en este documento; lavar las células transducidas CD34+ seleccionadas; y administrar las células en un sujeto receptor. En una realización, el método comprende además identificar un sujeto receptor que tiene una hemoglobinopatía o está en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía. En una realización, el método comprende además seleccionar un sujeto receptor que tenga una hemoglobinopatía o esté en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía. En otra realización, el método comprende además expandir en cultivo las células seleccionadas CD34+ lavadas y transducidas in vitro antes de administrarlas al sujeto receptor. En otra realización, el método comprende además diferenciar en cultivo las células seleccionadas CD34+ lavadas y transducidas in vitro antes de administrarlas al sujeto receptor.

20 En una realización, la divulgación en el presente documento proporciona una célula manipulada por ingeniería genética que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A descrito en este documento.

25 En una realización, la divulgación en el presente documento proporciona una célula manipulada por ingeniería genética que se ha transducido o transfectado con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A descrito en este documento. En una realización, el vector es un lentivirus.

35 En una realización, la divulgación en el presente documento proporciona un método de tratamiento de un sujeto o reduce el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, el método comprende administrar una célula manipulada por ingeniería genética que ha sido transducida o transfectada con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A descrito aquí. En una realización, el vector es un lentivirus.

40 En una realización, la divulgación en el presente documento proporciona un método de tratamiento de un sujeto o reduce el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, el método comprende administrar una célula manipulada por ingeniería genética que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34-42, o un microARN de BCL11A descrito aquí.

45 En una realización, la célula manipulada por ingeniería genética es una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.

En una realización, la célula manipulada por ingeniería genética es una célula que se ha diferenciada de una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.

50 En una realización, la célula manipulada por ingeniería genética es una célula que ha sido diferenciada en el linaje eritroide.

En una realización, la célula manipulada por ingeniería genética es una célula que ha sido diferenciada en un eritrocito.

En una realización, la célula manipulada por ingeniería genética es una célula CD34+.

Los siguientes párrafos numerados describen las disposiciones de acuerdo con la descripción anterior.

- 5 [1] Un microARN de BCL11A sintético que comprende un primer segmento de BCL11A, un segmento de bucle; y un segundo segmento de BCL11A dispuesto en tándem en una dirección de 5' a 3', en donde el segmento de bucle está entre y directamente enlazado al primer y segundo segmentos de BCL11A, y en donde el segundo segmento de BCL11A es complementario al primer segmento de BCL11A de tal manera que el primer y segundo par base de segmentos BCL11A forman un bucle de horquilla con el segmento de bucle que forma la porción de bucle del bucle de horquilla así formado.
- [2] El microARN de BCL11A sintético del párrafo 1, en donde el primer y el segundo segmentos de BCL11A tienen una longitud de aproximadamente 18 a 25 nucleótidos.
- 10 [3] El microARN de BCL11A sintético del párrafo 1 o 2, en donde el primer segmento de BCL11A contiene una secuencia derivada de una secuencia de ARNm de BCL11A.
- [4] El microARN de BCL11A sintético de uno cualquiera de los párrafos 1-3, en donde el primer segmento de BCL11A es complementario del segundo segmento de BCL11A.
- 15 [5] El microARN de BCL11A sintético de uno cualquiera de los párrafos 1-4, en donde el primer segmento de BCL11A comienza con un -GCGC- en el extremo 5' y el segundo segmento de BCL11A termina con un -GCGC- en el extremo 3'.
- 20 [6] El microARN de BCL11A sintético de uno cualquiera de los párrafos 1-5, en donde el primer segmento de BCL11A se selecciona del grupo que consiste en CGCACAGAACACTCATGGATT (SEQ. ID. NO: 46; derivado del oligo BCL11A miR1 descrito aquí), CCAGAGGATGACGATTGTTTA (SEQ ID. NO: 47; derivado del oligo BCL11A miR2 descrito aquí), TCGGAGACTCCAGACAATCGC (SEQ. ID. NO: 48; derivado del oligo BCL11A E3 o ARNsh1 o E3 descrito aquí), CCTCCAGGCAGCTCAAAGATC, (SEQ. ID. NO: 49; derivado de ARNsh2 o B5 descrito aquí), TCAGGACTAGGTGCAGAATGT (SEQ. ID. NO: 50; derivado de ARNsh4 o B11 descrito aquí), TTCTCTTGCAACACGCACAGA (SEQ. ID. NO: 51; derivado del oligo BCL11A D8 o ARNsh3 o D8 descrito aquí), GATCGAGTGTGAATAATGAT (SEQ. ID. NO: 52; derivado de ARNsh5 o 50D12 ol D12 descrito aquí), CAGTACCCTGGAGAAACACAT (SEQ. ID. NO: 53; derivado de ARNsh5 o 50A5 aquí descrito), CACTGTCCACAGGAGAAGCCA (SEQ. ID. NO: 54; derivado de ARNsh7 o 50B11 descrito aquí), ACAGTACCCTGGAGAAACACA (SEQ. ID. NO: 55; derivado de BCL11A XLC4, ARNsh8 y 50C4 descritos aquí), CAACAAGATGAAGAGCACCAA (SEQ. ID. NO: 56; derivado de oligos BCL11A no direccionados descritos aquí), gcgcCGCACAGAACACTCATG (SEQ. ID. NO: 57; derivado de miR1G5 oligo descrito aquí), GCGCTCGGAGACTCCAGACAA (SEQ. ID. NO: 58; derivado de E3G5 o E3 mod oligo o ARNsh1mod descrito aquí), gcgcCCTCCAGGCAGCTCAA (SEQ. ID. NO: 59; derivado de B5G5 o ARNsh2mod descrito aquí); gcgcTCAGGACTAGGTGCAGA (SEQ. ID. NO: 60; derivado de B11G5 o ARNsh4mod descrito aquí); gcgcGATCGAGTGTGAATAA (SEQ. ID. NO: 61; derivado de 50D12G5, D12G4 o ARNsh5mod descrito aquí); gcgcCAGTACCCTGGAGAAAC (SEQ. ID. NO: 62; derivado de 50A5G5 o ARNsh6mod descrito aquí); gcgcCACTGTCCACAGGAGAA (SEQ. ID. NO: 63; derivado de 50B11G5 o ARNsh7mod descrito aquí); GCGCTTCTCTTGCAACACGCA (SEQ. ID. NO: 64; derivado de BCL11A D8G5 o D8 mod o ARNsh3mod descrito aquí), GCGCACAGTACCCTGGAGAAA (SEQ. ID. NO: 65; derivado de BCL11A C4G5, o C4 mod o ARNshCACG descrito aquí, (SEQ ID. NO: 66; derivado de BCL11A D12G5-2 descrito aquí), y ACGCTCGCACAGAACACTCATGGATT (SEQ. ID. NO: 67; derivado de BCL11A D12G5-2 descrito aquí).
- 30 [7] El microARN de BCL11A sintético de uno cualquiera de los párrafos 1-6, en donde el segmento de bucle se deriva de un microARN.
- 40 [8] El microARN de BCL11A sintético del párrafo 7, en donde el microARN es un microARN específico hematopoyético.
- [9] El microARN de BCL11A sintético del párrafo 8, en donde el microARN es miR223.
- [10] El microARN de BCL11A sintético del párrafo 9, en donde el segmento de bucle es ctccatgtgtagag (SEQ ID NO: 68).
- 45 [11] El microARN de BCL11A sintético de uno cualquiera de los párrafos 1-10, en donde el microARN comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-10, 13-18 y 25-44.
- [12] Un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, comprendiendo el método expresar in vivo al menos un microARN de BCL11A sintético de uno cualquiera de los párrafos 1-11 en el sujeto.
- 50 [13] El método del párrafo 12, en donde la expresión in vivo ocurre en una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética en el sujeto.
- 55 [14] Un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, comprendiendo el método expresar al menos un microARN de BCL11A sintético de uno cualquiera de los párrafos 1-11 en una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre

hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética del sujeto en donde la expresión es ex vivo, e implantando la célula en el sujeto.

- 5 [15] Un método para aumentar los niveles de hemoglobina fetal expresados por una célula que comprende expresar al menos un microARN de BCL11A sintético de uno cualquiera de los párrafos 1-11 en una célula, en donde la célula es una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.
- [16] El método de uno cualquiera de los párrafos 12-15, en donde el al menos un microARN de BCL11A sintético está operativamente enlazado a un promotor y construido en un vector para la expresión en una célula eucariota.
- 10 [17] El método de uno cualquiera de los párrafos 12-16, en donde el al menos un microARN de BCL11A sintético se expresa a partir de una ARN polimerasa II.
- [18] El método de uno cualquiera de los párrafos 12-17, en donde el al menos un microARN de BCL11A sintético no se expresa a partir de una ARN polimerasa III.
- 15 [19] El método del párrafo 18, en donde el promotor se selecciona de un grupo que consiste en un promotor de virus formador de foco en el bazo, un promotor inducible por tetraciclina o una región de control de locus de  $\beta$ -globina y un promotor de  $\beta$ -globina.
- [20] El método de uno cualquiera de los párrafos 16-19, en donde el vector es un virus.
- [21] El método del párrafo 20, en donde el virus es un lentivirus.
- 20 [22] El método del párrafo 21, en donde el lentivirus se selecciona del grupo que consiste en: virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), virus de encefalitis por artritis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV).
- [23] Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-10, 13-18 y 25-44.
- 25 [24] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.
- [25] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2.
- [26] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3.
- 30 [27] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4.
- [28] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.
- 35 [29] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6.
- [30] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.
- [31] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 8.
- 40 [32] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9.
- [33] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10.
- 45 [34] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 13.
- [35] La molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23, en donde la molécula comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 14.



- [59] Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23.
- [60] El vector del párrafo 59, en donde el vector comprende además un promotor de virus formador de foco en el bazo, un promotor inducible por tetraciclina o una región de control de locus de  $\beta$ -globina y un promotor de  $\beta$ -globina.
- [61] Una célula huésped que comprende el vector del párrafo 59 o 60.
- 5 [62] La célula del párrafo 61, en donde la célula es una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.
- [63] La célula del párrafo 61, en donde la célula es un eritrocito.
- [64] Una bacteria que comprende la molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23.
- 10 [65] Un virus que comprende la molécula de ácido nucleico aislada del párrafo 23.
- [66] El virus del párrafo 65, en donde el virus es un lentivirus.
- [67] El virus del párrafo 66, en donde el lentivirus se selecciona del grupo que consiste en: virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), virus de encefalitis por artritis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV).
- 15 [68] Una composición que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de uno cualquiera de los párrafos 1-58, un vector de los párrafos 59 o 60, una célula huésped de uno cualquiera de los párrafos 61-63, o un virus de uno cualquiera de los párrafos 65- 67)
- [69] Una composición que comprende un vector de los párrafos 59 o 60, una célula huésped de uno cualquiera de los párrafos 61-63, o un virus de uno cualquiera de los párrafos 65-67.
- 20 [70] La composición de los párrafos 68 o 69, que comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- [71] Una composición de uno cualquiera de los párrafos 68-70 para uso en el tratamiento o para reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto.
- 25 [72] Una composición de uno cualquiera de los párrafos 68-70 para uso en la fabricación de medicamentos en el tratamiento o para reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto.
- [73] Una composición de uno cualquiera de los párrafos 68-70 para uso en el aumento de los niveles de hemoglobina fetal expresados por una célula.
- 30 [74] La composición del párrafo 73, en donde la célula es una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.
- [75] Un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, comprendiendo el método: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de ácido nucleico aislada de uno cualquiera de los párrafos 1-58, un vector de los párrafos 59 o 60, una célula huésped de uno cualquiera de los párrafos 61-63, o un virus de uno cualquiera de los párrafos 65-67 al sujeto, tratando o reduciendo el riesgo de desarrollar la hemoglobinopatía en el sujeto.
- 35 [76] Un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, comprendiendo el método: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de uno cualquiera de los párrafos 68-74 en el sujeto, tratando así, o reduciendo el riesgo de desarrollar, la hemoglobinopatía en el sujeto.
- 40 [77] Un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto, comprendiendo el método aumentar los niveles de hemoglobina fetal expresados por una célula en el sujeto.
- [78] El método de uno cualquiera de los párrafos 75-77, que comprende además seleccionar un sujeto que tiene una hemoglobinopatía o está en riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía.
- 45 [79] El método de la reivindicación 78, en donde la hemoglobinopatía es la enfermedad de células falciformes o la talasemia.
- [80] El método de uno cualquiera de los párrafos 75-80, comprendiendo el método además administrar al sujeto una terapia que comprende oxígeno, hidroxiurea, ácido fólico o una transfusión de sangre.

La invención y otras disposiciones descritas se describen adicionalmente en los siguientes ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

Materiales y métodos

- 5 Las condiciones típicas de reacción por PCR son las siguientes: 1x regulador de reacción (consiste en MgCl<sub>2</sub> a 1.5 mM; 3.0 mM; 4.5 mM (concentración final)); 0.2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 25 pmoles de cada cebador; plantilla de ADN de 50 ng; 3-10% (v/v) DMSO para fundir la estructura (esto es opcional) en un volumen total de 100 µl.
- 10 Las siguientes son las condiciones de reacción típicas o la configuración en el termociclador para la reacción por PCR: 94 °C durante 3-5 minutos, durante este tiempo se agrega 1U de ADN polimerasa o se configura la reacción en hielo y luego se colocan los tubos en la máquina de PCR cuando llegue a 94 °C; seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 1 minuto; 60 °C durante 1 minuto y 70 °C durante 1 minuto; y terminar con 4 °C hasta que se usen muestras de PCR.

Ejemplo 1

Fabricación de miRs sintéticos

- 15 Se construyeron tres miR sintéticos diferentes, dos de los cuales apuntan a BCL11A en diferentes sitios y un tercero que no tiene como objetivo actuar como control. Cada uno de estos miRs se insertó en un vector de expresión constitutivo, un vector inducible por TET y un vector específico eritroide.

Los miR se forman mediante la fusión de oligonucleótidos complementarios, los cuales tienen 4 pares de bases de superposiciones de 5' correspondientes al extremo adhesivo dejado por una digestión de restricción con BbsI.

- 20 BCL11A miR1 oligos:

Oligos BCL11A miR1:

En sentido

ACGCTCGCACAGAACTCATGGATTctccatggttagagAATCCATGAGTG

TTCTGTGCGAG (SEQ ID NO:1)

Antisentido

CGCACTCGCACAGAACTCATGGATTctctaccacatggagAATCCATGAGT

- 25 GTTCTGTGCGA (SEQ ID NO:2)

Oligos BCL11A miR2:

En sentido

ACGCTCCAGAGGATGACGATTGTTTActccatggttagagTAAACAATCGTC

ATCCTCTGGag (SEQ ID NO:3)

Antisentido

CGCActCCAGAGGATGACGATTGTTTActctaccacatggagTAAACAATCGTC

- 30 ATCCTCTGGa (SEQ ID NO:4)

Oligos sin direccionamiento:

En sentido

ACGCTCAACAAGATGAAGAGCACCAActccatggttagagTTGGTGCTCTTC

ATCTTGTTGAG (SEQ ID NO:11)

Antisentido

CGCACTCAACAAGATGAAGAGCACCAActctaccacatggagTTGGTGCTCTT

- 35 CATCTTGTTGA (SEQ ID NO:12)



Los pares de oligonucleótidos se desnaturalizaron y luego se refusionaron (como para el casete de oligo en el protocolo LM-PCR) después de lo cual el casete se purificó usando dispositivos de concentración de microcentrífuga. Mientras tanto, el plásmido O.6.pBKS (miR223) se digirió con BbsI y se purificó mediante una ejecución en un gel de agarosa (sin tratamiento con fosfatasa alcalina). Cada casete de oligo se ligó luego en el constructo O.6.pBKS digerido y se transformó en bacterias competentes (Stbl3). Se recogieron y miniprepararon clones bacterianos para preparar vectores aislados. Los miR sintéticos se secuenciaron usando los cebadores miR223 SEQ FOR y miR223 SEQ REV usando DMSO para fundir la estructura.

miR223 SEQ AVANCE TAAGCTTGATATCGAATTCC (SEQ ID NO:19)

miR223 SEQ REVERSO GCTCTAGAACTAGTGGATCC (SEQ ID NO:20)

## 10 Ejemplo 2

Fabricación de vectores constitutivos de miR

Cada miR se clonó en el esqueleto lentiviral LeGO-V2 de tal manera que la expresión de Venus-miR es impulsada por el promotor constitutivo SFFV.

15 Modificación del ADNc de Venus. El ADNc de Venus se amplificará mediante PCR para agregar un sitio de restricción NaeI al extremo 5' (así como mantener una buena secuencia consenso de Kozak) y un sitio NotI al extremo 3'.

Venus NaeI AVANCE: TTgccggcATGGTGAGCAAGGGCGAGG (SEQ ID NO: 21)

Venus NotI REVERSO: TAGcggccgTACTTGTACAGCTCGTCC (SEQ ID NO: 22)

20 Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa y luego se purificaron. El producto de PCR purificado se clonó con TA en el vector PCR 2.1 TOPO (INVITROGEN™) usando el kit de clonación de TA. Se recogieron clones bacterianos y se minipreparó ADN. Usando el análisis de restricción de digestión, se seleccionaron los clones que a) contienen el producto Venus PCR (digestión con EcoRI) y b) contienen el clon en una orientación donde el NotI que se agregó está al lado del sitio NotI en el polienlazador (es decir, de tal manera que una digestión con NotI no extirpa el fragmento de PCR, sino que simplemente linealiza el vector). Estos clones se secuenciaron usando cebadores de avance y reverso M13.

25 Inserción de las secuencias de miR en el plásmido Venus-PCR 2.1 TOPO. El plásmido Venus -PCR 2.1 TOPO se digirió con NotI, se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternera, luego se corrió en gel de agarosa y se purificó. Los constructos sintéticos miR se extirparon del plásmido O.6.pBKS mediante doble digestión con NotI y PspOMI, seguido de purificación mediante extracción con gel de agarosa. Los insertos miR digeridos se ligaron en el plásmido Venus-PCR 2.1 TOPO y el producto de ligadura se usó para transformar bacterias competentes (Stbl3). Se recogieron y miniprepararon clones bacterianos individuales. Se seleccionaron los plásmidos que contienen el inserto miR en la orientación correcta (es decir, producen el fragmento completo cuando se digieren con NotI y NaeI).

30 Inserción del casete Venus-miR en LeGO-V2. El casete Venus-miR se extirpó de PCR 2.1 TOPO mediante doble digestión con NotI y NaeI, seguido de tratamiento con un fragmento grande de Klenow para embotar el colgante NotI. Este casete se purificó por extracción en gel de agarosa. LeGO-V2 o LeGO G2 se digirió con BamHI y EcoRI, que liberaron el ADNc Venus/eGFP. Este vector linealizado se trató con un fragmento grande de Klenow para embotar los colgantes de EcoRI y BamHI, seguido de la purificación del vector mediante electroforesis en gel de agarosa. El casete Venus-miR purificado y el vector LeGO se ligaron juntos, y el producto se usó para transformar bacterias competentes. Se recogieron clones bacterianos individuales y se minipreparó ADN. Los clones que contienen el inserto en la orientación correcta se seleccionaron y crecieron y se usaron en maxipreparaciones para fabricar sobrenadante viral.

## 40 Ejemplo 3

Fabricación de vectores miR específicos para eritroides

Se adjuntó una señal de poliadenilación a los casetes Venus-miR fabricados descritos anteriormente. Los casetes Venus-miR-PoliA resultantes se insertaron en la orientación antisentido en el vector lentiviral pRRL-HS3-HS2-B-globina específico de eritroides proporcionado por Guilianna Ferrari.

45 Modificación de la señal de poliadenilación BGH. La señal de BGH poliA se amplificó mediante PCR para mantener el sitio de restricción PspOMI en el extremo 5' y agregar sitios NaeI y NotI al extremo 3'.

BGHpA PspOMI AVANCE: CGCTCGAGCATGCATCTAGAGG (SEQ ID NO: 23)

BGHpA NaeI/NotI REVERSO:

TTgccggccgCGCGCTTAATGCGCCGCTACAG (SEQ ID NO: 24)

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa y luego se purificaron. El producto de PCR purificado se clonó con TA en el vector PCR 2.1 TOPO (INVITROGEN™) usando el kit de clonación de TA. Se recogieron clones bacterianos y se minipreparó ADN. Usando el análisis de restricción de digestión, se seleccionaron los clones que contienen el producto PCR de BGHpA (digestión con EcoRI y/o digestión doble con NotI/PspOMI). Estos clones se secuenciaron usando cebadores de avance y reverso M13.

5 Inserción de la secuencia BGHpA en los plásmidos Venus-miR-PCR 2.1 TOPO fabricados descritos anteriormente. El casete BGHpA se extirpó de PCR 2.1 TOPO mediante digestión con PspOMI y NotI, después de lo cual el inserto se purificó por extracción en gel de agarosa. Los constructos Venus-miR-PCR 2.1 TOPO fabricados en la etapa B2 anterior se digirieron con NotI y subsecuentemente se trataron con fosfatasa alcalina intestinal de ternera. El vector linealizado Venus-miR-PCR 2.1 TOPO se purificó corriendo en un gel de agarosa. El inserto BGHpA se ligó en el vector Venus-miR-PCR 2.1 TOPO y el producto se usó para transformar bacterias competentes (Stbl3). Los clones bacterianos individuales se recogerán y se miniprepararán. Se seleccionaron los plásmidos que contienen la secuencia BGHpA insertada en la orientación correcta (produce el inserto completo tras la digestión con NaeI).

10 Inserción del casete Venus-miR-BGHpA en el vector pRRL-HS3-HS2-B-globin. Los casetes Venus-miR-BGHpA se extirparon de PCR 2.1 TOPO mediante digestión con NaeI. Estos insertos se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa. El vector pRRL-HS3-HS2-B-globina se digirió con EcoRV y se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternera. El vector linealizado se purificó por electroforesis en gel de agarosa. Los casetes Venus-miR-BGHpA se ligaron en pRRL-HS3-HS2-B-globina y el producto de ligadura se usó para transformar bacterias competentes. Se recogieron y miniprepararon clones bacterianos individuales. Los plásmidos que contienen los casetes Venus-miR-BGHpA en la orientación correcta en el vector pRRL-HS3-HS2-B-globina se cultivaron para una maxipreparación para que puedan usarse para generar el sobrenadante lentiviral.

#### Ejemplo 4

Los experimentos de interferencia de ARN de células in vitro se realizan como sigue.

25 Las células de eritroleucemia murina mantenidas en cultivo en IMDM con FCS se transdujeron en fibronectina con SFFV-LV (NT = ARNsh mezclado, miR-2 = ARNsh direccionado) a MOI = 2 y se clasificaron para fluorescencia de Venus. El punto de tiempo analizado después de la transducción fue el día 7. Las células fueron > 95% positivas para Venus y se recogieron  $10^6$  células y se extrajo el ARN, se obtuvo ADNc por transcripción reversa y se realizó qPCR en tiempo real para BCL11A y ARNm de globina epsi-gamma con Gapdh como una transcripción de control interno (Figura 3). Se empleó un método de curva estándar para cuantificar la expresión.

30 Se realizaron experimentos de interferencia de ARN In vivo en ratones de la siguiente manera.

35 Las HSC LSK derivadas de donantes BojJ se trasplantaron en ratones C57/BL6 irradiados letalmente después de la transducción en fibronectina con SFFV-LV (NT = ARNsh mezclado, miR-1 = ARNsh direccionado) a MOI = 2. La dosis celular inyectada fue de 100,000 células por ratón. Los animales portadores de WBC positivo de Venus a los 4 meses se agruparon (n = 2) y se clasificó la médula ósea para fluorescencia de Venus después de la tinción de viabilidad (7-AAD) (Figura 3). La extracción de ARN y qPCR se realizó como anteriormente.

#### Ejemplo 5

##### LCR-LV

40 Las células de eritroleucemia murina mantenidas en cultivo en IMDM con FCS se transdujeron en fibronectina con LCR-LV (NT = ARNsh mezclado, miR-1 = ARNsh direccionado) a MOI = 2 y MOI = 100 y se clasificaron para fluorescencia de Venus. El punto de tiempo analizado después de la transducción fue el día 7. Las células fueron > 95% positivas para Venus y se recogieron  $10^6$  células y se extrajo el ARN, se obtuvo ADNc por transcripción reversa y se realizó qPCR en tiempo real para BCL11A y ARNm de globina epsi-gamma con Gapdh como una transcripción de control interno (Figura 4). Se empleó un método de curva estándar para cuantificar la expresión.

##### TET-LV

45 Las células de eritroleucemia murina mantenidas en cultivo en IMDM con FCS se transdujeron en fibronectina con TET-LV (NT = ARNsh mezclado, miR-1 = ARNsh direccionado) a MOI = 2 y se clasificaron para fluorescencia de Venus después de la exposición a doxiciclina a concentraciones diferenciales. El punto de tiempo analizado después de la transducción fue el día 7. Las células fueron > 95% positivas para Venus y se recogieron  $10^6$  células y se extrajo ARN, se obtuvo ADNc por transcripción reversa y se realizó qPCR en tiempo real para ARNm de globulina epsi-gamma con Gapdh como transcripción de control interno (Figura 4). Se empleó un método de curva estándar para cuantificar la expresión.

50

#### Ejemplo 6

Las HSC circulantes CD34+ derivadas de pacientes con SCD de sangre periférica se fraccionaron del material de aféresis desechado (aproximadamente 200 ml,  $10^6$  células CD34+). Las células se transdujeron con SFFV-LV (NT =

ARNsh mezclado, miR-1 = ARNsh direccionado) a MOI = 2 en fibronectina y se diferenciaron según se modificó de Giarratana et al. (Nat Biotech 2005). Las células se analizaron por adquisición madurativa de marcadores de superficie eritroide (GPA, CD71) por citometría de flujo. Las células eritroides adquieren secuencialmente morfosis eritroblástica y eritrocitaria y expresan la fluorescencia de Venus. Las células se recolectan en la etapa de diferenciación terminal y se extrae el ARN y se realiza un análisis de qPCR para evaluar la inducción de ARNm de gammaglobina por miR-1 SFFV-IV en comparación con el control codificado (NT) (Figura 5).

#### Ejemplo 7

Las HSC circulantes CD34+ derivadas de pacientes con SCD de sangre periférica se fraccionaron del material de aféresis desechado (aproximadamente 200 ml, 10<sup>6</sup> células CD34+). Las células se transdujeron con LCR-LV (NT = ARNsh mezclado, miR-1 = ARNsh direccionado) a MOI = 2 en fibronectina y se inyectaron a 30,000 células/animal en ratones NSG irradiados sub-letalmente sin clasificación previa. Los animales se desangraron 4 semanas después de la inyección y los glóbulos rojos se fijaron y se permeabilizaron. La tinción de HbF se realizó e identificó un animal LCR-LV-miR-1 con niveles de HbF humana al 10% (Figura 6).

#### Ejemplo 8

Las HSC humanas CD34+ derivadas de sangre del cordón umbilical se transdujeron en fibronectina con SFFV-LV (NT = ARNsh mezclado, miR-1 = ARNsh direccionado) a MOI = 2 y se clasificaron para fluorescencia de Venus. Las células también se visualizaron por microscopía fluorescente en el estroma MS-5. Las células se diferenciaron a lo largo de la ruta linfopoyética B por métodos modificados de Luo et al. (Sangre 2009). Las células se analizaron semanalmente para la adquisición de marcadores de superficie de linfocitos B maduros y la pérdida de marcadores progenitores inmaduros para identificar un bloqueo en la diferenciación causada por la anulación de BCL11A a través de SFFV-LV. Las células se recogieron en puntos de tiempo semanales, y el ARN se extrajo para verificar la anulación de ARNm de BCL11A mediante la selección de ARNsh mediante SFFV-LV-miR-1 (Figura 7).

#### Ejemplo 9

Optimización de ARNshs embebidos con microARN impulsado por ARN polimerasa II del vector lentivirus para un procesamiento mejorado y anulación eficiente de BCL11A para la hemoglobina ofensiva de inducción en células eritroides.

La tecnología de interferencia de ARN (ARNi) que utiliza ARN de horquilla corta (ARNsh) expresada a través de promotores de pol III ha sido ampliamente explotada para modular la expresión génica en una variedad de tipos de células de mamíferos. Para lograr el direccionamiento específico de linaje de los ARNm, se requiere la expresión de los ARNsh a través de los promotores de pol II, lo que requiere embeber el ARNsh en secuencias de microARN de mamífero (ARNshmiR) para la expresión y el procesamiento. Aquí, con el fin de lograr la anulación del factor de transcripción de BCL11 en células hematopoyéticas, que tiene una aplicación traduccional directa en hemoglobinopatías, se comparó la eficiencia de la modulación de ARNm a través de vectores lentivirales basados en pol III versus pol II. La represión de la proteína BCL11A podría representar un objetivo terapéutico para la enfermedad de células falciformes y las  $\beta$ -talasemias, ya que se ha demostrado que su anulación induce la expresión del gen fetal de HBG ( $\gamma$ -globina) que en última instancia conduce a mejorar los niveles del tetrámero de hemoglobina fetal (HbF,  $\alpha_2\gamma_2$ ). En el ratón, BCL11A es un represor clave del gen Hbb-y murino que representa un homólogo de HBG murino. Los inventores demuestran una inducción de Hbb-y hasta 100-1000 veces menor debido a la eficiencia reducida de anulación de BCL11A usando esqueletos de vector de ARNsh mediado por ARNshmiR versus pol III. Con el fin de comprender la base molecular de estas diferencias, los inventores realizaron análisis de la secuencia de ARN pequeña de las células transducidas por múltiples pares de ARNsh-ARNshmiR. Los inventores muestran que los ARNsh expresados a través de un promotor U6 pol III producen secuencias de cadena de guía que difieren en un desplazamiento de 4 pb en comparación con las secuencias de cadena de guía madura impulsadas por pol II (ARNshmiR). La secuenciación de ARN demostró que el tramo de uridinas que forma parte de la señal de terminación de pol III se transcribe y se incluye en el extremo 3' del ARNsh maduro en un esqueleto de vector de pol III. La ausencia de estas secuencias adicionales está asociada con un desplazamiento correspondiente en el sitio de escisión del Dicer, generando así un ARNsh maduro diferente con una secuencia de semillas alternativa que influye en la eficacia de la anulación de genes diana en vectores basados en pol II. Además, tanto la abundancia absoluta como la relación de cadena guía a pasajera son significativamente diferentes en las células transducidas ya sea con vectores basados en pol II o pol III. La incorporación de un desplazamiento de 4 pb en la cadena guía de ARNshmiR dio como resultado una secuencia de ARNsh procesada fielmente (una secuencia de cadena guía madura idéntica a los ARNsh impulsados por U6) y una eficiencia mejorada de anulación de BCL11A en un 50-70% a nivel de proteína y se asoció con un aumento de 100-300 veces de la inducción de Hbb-y en células de eritroleucemia murina. Los inventores han descubierto una estrategia modificada para el diseño prospectivo de los esqueletos del vector ARNshmiR para lograr la regulación específica de linaje de genes diana.

#### Ejemplo 10

Optimización de shRN embebido en miARN como para la anulación de BCL11A específica de linaje y la inducción de hemoglobina F. Materiales y métodos

## Diseño y cribado de ARNshs

Se obtuvieron vectores lentivirales impulsados por el promotor U6 (pol III-puro) que expresan diferentes ARNm de BCL11A/BCL11A direccionados a ARNsh del Broad Institute (Cambridge, MA). El pol III-puro tiene un marcador de selección de puomicina impulsado por el promotor hPGK. Más de 100 ARNsh direccionados ya sea a las formas XL/L o solo a la forma XL y la región 3'UTR se cribaron en células MEL en un formato de 96 pozos utilizando una placa Qiagen Turbocapture y con una reacción Taqman qRT-PCR multiplexada que mide Gapdh y Hbb-y.

## Construcción de constructos de ARNshmiR

Los vectores ARNshmiR se construyeron clonando las secuencias de ARNsh con secuencias mir223 flanqueantes en el vector lentiviral LeGO-V2 que contiene un informador de Venus impulsado por SFFV (28). Las secuencias de ARNshmiR con el bucle mir223 fueron sintetizadas por genscript USA Inc. (NJ, EE. UU.) y los ARNsh<sup>miR</sup> resultantes se clonaron en el esqueleto de pol II corriente abajo de la secuencia de codificación de Venus usando sitios XbaI y BamHI. Todas las secuencias de ARNsh se listan en la Figura 21A. Se diseñó una secuencia de ARNsh de control no direccionada y se denominó como SFFV-ARNshmiRNT o NT en forma abreviada. El vector SFFV-GFP, que no contiene ningún casete de ARNsh y que expresa GFP a través de un promotor SFFV, se usó como un control simulado (33).

## Producción de virus y titulación

Los sobrenadantes de vectores lentivirales se generaron cotransfiriendo 10 µg de vectores de transferencia lentivirales, 10 µg de gag-pol, 5 µg de rev y 2 µg de plásmidos de empaquetamiento VSVG en células HEK293T en una placa de cultivo de 10 cm usando reactivo de fosfato de calcio (INVITROGEN™). Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 h y 48 h después de la transfección, se filtraron a través de una membrana de 0.4 micrones (CORNING®, NY, EE. UU.) y subsecuentemente se concentraron por ultracentrifugación a 23000 rpm durante 2 h en una centrifuga Beckmann XL-90 utilizando cubetas oscilantes SW-28. Para determinar el título, las células NIH3T3 se infectaron con el virus en presencia de polibreno (8 µg/ml) y se analizaron 48 h después de la transducción por FACS para la expresión de Venus (constructos de pol II) o por selección de puomicina (1 mg/ml, constructos de pol III).

## Cultivo de células

Las células 3T3, 293T y MEL se mantuvieron en medio Eagle o RPMI modificado de DULBECCO suplementado con suero de ternera fetal al 10%, penicilina-estreptomina al 2% y glutamina 2 mM, respectivamente.

## Cultivo de diferenciación eritroide in vitro

Se obtuvieron reservas congeladas de células CD34+ humanas primarias de sangre periférica movilizada de donantes sanos (Center of Excellence in Molecular Hematology at Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle or the Flow Core at Boston Children's Hospital) de acuerdo con un protocolo aprobado por la BCH Institutional Review Board. El protocolo de diferenciación eritroide utilizado se basa en un protocolo e 3 fases adaptado de (48). Las células se cultivaron en medio de diferenciación eritroide (EDM) basado en IMDM (medio DULBECCO modificado por Iscove), (CELLGRO®) suplementado con glutamina estabilizada, 330 µg/ml de transferrina holohumana (SIGMA®), 10 µg/ml de insulina humana recombinante (SIGMA®), 2 UI/ml de heparina Choay (SIGMA®) y plasma inactivado (S/D) por virus solvente/detergente al 5%. Durante la primera fase de expansión (días 0 a 7), se cultivaron células CD34+ en EDM (medio diferenciado eritroide) en presencia de hidrocortisona (HC) 10<sup>-6</sup> M (SIGMA®), SCF 100 ng/mL (R&D SYSTEMS™), 5 ng/ml de IL-3 (R&D SYSTEMS™,) y 3 UI/ml de Epo (AMGEN®). El día 4, las células se resuspendieron en EDM que contenía SCF, IL-3, Epo y HC. En la segunda fase (días 7 a 11), las células se resuspendieron en EDM suplementado con SCF y Epo. En la tercera fase (día 11 al día 18), las células se cultivaron en EDM suplementado con Epo solo. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

## Transducción y citometría de flujo para cultivo in vitro

Las células MEL y CD34+ se transdujeron con vectores lentivirales que expresan U6-ARNsh o SFFV-ARNshmiR en presencia de polibreno (8 µg/ml) (SIGMA-ALDRICH® Corp. St. Louis, MO, EE. UU.) Para células MEL y prostaglandina E2 10 µM y 2 µg/ml de polibreno para células CD34+ se centrifugan durante dos horas a (2000 rpm) a temperatura ambiente. Las células vivas se clasificaron ya sea para la expresión de Venus (vectores pol II) 48 h después de la transducción usando BD FACS Aria II (BD BIOSCIENCES®) o las células se seleccionaron en presencia de puomicina (1 mg/ml, constructos pol III). Para el análisis FACS se incluyó 7AAD (INVITROGEN™) como marcador de células muertas. Las células CD34+ se marcaron con Aloficocianina (APC), ficoeritrina (PE) y anticuerpos conjugados PE-Cyanine7. Los anticuerpos anti-CD235 (glicoforina A) -PE, anti-CD71-APC o anti-CD71-PE-Cyanine7 y DRAQ-5 (todos EBIOSCIENCE®) se usaron para el fenotipado. Los análisis se realizaron en el citómetro de flujo LSR-II (BECTON DICKINSON®) utilizando el software Diva o FloJoX (TREESTAR™).

## Aislamiento, transducción y citometría de flujo para experimentos de trasplante de ratón

Las células de médula ósea de ratón con linaje negativo se aislaron lavando fémur, tibia y cadera de ratones CD45.1 BoyJ (B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ) y CD45.2 B6 (C57BL/6J) seguido de agotamiento de linaje usando el kit de

agotamiento de la célula de linaje de ratón (Miltenyi, Biotec Inc., San Diego, EE. UU.). Las células se cultivaron a una densidad de  $0.2-1 \times 10^6$  células/ml en 100 ng/ml mSCF, 20 ng/ml mL-3 (ambos PEPROTECH®, Rocky Hill, EE. UU.), 100 ng/ml hFlt3-L y 100 ng/ml hTPO (ambos CELLGENIX®, Portsmouth, EE. UU.) en medio STEMSPAN™ SFEM (Tecnologías STEMCELL®, Vancouver, CA). Después de 24 h, las células de preestimulación se transdujeron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml a una MOI de 40 y se trasplantaron en receptores irradiados letalmente (7 + 4Gy, dosis dividida) tres días después del aislamiento. Para los experimentos de repoblación competitiva, se mezcló un número igual de células de diferentes grupos de transducción antes del trasplante en CD45.2 o receptores doblemente positivos CD45.1/CD45.2 heterocigotos ( $0.4 - 1 \times 10^6$  por animal). Las mezclas de células se analizaron mediante citometría de flujo para confirmar contribuciones iguales de ambas fracciones celulares de la competencia, y se reajustaron si fuera necesario. El análisis de sangre periférica, médula ósea y bazo se realizó en múltiples puntos de tiempo utilizando los siguientes anticuerpos: CD45.1, CD45.2, B220, CD11b, CD3, CD71, Ter119 y colorante de viabilidad reparable EFLUOR780®. Para el análisis del linaje eritroide se omitió la lisis de glóbulos rojos. Los análisis se realizaron en citómetros de flujo LSR-II o LSRFortessa (BECTON DICKINSON®) y el software Diva o FloJoX (Treestar™). Los análisis de datos y las estadísticas se realizaron usando Excel (MICROSOFT®) y GRAPHPAD PRISM® 5.

Para el trasplante de células hCD34, se irradiaron ratones hembra NSG de ~10 semanas (NOD/LtSz-scid Il2rg -/-) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) con 2.7Gy seguido de inyección de  $\sim 10^6$  células por animal tres días después de aislamiento. Los ratones irradiados fueron alimentados con agua suplementada con BAYTRIL® durante 14 días.

#### Extracción de ARN y qRT-PCR

El ARN total se extrajo de las células MEL 7 días después de la clasificación/selección posterior con puromicina, o células recién clasificadas el día 18 de diferenciación eritroide de células CD34+, usando el micro kit QIAGEN® RNA Plus (Valencia, CA). El cDNA se generó usando cebadores hexámeros aleatorios y superíndice III (INVITROGEN™, Carlsbad, CA). La PCR cuantitativa se realizó utilizando la mezcla maestra de PCR verde SYBR® (APPLIED BIOSYSTEMS®, Warrington, Reino Unido) con cebadores Hbb-y y Gapdh de ratón que abarcan intrones (Hbb-y avance 5'-TGGCCTGTGGAGTAAGGTCAA-3' (SEQ ID NO: 98), reverso 5'-GAAGCAGAGGACAAGTTCCCA-3' (SEQ. ID. NO: 69)), (Gapdh avance 5'-TCACCACCATGGAGAAGGC-3' (SEQ. ID. NO: 70), reverso 5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGA-3' (SEQ. ID NO: 71)) y cebadores humanos HBG, HBB y GAPDH (HBG avance 5'-TGGATGATCTCAAGGGCAC-3' (SEQ. ID. NO: 72), reverso 5'-TCAGTGGTATCTGGAGGACA-3' (SEQ. ID. NO: 73 )) (HBB avance 5'-CTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA-3' (SEQ. ID. NO: 74), reverso 5'-AGCATCAGGAGTGGACAGAT-3' (SEQ. ID. NO: 75)) y GAPDH avance 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3' (SEQ. ID. NO: 76), reverso 5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3' (SEQ. ID. NO: 77)). Las condiciones de amplificación por PCR fueron: 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 min a 60 °C. Las qPCR se realizaron en una máquina ABI® 7500 (APPLIED BIOSYSTEMS®, Foster City, CA). Se usó una curva estándar usando diluciones en serie de ADNc para determinar la eficacia de amplificación precisa para cada reacción. Los niveles de expresión de Hbb-y y  $\gamma$ -globina se normalizaron a GAPDH como control interno, y se usó la expresión génica relativa (método  $\Delta\Delta Ct$ ) para el análisis de los datos de PCR, incluida la corrección de las eficiencias de amplificación diferencial.

#### Análisis por inmunotransferencia Northern

Las células MEL transducidas con U6-ARNshs y SFFV- ARNsh<sup>miR</sup>s se clasificaron y recolectaron después del cultivo de selección de puromicina durante 7 días. El ARN total se aisló usando 1 ml de reactivo TRIZOL® (AMBION®), y 15  $\mu$ g se resolvieron en un gel de acrilamida al 15%. Los tamaños de transcripción pequeños se determinaron usando la Decade Ladder (AMBION®, Austin, TX). El ARN se transfirió a la membrana HYBOND™ -XL (AMERSHAM™, Piscataway, NJ) y se entrecruzó con UV. Las transferencias se hibridaron previamente usando UltraHyb-Oligo (AMBION®, Austin, Tx) a 35 °C, sondeados con oligonucleótidos marcados con  $\gamma$ -32P (4 polinucleótidos quinasa; AMERSHAM™, Piscataway, NJ) a 37 °C durante una hora, se lavó en 2x citrato de sodio, 0.1% de dodecilsulfato de sodio a 30-35 °C, y se expuso a una película. Las secuencias de la sonda para detectar miARN maduro fueron las siguientes: ARNsh1, 5' CGGAGACTCCAGACAATCGC 3' (SEQ. ID. NO: 78); ARNsh2, 5' CTCCAGGCAGCTCAAAGATC 3' (SEQ. ID. NO: 79); ARNsh3, 5' TCTCTTGCAACACGCACAGAG 3' (SEQ. ID. NO: 80); ARNsh4, 5' CAGGACTAGGTGCAGAATGT 3' (SEQ. ID. NO: 81); ARNsh5, 5' ATCGAGTGTGAATAATGAT 3' (SEQ. ID. NO: 82); ARNsh6, 5' GTACCCTGGAGAAACACAT 3' (SEQ. ID. NO: 83); ARNsh7, 5' ACTGTCCACAGGAGAAGCCA 3' (SEQ. ID. NO: 84); ARNsh8, 5' CAGTACCCTGGAGAAACACA 3' (SEQ. ID. NO: 85).

#### Análisis por inmunotransferencia Western

Las células MEL y CD34+ transducidas se sometieron a lisis en regulador de lisis (RIPA) con proteasa (ROCHE®) e inhibidores de fosfatasa (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY®), pepstatina y leupeptina (SIGMA). Los lisados de proteínas se estimaron mediante el ensayo de proteínas BCA (THERMO SCIENTIFIC). Se suspendieron 25  $\mu$ g de proteína en un regulador de muestra Laemmli 2X, se hirvió y se cargó en un gel de SDS-poli-acrilamida al 8% y subsecuentemente se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (MILLIPORE®). Después del bloqueo en PBS con Triton-X100 al 0.1% y leche en polvo sin grasa al 5%, la membrana PVDF se incubó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BCL11A (ABCAM®) o anti- $\beta$ -actina de ratón (SIGMA®). El anticuerpo secundario

enlazado a IgG HRP antiratón (CELL SIGNALING®) se usó para la detección por quimioluminiscencia de reactivo LUMIGLO® 20X y peróxido 20X (CELL SIGNALING®).

#### Análisis por HPLC

5 Los hemolizados se prepararon a partir de células el día 18 de diferenciación usando lisis osmótica en agua y tres ciclos rápidos de congelación-descongelación. La electroforesis de hemoglobina con acetato de celulosa y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se llevaron a cabo con los lisados, en los laboratorios clínicos del Brigham and Women's Hospital, utilizando estándares clínicamente calibrados para las hemoglobinas humanas.

#### Secuenciación y análisis de ARN

10 Se extrajeron pequeños ARN de  $6 \times 10^6$  células MEL usando el kit de aislamiento de miARN mirVana (INVITROGEN™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se enviaron para una secuenciación profunda de ARN usando ILLUMINA® HiSeq2000. Se usó una secuencia de comandos PERL de desarrollo propio para eliminar la secuencia del adaptador, y se utilizaron 19-25 nt ARN pequeños para su posterior análisis. Se usó el software BOWTIE (obtenido del sitio web de Internet en bowtie-bio period sourceforge period net) para la alineación, y se permitió 1 falta de coincidencia. El nivel de expresión de ARN pequeños se normalizó a un millón de lecturas totales de cada biblioteca para la comparación entre diferentes muestras. Para el experimento con 250 ARNsh TRC en 4 líneas celulares, el Broad Institute preparó lentivirus usando un protocolo de preparación de virus de alto rendimiento y las células se infectaron a un MOI alto con un solo ARNsh por pozo en placas de 96 pozos (los protocolos se obtienen de El sitio web de Internet del Broad Institute en Cambridge, MA, EE. UU., en la sección de recursos públicos de ARNi bajo "puromicina") se agregó 1 día después de la infección y las células se sometieron a lisis en TRIZOL® a los 4 días después de la infección. Todos los lisados se agruparon para cada línea celular, seguido de extracción de ARN total y preparación de una pequeña biblioteca de ARN (49). Las lecturas de ILLUMINA® se recortaron, se colapsaron a lecturas únicas (> 17nt) con recuentos, y se mapearon a secuencias de vectores de expresión de ARNsh TRC que no permitían no coincidencias. Se calcularon distribuciones de secuencia de ARNsh maduras para cada ARNsh antes de promediar a través de ARNsh.

#### 25 Análisis estadístico

El paquete de software GRAPHPAD PRISM® 5.0 se utilizó para el análisis estadístico. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (SD). La significación estadística se evaluó mediante prueba t.

#### Resultados

30 Disminución de la eficiencia de anulación de BCL11A por ARNshs embebidos en un andamio de microARN (ARNshmiR) en comparación con ARNshs simples de tallo-bucle

35 Para identificar los ARNsh candidatos que median la anulación efectiva de BCL11A, se cribó en células MEL una biblioteca lentiviral de 118 ARNsh que direccionan secuencias codificantes de ARNm de BCL11A conservadas entre humanos y ratones. Los ARNsh se expresaron a partir de un promotor U6 basado en pol III (Figura 19A, panel izquierdo) en el esqueleto de lentivirus LKO (26) que contiene un gen de resistencia a la puromicina para la selección denominado LKO-U6-BCL1 1A-ARNsh<sup>miR</sup> (de aquí en adelante U6-ARNsh). Las células MEL, una línea celular comúnmente utilizada para el estudio de la regulación del gen de la globina, se transdujeron con los vectores lentivirus que expresan ARNsh en una multiplicidad de infección (MOI) de 2. La expresión normalizada del ARNm de Hbb-y de ratón embrionario, que sirve como un homólogo funcional del gen de la  $\gamma$ -globina humana (27) proporciona una lectura indirecta de la anulación de BCL11A (Figura 19B, eje y). Como segunda lectura, el conjunto de ARNsh también se cribó utilizando una línea celular informadora de MEL que albergaba un reemplazo de mCherry en el locus Hbb-y (D. Bauer, no publicado). La inducción del indicador fluorescente se analizó por citometría de flujo (Figura 19B, eje x). Ocho ARNshs (marcados y nombrados como ARNsh1 a 8 en la Figura 19B) que indujeron consistentemente la expresión del indicador Hbb-y y mCherry en células MEL se clonaron en secuencias de flanco y bucle microARN223 (miR-223) humanas para crear microARNs sintéticos (ARNshmiR) con El objetivo de desarrollar vectores de expresión específicos de linaje para la anulación de BCL11A. Para el análisis inicial, este casete se incorporó en el vector lentiviral pLeGO (28) (Figura 19A, panel derecho) en la región no traducida 3' del informador fluorescente Venus bajo el control del fuerte y expresado de manera ubicua promotor/potenciador virus formador de foco en el bazo (SFFV) llamado LEGO-SFFV-BCL11A-ARNshmiR (en adelante SFFV-ARNshmiR).

50 La eficacia de la anulación de los ARNsh que incorporaron las mismas secuencias de coincidencia de objetivos de 21 bases se comparó directamente, pero en el contexto de los casetes de expresión pol III y pol II (es decir, U6-ARNshs versus SFFV-ARNshmiRs) en células MEL utilizando un ARNsh no direccionado (NT) como control negativo. La proteína BCL11A se detectó por inmunotransferencia en lisados celulares de células MEL transducidas a una MOI de 2 (Figura 19C). La anulación de BCL11A fue consistentemente menos eficiente en células que expresan SFFV-ARNshmiR en comparación con U6-ARNshs (Figura 19C). Para confirmar la importancia funcional de esta diferencia, los inventores midieron la inducción de los niveles de ARNm de Hbb-y mediante qRT-PCR (Figura 19D) en poblaciones homogéneas de células transducidas obtenidas bien sea por selección de puromicina o por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). La eficiencia de anulación reducida de SFFV-ARNshmiRs en comparación con U6-ARNshs (véase Figura 19C) se tradujo en una inducción significativamente menor de Hbb-y por SFFV-ARNshmiRs

(Figura 19D) y las diferencias en la inducción de Hbb-y parecen más pronunciadas que la inducción de Hbb-y. diferencias en la anulación de BCL11A.

SFFV-ARNshmiR y U6-ARNsh dan lugar a diferentes secuencias de cadena de guía madura

5 Para comprender la base molecular de estas diferencias, se realizó la secuenciación de ARN pequeños a partir de células transducidas con diversos U6-ARNsh y sus correspondientes contrapartes de SFFV-ARNshmiR. Se planteó la hipótesis de que las diferencias significativas en la inducción de Hbb-y se debían a la producción de diferentes cadenas de guía maduras a partir de las distintas transcripciones que contienen ARNsh que se producen a partir de los contextos pol II y pol III. Por lo tanto, se evaluaron las secuencias de cadena guía procesadas de los contextos U6-ARNshs y SFFV-ARNshmiR (Figuras 20A y B). Los ARN de guía maduros encontrados más abundantemente producidos a partir de SFFV-ARNshmiR correspondían estrechamente a la secuencia madura predicha in silico (Figura 20B). En contraste, la mayoría de los ARNsh U6 produjeron secuencias de cadena guía maduras que coinciden con el producto Dicer predicho que consiste en ~22nt del extremo 3' del transcrito pol III, incluyendo un tramo de 3-5 nt derivado de la señal de terminación pol III, pero que carece de un número correspondiente de nucleótidos de la secuencia coincidente objetivo en el extremo 5'. Se observó una distribución similar de productos procesados en un cribado a gran escala de 247 diferentes U6-ARNsh en líneas celulares A549, MCF7, Jurkat y U937, en las que la secuencia de la cadena guía predominante tiene una longitud promedio de 22 nt con su extremo 5' comenzando 4 bases de la secuencia de bucle constante. Se realizó una secuenciación profunda de 247 productos de ARNr de TRC procesados en estas cuatro líneas celulares (Figura 25). Los resultados indican que la cadena guía madura predominante comienza en la posición 4 de la secuencia antisentido del ARNsh e incluye cuatro residuos U terminales 3'. El procesamiento fue generalmente consistente entre líneas celulares y entre diferentes secuencias de ARNsh. La frecuencia de lectura promedio para cada secuencia madura se pondera por igual a través de los ARNsh, aunque algunos ARNsh generaron > 1,000 veces más lecturas que otras. La naturaleza semicuantitativa de la secuenciación de ARN pequeño, debido a los fuertes sesgos de ARN ligasa durante la preparación de la biblioteca, hace que las comparaciones de expresión relativa o niveles de procesamiento sean imposibles, pero las tendencias consistentes a través de líneas celulares y ARNsh demuestran la probable identidad predominante de la cadena guía. También se detectaron lecturas de cadena en sentido (<30% por ARNsh en promedio), con la gran mayoría comenzando con 'GG' y extendiéndose 20nt en la secuencia de cadena en sentido. Estas secuencias maduras son exactamente consistentes con un producto Dicer de la transcripción primaria de hU6 ARNsh, sin necesidad de invocar una etapa de procesamiento Drosha/DCGR8. Tomados en conjunto, estos hallazgos indican la importancia de considerar los eventos de procesamiento que generan secuencias maduras a partir de transcripciones de ARNshmiR pol II y ARNsh pol III cuando se transfieren secuencias de ARNsh entre vectores. Las distribuciones muy similares de secuencias maduras observadas para los cuatro tipos de células que se estudiaron sugieren que estos patrones de procesamiento se generalizarán en diferentes contextos celulares. Las diferencias en la secuencia de cadena guía madura generada en los vectores basados en pol III versus a pol II contribuyen sustancialmente a la subregulación diferencial de BCL11A observada con los U6-ARNshs en comparación con los SFFV-ARNshmiR. Estos datos sugieren que las conversiones pronosticadas entre los vectores pol III y pol II pueden ser posibles considerando la escisión Drosha y Dicer de los ARNsh de pol II en comparación con la escisión Dicer de los ARNsh de pol III.

La modificación de secuencias de ARNsh en un vector basado en pol II conduce a una eficiencia mejorada de anulación

40 Sobre la base de estos hallazgos, los inventores plantearon la hipótesis de que el uso de la secuencia madura predicha de los vectores ARNsh de pol III cuando se transfieren secuencias a SFFV-ARNshmiR conduciría a una eficiencia mejorada de anulación. Por lo tanto, se diseñó un conjunto de SFFV-ARNshmiR que contenía un desplazamiento de 4 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia de la cadena guía (Figura 21A). En el extremo 3', se añadieron los nucleótidos GCGC para lograr una mayor estabilidad termodinámica del extremo 3' en el dúplex de ARNIP, lo cual debería promover la carga preferencial de RISC de la cadena guía deseada. El efecto de las modificaciones sobre la eficiencia de anulación y la inducción de Hbb-y se evaluó en células MEL mediante inmunotransferencia y qRT-PCR, respectivamente. Se observó una eficiencia mejorada de anulación de la proteína BCL11A con SFFV-ARNshmiR1, 3 y 8 (Figura 21B). La anulación mejorada se correlacionó con una inducción aumentada de 200 a 400 veces de las transcripciones de Hbb-y (Figura 21C). Los otros SFFV-ARNshmiRs no mostraron un aumento apreciable en la eficiencia de anulación. Para comprender más completamente el mecanismo subyacente a la eficiencia mejorada de los SFFV-ARNshmiRs modificados 1, 3 y 8, se analizó la abundancia de ARN pequeños de la cadena de guía y pasajera y sus proporciones por inmunotransferencia Northern. Primero, se observó una mayor abundancia de cadena guía para los vectores pol III versus pol II en todos los casos. Adicionalmente, particularmente para los SFFV-ARNshmiRs 1 y 3 modificados, se encontró una mayor abundancia y una mayor relación de cadenas guía a pasajeros frente a los ARNshmiRs no modificados, mientras que estos parámetros no se vieron afectados por SFFV-ARNsh8 (Figura 21D). Se realizó una secuenciación profunda de ARN pequeños para evaluar el impacto de la modificación en las secuencias de la cadena guía y para correlacionarla con los cambios observados en la anulación de BCL11A. En general, las secuencias procesadas resultantes reflejan el desplazamiento de 4 nt introducido, lo que da como resultado una cadena guía con regiones de semillas similares a las secuencias obtenidas de los ARNsh de pol III expresados en el esqueleto de LKO. Para SFFV-ARNshmiRs 1, 3 y 8, se encontró una secuencia dominante única, la cual contrasta con los SFFV-ARNshmiR menos efectivos que mostraron una distribución más amplia de secuencias.

Efecto de la modificación de ARNshmiR sobre la anulación de BCL11A y la inducción de  $\gamma$ -globina en células eritroides primarias derivadas de CD34+ humanas

La reactivación de la globina fetal con la anulación de BCL11A tiene potencial terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes y la  $\beta$ -talasemia. Para evaluar el efecto de SFFV-ARNshmiR modificado sobre la eficiencia de anulación de BCL11A y la inducción de la expresión de  $\gamma$ -globina y HbF en células humanas primarias, se transdujeron HSPC CD34+ de sangre periférica movilizada (mPB) de G-CSF de voluntarios sanos con vectores que expresan U6-ARNsh, SFFV-ARNshmiR y SFFV-ARNshmiR modificados y luego sometidos a diferenciación eritroide. Después de once días en cultivo, los niveles de BCL11A se determinaron mediante inmunotransferencia de Western (Figura 22A). Consistente con los hallazgos en las células MEL, se observó una anulación mejorada con SFFV-ARNshmiRs 1,3 y 8 modificados, lo que también condujo a una mayor inducción de los transcritos de  $\gamma$ -globina (Figura 22B). El estado de la diferenciación eritroide se evaluó en el día 18 de cultivo mediante análisis de citometría de flujo para la expresión de superficie de CD71 y GpA y enucleación. No se observaron diferencias significativas entre SFFV-ARNshmiR y las muestras transducidas de vector de control (Figura 22C). En contraste, los U6-ARNsh condujeron a un retraso leve en la adquisición de marcadores de diferenciación durante las fases posteriores de maduración, lo que podría indicar toxicidad debido a la sobreexpresión de ARNsh mediada por el promotor U6. Las observaciones de alta inducción de ARNm de  $\gamma$ -globina se confirmaron mediante el aumento de la proteína HbF medida por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los tres ARNshmiR modificados probados produjeron un aumento de la producción de HbF en comparación con los ARNshmiR SFFV no modificados (Figura 22D), donde entre 40-50% de la hemoglobina total en las células eritroides era HbF. La correlación entre el ARNm de  $\gamma$ -globina y la proteína HbF fue alta ( $r^2 = 0.96$ ), lo que respalda la fiabilidad de los análisis (Figura 22E).

En resumen, los inventores han demostrado que los ARNsh embebidos en un andamio de miARN y expresados a través de promotores pol II se procesan para producir diferentes ARNip maduros en células transducidas en comparación con el ARNip expresado desde el promotor U6. La secuencia coincidente con el objetivo en el ARNsh maduro derivado del constructo del promotor pol III se desplaza uniformemente 3' por 3-5 nt y esta diferencia se asoció con diferencias significativas en la eficiencia de anulación de la transcripción objetivo. En el caso de BCL11A, un objetivo terapéutico potencial, esto condujo a diferencias apreciables en la reactivación de la expresión de  $\gamma$ -globina. Estos datos demuestran la importancia de la optimización del diseño cuando se transfieren secuencias de ARNsh a un andamio de microARN para permitir la expresión mediada por pol II.

La anulación ubicua de BCL11A en las células madre hematopoyéticas y progenitoras (HSPC) perjudica la reconstitución hematopoyética y puede evitarse direccionando la expresión de ARNshmiR a las células eritroides

El impacto de la expresión de SFFV-ARNshmiR in vivo se evaluó en un modelo de ratón de transducción y trasplante de HSPC. Las HSPC de linaje negativo (lin-) de la médula ósea de ratones  $\beta$ -YAC que expresan el marcador de la superficie celular CD45.2 se transdujeron ex vivo con vectores SFFV-ARNshmiR o un vector no direccionado (SFFV-ARNshmiRNT) y se trasplantaron a ratones receptores BoyJ CD45.1 irradiados letalmente. Las células no transducidas se trasplantaron en un grupo de control. Los ratones  $\beta$ -YAC albergan el locus de la  $\beta$ -globina humana como un transgen que está regulado por el desarrollo en el entorno del ratón, mostrando expresión diferencial de genes de  $\beta$ -globina fetal y de adulto. Para fines de validación y para una mejor comparación con los datos publicados previamente, se empleó un ARNsh bien descrito (23, 27, 29) (aquí denominado ARNshmiR\*) embebido en secuencias flanqueantes de miARN223. A las 4, 8 y 12 semanas después del trasplante, se determinó el injerto de células del donante basándose en el quimerismo CD45.1 y CD45.2 (Figura 23A). El injerto de células de donante siguió el patrón esperado con un injerto casi completo en sangre periférica (PB) y médula ósea (BM) después de 8 semanas. Sin embargo, inesperadamente, la fracción de células modificadas genéticamente disminuyó abruptamente con el tiempo (Figura 23B). A pesar de las tasas de transducción iniciales de ~40% usando el vector de anulación de BCL11A, el marcado de genes en la semana 12 fue solo del 2-3% del total de células CD45 derivadas de donantes. La sobreexpresión de SFFV-ARNshmiR NT también se asoció con un injerto reducido de células modificadas genéticamente, pero en menor medida, lo que indica tanto toxicidad específica de secuencia como no específica en las células HSPC de injerto. El momento de la pérdida de células donantes que expresan ARNsh sugiere un efecto sobre el compartimento de células madre hematopoyéticas más primitivas.

Para investigar más a fondo el impacto negativo sobre la reconstitución hematopoyética, se realizaron experimentos de repoblación competitiva cuantitativa (Figura 23C-23F). Las células negativas de linaje de los animales donantes CD45.1 (BoyJ) y CD45.2 (Bl/6) se transdujeron con diversos vectores que expresan SFFV-ARNshmiR contra BCL11A, un ARNsh<sup>miR</sup>NT o solo un informador de proteína fluorescente azul (BFP) bajo control del promotor SFFV expresado de forma ubicua (SFFV-BFP). Las células se trasplantaron en animales congénicos CD45.1/CD45.2, lo que permitió la identificación tanto de las poblaciones donantes como de las células receptoras. En experimentos en los que se empleó el vector SFFV-BFP, se trasplantaron células donantes CD45.1 en animales CD45.2 y se identificaron las poblaciones de células donantes transducidas y se compararon en base a fluorescencia. Antes del trasplante, se mezclaron números iguales de células de las dos poblaciones transducidas con vectores competidores. La relación final de células modificadas genéticamente obtenidas con ambos vectores en la población trasplantada se analizó mediante citometría de flujo lo cual confirmó tasas de transducción comparables que oscilaban entre 55 y 70% (Figura 23C). La contribución de las células modificadas genéticamente se evaluó en animales trasplantados en sangre periférica, médula ósea y bazo 4, 8 y 12 semanas después del trasplante (Figura 23D) y se tuvieron en cuenta diferencias menores en la relación de las células transducidas infundidas para este análisis. En todos los casos y en



5 cada punto de tiempo, las células transducidas con vectores direccionados a BCL11A fueron superadas por las células transducidas con el vector NT o SFFV-BFP, lo que indica una desventaja selectiva tras la anulación de BCL11A. No se observaron diferencias significativas en la reconstitución de las células hematopoyéticas en comparación con la relación de la población inicialmente trasplantada cuando dos vectores de direccionamiento de BCL11A compitieron entre sí. Consistente con los hallazgos en la Figura 23B, la sobreexpresión de ARNshmiRNT también tuvo un impacto negativo en la reconstitución hematopoyética, ya que este grupo fue superado por las células transducidas por un vector que expresa solo SFFV-BFP y no expresa un ARNsh. Los inventores realizaron un análisis más detallado del linfocito B y un compartimento HSC más primitivo dentro de la fracción transducida de las células de la médula ósea (Figura 23E). Como se anticipó a partir de estudios previos que muestran una ausencia de células B en ratones BCL11A -/- (30, 31), el número de células B positivas para B220 se redujo significativamente con la anulación de BCL11A. Aunque no alcanzó significación, hubo una tendencia hacia la pérdida de células lin-, Sca-1+, c-kit+ (LSK) más primitivas que incluyen el compartimento HSC de injerto.

15 La anulación específica de eritroides de BCL11A podría eludir el efecto adverso de la anulación de BCL11A en las células HSC y B, mientras se mantiene el efecto terapéutico de la inducción de  $\gamma$ -globina en las células eritroides. Para dirigir la anulación selectiva a las células eritroides, se generó un vector lentivirus en el que el casete de ARNshmiR y el indicador fluorescente Venus se expresan bajo el control del promotor proximal mínimo de  $\beta$ -globina enlazado a los sitios hipersensibles 2 y 3 (HS2 y HS3) de la región de control de locus de  $\beta$ -globina (LCR) (32) (Figura 23F) denominada LV-LCR-BCL11A-ARNshmiR (de aquí en adelante LCR-ARNshmiR). El perfil de expresión del transgen informador Venus en las poblaciones de células hematopoyéticas injertadas in vivo se evaluó primero en ratones trasplantados con HSPC transducido (Figura 23G y Figura 26). En la Figura 26, las células negativas de linaje se transdujeron usando el vector LCR-ARNshmiR y se injertaron en ratones receptores irradiados letalmente. Doce semanas después, se identificaron células donantes y diferentes tipos de células hematopoyéticas utilizando marcadores de superficie. Aquí se muestra un esquema de activación representativo y transferencia de histogramas que muestran la expresión de Venus en diversos linajes. Los números en las transferencias indican el porcentaje de células positivas para Venus y las intensidades medias de fluorescencia (MFI). La expresión del transgen estaba fuertemente regulada; sin expresión detectable en LSK y fracciones de células B, niveles muy bajos de expresión en células T y niveles bajos de expresión en células mieloides en algunos animales. Por el contrario, la expresión transgénica estaba fuertemente sobreexpresada durante la diferenciación eritroide, comenzando en las células CD71+/Ter119- que representan progenitores eritroides y proeritroblastos y alcanzando su punto máximo en la etapa positiva doble CD71+/Ter119+, que representa eritroblastos basófilos. Durante las etapas finales de la maduración eritroide, una gran fracción de células CD71-/Ter119+ que representan reticulocitos y eritrocitos maduros expresaron el informador en un porcentaje similar en comparación con las células CD71+/Ter119+.

35 A continuación, para determinar si el uso del vector LCR evita el defecto de reconstitución observado tras la sobreexpresión ubicua de SFFV-ARNshmiR, se realizó un experimento de trasplante competitivo usando LCR-ARNshmiR y SFFV-ARNshmiR (Figura 23H). Como el vector LCR es transcripcionalmente silencioso en las células lin-, una parte alícuota de las células que se utilizarán para el trasplante se sometió a diferenciación eritroide in vitro y se midió la relación de células Venus+ en la población transcripcional permisiva CD71+/Ter119+ y se usó para la normalización de la relación de SFFV versus células transducidas con LCR. La expresión de Venus en animales trasplantados se comparó en células eritroides, ya que esta es la única población que es igualmente permisiva para la expresión de ambos vectores. La reconstitución de los ratones trasplantados demostró un claro dominio de las células derivadas de HSPC transducidas con el vector LCR, lo que sugiere una menor toxicidad en las HSPC asociadas con la expresión específica del linaje eritroide del LCR-ARNshmiR (Figura 23H). En resumen, estos datos demuestran que el efecto adverso de la anulación de BCL11A en el injerto/función de HSC puede ser evitado por la expresión de miARN específica de eritroides.

45 La anulación específica de eritroides mediada por el vector LCR de BCL11A usando ARNshmiR modificado produce altos niveles de HbF en células eritroides humanas

50 Para probar la eficacia de la anulación específica de BCL11A eritroide mediada por LCR en un sistema experimental humano, se transdujeron células CD34+ con vectores LCR-ARNshmiR que contenían ARNshmiRs 3 u 8 modificados (Figura 23F). Los inventores confirmaron primero el perfil de expresión de varios vectores LCR-ARNshmiR (LCR-ARNsh\*, LCRARNshmiR3 y 8) en células humanas durante la diferenciación eritroide in vitro de células mPB CD34+ humanas. La expresión de Venus por los vectores LCR y un vector de control accionado por SFFV sin casete ARNshmiR (SFFV-GFP) (33) se evaluó en diferentes etapas de maduración eritroide, tal como se define mediante tinción con CD71 y GpA (Figura 23I). Consistente con los hallazgos en las células de ratón que se muestran en la Figura 23G, se observaron bajos niveles de expresión en células eritroides inmaduras CD71-/GpA-. Hubo una fuerte sobreexpresión de la expresión en células positivas únicas CD71+ con el nivel más alto de expresión transgénica en las células positivas dobles CD71+/GpA+ más maduras. Como se esperaba, el control de SFFV-GFP impulsó la expresión constitutiva de alto nivel en todas las subpoblaciones. Siguiendo el protocolo de diferenciación descrito anteriormente, los niveles de proteína BCL11A se midieron el día 11 de cultivo y se compararon con vectores de control simulados y no direccionados (LCR-ARNshmiRNT y SFFV-GFP). Se observó una reducción significativa en BCL11A en las células que expresan el ARNshmiR modificado en comparación con las células que expresan el vector no direccionado (NT) y de control (SEW) (Figura 24A). El ARNm de gammaglobina constituyó el 40 y el 70% del total de las globinas similares a  $\beta$ - en células derivadas de células CD34+ transducidas con vectores que expresan ARNshmiR3 y 8, respectivamente (Figura 24B). No se observaron diferencias en el crecimiento celular entre las células

transducidas con LCR-ARNshmiR o vectores de control. La diferenciación eritroide, según lo evaluado por la expresión superficial de CD71, GpA y por enucleación, fue indistinguible de los controles (Figura 24C), lo que sugiere que no hay impacto negativo de la anulación de BCL11A sobre la expresión específica de linaje de los ARNshmiR de BCL11A. Se observó una fuerte correlación entre los niveles de ARNm de  $\gamma$ -globina (qRT-PCR) y HbF según lo evaluado por HPLC (Figura 24D). La HbF contribuyó al 35% y al 55% de la hemoglobina total en células transducidas con LCR-ARNshmiR3 y LCR-ARNshmiR8, que representan niveles comparables a la expresión mediada por el promotor SFFV (Figura 22D y Figura 24E). Finalmente, para demostrar como prueba de principio que la anulación mediada por LCR-ARNshmiR permite el injerto eficiente de células hCD34+ y la inducción de  $\gamma$ -globina, el trasplante de HSPC CD34+ derivados de médula ósea transducidos con vectores LCR-ARNshmiR3 o NT se realizó en ratones NSG irradiados sub-letalmente. Debido al pobre desarrollo de las células eritroides humanas en este modelo de xenoinjerto, se aislaron HSPC CD34+ de la médula ósea de animales trasplantados 14 semanas después del trasplante y se sometieron a diferenciación eritroide in vitro. Las células Venus+ se enriquecieron con FACS y la expresión de  $\gamma$ - y  $\beta$ -globina se determinó por RT-PCR (Figura 24F). De acuerdo con los datos anteriores, la fracción de  $\gamma$ -globina de la producción total de locus de  $\beta$ -globina fue del  $44.9\% \pm 5.5\%$  para las células transducidas con LCR-ARNshmiR3, en comparación con  $\sim 9\% \pm 0.5\%$  en los dos grupos de control que consisten en células no transducidas o LCR-ARNshmiRNT transducidas.

Los ARNsh se han utilizado ampliamente para analizar las funciones de genes en estudios biológicos, y existe un interés creciente en el uso de RNAi con fines terapéuticos. BCL11A representa un objetivo terapéutico atractivo para la modulación basada en ARNi. BCL11A es un represor de la expresión de  $\gamma$ -globina y, por lo tanto, actúa como un regulador principal del cambio de hemoglobina fetal a adulta en las células eritroides. Los niveles significativamente altos de hemoglobina fetal se asocian con fenotipos de enfermedades más leves en la enfermedad de células falciformes (SCD) y  $\beta$ -talasemias y la anulación específica de linaje de BCL11A se ha validado como una estrategia terapéutica en modelos de SCD. En los estudios informados aquí, nuestro objetivo era desarrollar un vector clínicamente aplicable para reactivar la expresión de hemoglobina fetal mediante la supresión mediada por ARNi de BCL11A. Usando un vector lentiviral optimizado que contiene un ARNsh adaptado a miARN (ARNshmiR) expresado a partir de un promotor pol II específico del linaje eritroide, los inventores alcanzaron niveles de HbF > 50% de la hemoglobina total en células eritroides primarias derivadas de HSPC CD34+ transducidas. Es probable que este nivel de inducción de HbF sea clínicamente efectivo y se compare favorablemente con los vectores publicados previamente (23, 27, 29) que utilizan casetes de expresión impulsados por pol III que carecen de especificidad de linaje y el perfil de seguridad de los vectores de lentivirus SIN reportados aquí.

El tratamiento curativo para SCD se puede lograr con el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT). Los resultados favorables en SCD dependen en gran medida de la disponibilidad de hermanos donantes compatibles. Menos del 10% de los pacientes con SCD tienen donantes potenciales de hermanos coincidentes con HLA no afectados (34). La terapia génica para las hemoglobinopatías ofrece la clara ventaja de eliminar el riesgo de GVHD mediante el uso de células autólogas. El objetivo a largo plazo de estos estudios es modular el cambio de hemoglobina, lo que conduce a la inducción endógena y fisiológica de la HbF protectora y la supresión de la globina falciforme. Los inventores plantean la hipótesis de que esta doble manipulación de la expresión será la metodología terapéutica más efectiva para prevenir las toxicidades en la SCD, incluida la hemólisis y el daño de los órganos finales de la hemoglobina polimerizante mutante. Para alcanzar el objetivo del beneficio terapéutico, debe producirse la anulación suficiente de BCL11A y la inducción de HbF por célula y se debe injertar un número suficiente de HSC de larga duración modificada por genes con el fin de que el quimerismo del compartimento de glóbulos rojos atenúe el fenotipo de la enfermedad. Por lo tanto, la optimización de la anulación de BCL11A y la preservación de la capacidad de reconstitución de HSCP transducido, como se muestra aquí, es fundamental para el éxito a largo plazo de la terapia genética en SCD. En relación con el segundo punto, los inventores creen que esto se puede lograr actualmente, ya que los datos anteriores de trasplantes alogénicos que resultan en quimerismo mixto han demostrado que un quimerismo tan bajo como 10% del compartimento mielóide está asociado con un quimerismo de glóbulos rojos periféricos de 80-100% (35). El sesgo de la masa de glóbulos rojos después del injerto probablemente se atribuya a la supervivencia mejorada de los glóbulos rojos normales en comparación con células falciformes. Este nivel de marcado de células mieloides de larga vida se ha alcanzado recientemente en ensayos en humanos utilizando el vector de lentivirus (36-38), incluida la  $\beta$ -talasemia (39).

Los ARNsh impulsados por Pol III son los sistemas de vectores más comúnmente utilizados para efectuar la anulación de genes por RNAi, pero estos vectores median la expresión ubicua que puede estar asociada tanto con toxicidades no específicas de altos niveles de expresión como con toxicidades específicas de secuencia en ciertos tipos de células. Aquí los inventores demuestran que la anulación de BCL11A en HSC perjudica el injerto de estas células en entornos de trasplante y el desarrollo de células B in vivo. Aunque el injerto reducido en ausencia de BCL11A es un fenómeno no reportado, los datos informados aquí son consistentes con la expresión conocida de BCL11A en HSPC tempranas y con el informe de un contenido de HSC reducido en  $\sim$ dos veces en ratones tras la delección genética de BCL11A (31, 40, 41). El impacto negativo de la anulación de BCL11A en el injerto de las HSC puede ser más evidente en los ensayos que se informan aquí debido al aumento de la presión selectiva presente en este entorno experimental. Generalmente, hay un número limitado de HSC después del cultivo ex vivo y la transducción de estas células y la competencia con las HSC de control utilizadas en los ensayos utilizados aquí puede mejorar la detección de toxicidad a nivel de HSC. Dentro del linaje eritroide BCL11A es prescindible (24). En los datos presentados aquí, el uso del vector LCR específico de eritroides, que contiene secuencias reguladoras derivadas del locus de  $\beta$ -globina (32, 42)

evitó los efectos negativos de la anulación de BCL11A en el injerto de HSC. El vector LCR mostró un alto grado de fidelidad de linaje en la expresión del ARNshmiR direccionado a BCL11A. Además, se ha demostrado que esta arquitectura vectorial reduce el riesgo de transactivación de genes celulares vecinos cuando se usa para expresar otros transgenes (43), una característica importante para la traducción clínica. Por lo tanto, el direccionamiento transcripcional de ARNshmiRs parece crítico en el caso de BCL11A, lo que subraya la importancia de desarrollar vectores de anulación eficaces basados en pol II. Esta metodología evita el impacto negativo de la anulación de BCL11A en las HSPC y también el desarrollo de células linfoides (30,31), evita la toxicidad relacionada con la sobreexpresión de ARNsh (9, 11, 19) y mejora el perfil de seguridad del sistema de vectores, al tiempo que mantiene la eficacia terapéutica.

El uso de promotores de pol II para la expresión de ARNsh necesita embeber el ARNsh en secuencias de microRNA. Como la mayoría de las secuencias de ARNsh efectivas previamente validadas se derivan de análisis realizados usando promotores de pol III y la mayoría de los sistemas de anulación comercialmente disponibles se basan en promotores de pol III, la conversión de secuencias de ARNsh en una configuración de pol II es importante. A pesar de la importante investigación en esta área, faltan pautas para la conversión de secuencias de ARNsh derivadas de vectores efectivos basados en pol III en vectores ARNshmiR basados en pol II. Aquí, al comparar los resultados del procesamiento de ARN a partir de células transducidas con ambos tipos de vectores en paralelo, los inventores confirmaron que se generan diferentes productos de ARN pequeños con respecto a las secuencias coincidentes con el objetivo, lo que da como resultado una eficiencia notablemente reducida de la anulación del objetivo a través de vectores basados en pol II. Las secuencias de cadena guía maduras producidas a partir de sistemas pol II versus a sistemas pol III que contienen secuencias coincidentes de ARNm diana idénticas generalmente se desplazan de 3 a 5 nt entre sí. La adición de 3-5 residuos U de la señal de terminación de pol III al extremo 3' del transcrito de ARNsh conduce a un desplazamiento correspondiente del sitio de escisión de Dicer, lo que demuestra el papel dominante de la regla de conteo 3' para la escisión de Dicer (44, 45). El desplazamiento de la cadena guía en pol III versus pol II tiene un impacto importante en la eficiencia de anulación, ya que la región de semilla se altera y las propiedades termodinámicas y la identidad de nucleótidos terminales de los dúplex de ARN pequeños cambian, impactando por lo tanto la incorporación de la cadena guía en el complejo RISC-efector (4, 5, 46, 47). La reingeniería de los ARNshmiR para imitar las secuencias de cadena guía maduras producidas por los ARNshs impulsados por pol III condujo a un procesamiento potenciado y una anulación mejorada del ARNm diana. Esta metodología debería ser aplicable para el desarrollo de vectores direccionados a otros genes usando promotores pol II, incluidos otros casetes de expresión específicos de linaje.

En resumen, los datos demuestran características críticas del procesamiento de ARN relevantes para el uso de ARNsh en diferentes contextos vectoriales, y también proporcionan una estrategia para la anulación de genes específicos del linaje que evita las consecuencias adversas de la expresión generalizada. Los hallazgos tienen implicaciones importantes para el diseño de ARNsh embebidos en microARN y su aplicación en metodologías de terapia génica basados en ARNi.

#### Ejemplo 11

Estudios de eficacia de la transducción de ARNshmiR de BCL11A en células CD34+ humanas donantes de salud.

El represor transcripcional BCL11A representa un objetivo terapéutico para las  $\beta$ -hemoglobinopatías. La supresión selectiva de BCL11A en células eritroides a través de ARNshs adaptados por microARN expresados por el promotor pol II (ARNshmiR) dio como resultado una anulación efectiva de BCL11A tanto en células murinas como humanas. Expresar los ARNshmiR modificados de forma específica para eritroides eludió los efectos adversos sobre el injerto de HSC murino y el desarrollo de células B (véase el Ejemplo 10 supra) y condujo a una anulación eficiente de BCL11A y altos niveles de HbF en células eritroides derivadas de CD34 humano primario y en células eritroides humanas diferenciadas in vitro después del injerto completo de células CD34+ modificadas en xenoinjertos murinos. Los inventores también demostraron la inducción efectiva de HbF en células eritroides derivadas de células CD34 transducidas obtenidas de un donante con enfermedad de células falciformes.

En una serie de experimentos, El CD34 movilizado por GCSF de donantes sanos se transdujo con un vector que expresa un ARNsh no direccionado (LCR-NT) o BMS11-D12G5, y se sometieron a diferenciación in vitro eritroide.

BCL11AD12G5-2 ARNsh: En sentido

ACGCTCGCACAGAACTCATGGATTctccatgtgtagagAATCCATGAGTGTT TGTGCGAG (SEQ. ID. NO:43)

Antisentido

CGCACTCGCACAGAACTCATGGATTctaccacatggagAATCCATGAGTGTT CTGTGCGA (SEQ. ID. NO:44)

La Figura 27A es una inmunotransferencia Western de células eritroides diferenciadas in vitro derivadas de células CD34 transducidas que muestran isoformas BCL11A (L y XL) y  $\beta$ -ACTINA como control de carga y que demuestran la anulación efectiva de BCL11A XL. La Figura 27B muestra la cuantificación de la anulación de BCL11A en células eritroides. Los datos se derivan de inmunotransferencias Western como se muestra en la Figura 27A. Los datos resumen tres experimentos independientes utilizando células de un solo donante. (Barras de error: SD)

La Figura 27C muestra la inducción de gamma globina en células eritroides según lo evaluado por RT-qPCR y la hemoglobina (HbF) evaluada por HPLC.

#### Ejemplo 12

Cuantificación de la anulación de BCL11A en células eritroides.

- 5 Se estudió el injerto de las células CD34+ transducidas en ratones inmunodeficientes NSG, incluida la efectividad de la anulación in vivo de la expresión de BCL11A. Los CD34 humanos se transdujeron con LCR-NT o BMS11-D8G5 y se inyectaron en ratones receptores de NSG irradiados subletalmente. La médula ósea CD34+ se aisló 14 semanas después y se sometió a diferenciación eritroide in vitro. La Figura 28 muestra la inducción de gamma globina en células eritroides según lo evaluado por RT-qPCR.

#### 10 Ejemplo 13

Anulación de BCL11A e inducción de hemoglobina fetal en células eritroides derivadas de células CD34 transducidas de un paciente con células falciformes.

- 15 La médula ósea CD34 se aisló de un paciente con SCD el cual recibió tratamiento con HU y que tenía un alto valor de línea base de HbF. Las células se transdujeron con LCR-NT o LCR-D12G5 y se sometieron a diferenciación in vitro eritroide.

- 20 La anulación de BCL11A se estudió en células de pacientes con células falciformes. La médula ósea CD34 se aisló de un paciente con células falciformes y las células se transdujeron con LCR-NT o LCR-D12G5-2 (células no transducidas utilizadas como control adicional) y se sometieron a diferenciación eritroide in vitro. La Figura 29A muestra inmunotransferencias Western que muestran BCL11A (isoformas L y XL) y  $\beta$ -ACTINA como control de carga y demuestra la anulación efectiva de BCL11A-XL. Cada panel (marcado 1-6 debajo de la línea) representa un experimento independiente que usa células de un solo donante. La Figura 29B muestra la cuantificación de la anulación de BCL11A en células eritroides. Los datos se derivan de inmunotransferencias Western que se muestran en la Figura 29A. La Figura 29C muestra la inducción resultante de HbF por HPLC. Este paciente estaba recibiendo tratamiento con hidroxiurea, lo cual explica el alto nivel de línea base de Hb F.

#### 25 Ejemplo 14

Una realización de un protocolo de tratamiento

Evaluación inicial

- 30 Los pacientes se someterán a un examen estándar para el trasplante autólogo de médula ósea de acuerdo con las pautas institucionales, y luego se someterán a dos recolecciones de médula ósea con un mínimo de 4 semanas de diferencia que se utilizará para una médula de respaldo (mínimo de  $2 \times 10^6$  células CD34+/kg) y para una recolección de médula ósea autóloga para la transferencia de genes (objetivo de  $5 \times 10^6$  células CD34+/kg con un mínimo de  $4 \times 10^6$  células CD34+/kg).

Recolección de un injerto autólogo de respaldo

- 35 Se recolectarán células hematopoyéticas del paciente antes del tratamiento, para que sirvan como un procedimiento de rescate ("injerto de respaldo"), en caso de que no se observe recuperación hematopoyética 6 semanas después de la inyección de células manipuladas genéticamente, o si las células manipuladas no cumplen con los criterios de liberación. La médula ósea (hasta 20 cc/kg) se recogerá del paciente bajo anestesia general desde las crestas ilíacas posteriores en ambos lados mediante punciones múltiples, como mínimo, 4 semanas antes de la terapia génica. Una porción de la médula ósea que contiene  $2 \times 10^6$  células CD34+/kg se congelará y almacenará sin manipular en vapores de nitrógeno líquido ( $162^\circ\text{C}$  y  $-180^\circ\text{C}$ ) de acuerdo con los procedimientos clínicos estándar para la recolección autóloga de médula ósea para constituir el injerto de respaldo. El resto de la extracción se seleccionará para las células CD34+ (descritas a continuación) y se utilizará para la modificación génica (descrita a continuación).

40 Recolectación de médula ósea

- 45 El resto de la primera recolección de médula ósea en exceso de la médula de respaldo necesaria se utilizará con una segunda recolección de médula ósea para la transferencia de genes. La segunda recolección ocurrirá no antes de 4 semanas después de la recolección inicial (descrita anteriormente). Para la segunda recolección, la médula ósea se extraerá nuevamente del paciente bajo anestesia general desde las crestas ilíacas posteriores en ambos sitios mediante punciones múltiples. La cantidad de médula recogida será de hasta 20 ml/kg de peso corporal. Esto dará un recuento total de células nucleadas de más de  $\sim 4 \times 10^8$  células/kg. Esto a su vez debería producir una dosis de células CD34+ de más de  $4 \times 10^6$  células/kg después del cribado de células CD34+.

- 50 Los sujetos de los cuales el recuento estimado de CD34+ de ambas recolecciones es  $<4 \times 10^6$  células/kg no recibirán acondicionamiento. Después de un período de al menos 6 semanas, si el sujeto desea permanecer en estudio, puede ser recogido nuevamente. Si el sujeto no desea ser recogido nuevamente, será retirado del estudio.

Los sujetos retirados del estudio antes de la administración de las células CD34+ transducidas reanudarán la atención clínica normal (atención de apoyo y/o HSCT alogénico). Las evaluaciones de eficacia y seguridad no se llevarán a cabo desde el punto de retirada y no se recopilarán datos para la base de datos.

Aislamiento, preestimulación y transducción de células CD34+

5 Purificación de células CD34+.

Para permitir suficiente tiempo para la eliminación de los agentes acondicionadores y minimizar el tiempo de preestimulación y cultivo, la médula ósea entera se mantendrá durante la noche. Todas las etapas de fabricación se llevan a cabo en el Connell & O'Reilly Families Cell Manipulation Core Facility en el DFCI. La médula ósea sufrirá agotamiento en glóbulos rojos por centrifugación en gradiente de densidad. Las células CD34+ se seleccionarán positivamente de las células mononucleares de médula ósea utilizando el reactivo e instrumento CliniMACS. Se toman muestras de control de calidad (QC) para evaluar la pureza y la esterilidad. Las células purificadas se procesarán inmediatamente para preestimulación y transducción.

Preestimulación y transducción de CD34+

15 La transducción se llevará a cabo en una o ambas recolecciones. La transducción de células que excedan el objetivo de médula de respaldo de la primera recolección se transducirá y congelará para su uso futuro. La segunda recolección se utilizará para la transferencia de genes en su totalidad y el producto transducido de la segunda recolección se infundirá con las células transducidas descongeladas de la primera recolección después del acondicionamiento.

20 Las células CD34+ purificadas se siembran en bolsas de cultivo cerradas a una densidad de  $0.5-1 \times 10^6/\text{ml}$  en medio libre de suero suplementado con factores de crecimiento (IL-3, SCF, FLT3L, TPO) y se colocan en una incubadora a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24-30 horas, las células se recolectan y se cuentan. Las pruebas de control de calidad adicionales incluyen la viabilidad celular y el ensayo de la Unidad de formación de colonias (CFU). Las células se transfieren a una nueva bolsa de cultivo y se tratan con sobrenadante lentiviral. Para esta primera ronda de transducción, las células se incuban durante 18-24 horas. Las células se recolectan, se cuentan y se transfieren a una nueva bolsa, con sobrenadante lentiviral para una segunda ronda de transducción.

25 Recolección final y formulación

Después de la segunda ronda de transducción, las células se recolectan, se lavan en plasmalyte y se resuspenden en su formulación final (PLASMALYTE, HSA al 1%) en un volumen de 50-100 mL. Todas las células disponibles después de la eliminación de las muestras de CC se infundirán en el paciente. El control de calidad incluye recuento de células, viabilidad, esterilidad en el sobrenadante de lavado, Micoplasma, Endotoxina en el sobrenadante, fenotipo, CFU, RCL (muestras tomadas y archivadas), análisis de inserción y número promedio de copias de vectores por qPCR (células cultivadas). Se toma una muestra para la tinción de Gram del producto inmediatamente antes DEL suministro al paciente.

Prueba previa a la reinfusión del sujeto

35 Las muestras se recolectan durante y al final del procedimiento para el recuento celular y la viabilidad (exclusión de azul de tripano o equivalente), esterilidad, micoplasma, eficiencia de transducción (número de copia del vector), tinción de Gram, endotoxina y pruebas de RCL. De estas solo la viabilidad celular, la esterilidad (en proceso, 72 horas), la tinción de Gram y las mediciones de endotoxinas estarán disponibles antes de la infusión.

40 Si los cultivos microbiológicos revelan contaminación bacteriana transitoria, por tinción de Gram o cultivo positivo a las 72 horas, el personal del Cell Manipulation Core Facility se comunicará con el PI, el director médico asistente y el médico tratante para decidir si se infunde la recolección de respaldo o se infunde el producto con cobertura antibiótica. Si se infunde la recolección de respaldo, el sujeto será retirado del protocolo. Si la viabilidad celular es <70%, la prueba de esterilidad es positiva, o la endotoxina es > 5 EU/kg/h, las células no serán devueltas, se infundirá la recolección de respaldo y el sujeto será retirado del protocolo.

45 Si el recuento de células viables de ambas recolecciones/transducciones es mayor o igual a  $4 \times 10^6$  células CD34+/kg al final de la transducción, las células se infundirán. Si el recuento de células viables de ambas recolecciones/transducciones es inferior a  $4 \times 10^6$  células CD34+/kg al final de la transducción, las células no se infundirán y la recolección de respaldo se infundirá 48 horas más tarde.

Régimen de condicionamiento del sujeto

50 Los sujetos recibirán condicionamiento mieloablativo con busulfán (~4 mg/kg por vía intravenosa diariamente, ajustado por peso, (administrado durante 3 horas una vez al día) administrado en los días -4 a -2, antes de la infusión de las células transducidas. El condicionamiento ocurrirá simultáneamente con la purificación y transducción de células de médula ósea. Los niveles de busulfán se extraerán en los 3 días de administración, y los niveles en los días 1 y 2 se usarán para ajustar el área bajo la curva objetivo.

Infusión de células transducidas.

Las células se infundirán por vía intravenosa durante 30-45 minutos después de la prehidratación y premedicación estándar de acuerdo con las pautas estándar de la Unidad de Trasplante de Células Madre Hematopoyéticas del Boston Children's Hospital. Este estándar requiere que el paciente esté en un monitor continuo de saturación cardíaca, respiratoria y de oxígeno durante toda la infusión y durante 30 minutos después. Los signos vitales se medirán y registrarán antes de la transfusión, 15 minutos en la transfusión, cada hora durante la duración de la infusión y al final de la transfusión. El RN permanecerá con el paciente durante los primeros 5 minutos de la transfusión. Si se administran dos productos de transducción, el segundo producto transducido se administrará sin demora después del primero.

Debe entenderse que, si bien la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

1. Lee, Y. et al., The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419 (2003).
2. Ha, M. and Kim, V. N., Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 509-524 (2014).
3. Winter, J. et al., Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 11, 228-234 (2009).
4. Khvorova, A. et al., Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216 (2003).
5. Schwarz, D. S. et al., Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208 (2003).
6. Lai, E. C., Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature genetics* 30, 363-364 (2002).
7. Lewis, B. P. et al., Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798 (2003).
8. Park, J. E. et al., Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* 475, 201-205 (2011).
9. Grimm, D. et al., Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537-541 (2006).
10. McBride, J. L. et al., Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5868-5873 (2008).
11. Khan, A. A. et al., Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol* 27, 549-555 (2009).
12. Yi, R. et al., Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA* 11, 220-226 (2005).
13. Borner, K. et al., Robust RNAi enhancement via human Argonaute-2 overexpression from plasmids, viral vectors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 41, e199 (2013).
14. Grimm, D. et al., Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. *The Journal of clinical investigation* 120, 3106-3119 (2010).
15. Diederichs, S. and Haber, D. A., Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131, 1097-1108 (2007).
16. Persengiev, S. P. et al., Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 10, 12-18 (2004).
17. Fish, R. J. and Kruihof, E. K., Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. *BMC Mol Biol* 5, 9 (2004).
18. Jackson, A. L. and Linsley, P. S., Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* 9, 57-67 (2010).
19. Martin, J. N. et al., Lethal toxicity caused by expression of shRNA in the mouse striatum: implications for therapeutic design. *Gene Ther* 18, 666-673 (2011).
20. Zeng, Y. et al., Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Molecular cell* 9, 1327-1333 (2002).

21. Fellmann, C. et al., An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi. *Cell Rep* 5, 1704-1713 (2013).
22. Amendola, M. et al., Regulated and multiple miRNA and siRNA delivery into primary cells by a lentiviral platform. *Mol Ther* 17, 1039-1052 (2009).
- 5 23. Sankaran, V. G. et al., Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science (New York, N.Y)* 322, 1839-1842 (2008).
24. Xu, J. et al., Correction of sickle cell disease in adult mice by interference with fetal hemoglobin silencing. *Science* 334, 993-996 (2011).
25. Cullen, B. R., Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res* 102, 3-9 (2004).
- 10 26. Moffat, J. et al., A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124, 1283-1298 (2006).
27. Xu, J. et al., Transcriptional silencing of {gamma}-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev* 24, 783-798 (2010).
28. Weber, K. et al., Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Ther* 17, 511-520 (2010).
- 15 29. Wilber, A. et al., Therapeutic levels of fetal hemoglobin in erythroid progeny of beta-thalassemic CD34+ cells after lentiviral vector-mediated gene transfer. *Blood* 117, 2817-2826 (2011).
30. Liu, P. et al., BCL11A is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol* 4, 525-532 (2003).
31. Yu, Y. et al., BCL11A is essential for lymphoid development and negatively regulates p53. *J Exp Med* 209, 2467-2483 (2012).
- 20 32. Miccio, A. et al., In vivo selection of genetically modified erythroblastic progenitors leads to long-term correction of beta-thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10547-10552 (2008).
33. Demaison, C. et al., High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 13, 803-813 (2002).
- 25 34. Hansbury, E. N. et al., Bone marrow transplant options and preferences in a sickle cell anemia cohort on chronic transfusions. *Pediatr Blood Cancer* 58, 611-615 (2012).
35. Andreani, M. et al., Quantitatively different red cell/nucleated cell chimerism in patients with long-term, persistent hematopoietic mixed chimerism after bone marrow transplantation for thalassemia major or sickle cell disease. *Haematologica* 96, 128-133 (2011).
- 30 36. Cartier, N. et al., Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science (New York, N.Y)* 326, 818-823 (2009).
37. Biffi, A. et al., Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Benefits Metachromatic Leukodystrophy. *Science (New York, N.Y)*, (2013).
- 35 38. Aiuti, A. et al., Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 341, 1233-1235 (2013).
39. Cavazzana-Calvo, M. et al., Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 467, 318-322 (2010).
- 40 40. Wu, X. et al., BCL11A controls Flt3 expression in early hematopoietic progenitors and is required for pDC development in vivo. *PLoS One* 8, e64800 (2013).
41. Ippolito, G. C. et al., Dendritic cell fate is determined by BCL11A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E998-1006 (2014).
42. Roselli, E. A. et al., Correction of beta-thalassemia major by gene transfer in haematopoietic progenitors of pediatric patients. *EMBO Mol Med* 2, 315-328 (2010).
- 45 43. Zychlinski, D. et al., Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. *Mol Ther* 16, 718-725 (2008).
44. Zhang, H. et al., Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57-68 (2004).

45. Vermeulen, A. et al., The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. RNA 11, 674-682 (2005).

46. Chiang, H. R. et al., Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. Genes Dev 24, 992-1009 (2010).

5 47. Frank, F. et al., Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. Nature 465, 818-822 (2010).

48. Giarratana, M. C. et al., Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. Blood 118, 5071-5079 (2011).

10 49. Grimson, A. et al., Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. Nature 455, 1193-1197 (2008).

Lista de oligonucleótidos miR sintéticos

Oligos miR1 de BCL11A:

En sentido ACGCTCGCACAGAAACTCATGGATTctccatgtgtagagAATCCATGAGTGTCTGTGCGag (SEQ ID NO:1)

15 Antisentido CGCActCGCACAGAAACTCATGGATTctctaccatggagAATCCATGAGTGTCTGTGCGa (SEQ ID NO:2)

Oligos miR2 de BCL11A:

En sentido ACGCTCCAGAGGATGACGATTGTTTActccatgtgtagagTAAACAATCGTCATCCTCTGGag (SEQ ID NO:3)

20 Antisentido CGCActCCAGAGGATGACGATTGTTTActctaccatggagTAAACAATCGTCATCCTCTGGa (SEQ ID NO:4)

Oligos E3 de BCL11A:

En sentido ACGCTTCCGAGACTCCAGACAATCGCctccatgtgtagagGCGATTGTCTGGAGTCTCCGAag (SEQ ID NO:5)

25 Antisentido CGCActTCCGAGACTCCAGACAATCGCctctaccatggagGCGATTGTCTGGAGTCTCCGAa (SEQ ID NO:6)

Oligos D8 de BCL11A:

En sentido ACGCTTTCTCTTGCAACACGCACAGActccatgtgtagagTCTGTGCGTGTGCAAGAGAAg (SEQ ID NO:7)

30 Antisentido CGCActTTCTCTTGCAACACGCACAGActctaccatggagTCTGTGCGTGTGCAAGAGAAa (SEQ ID NO:8)

BCL11A XLC4 u oligos C4:

En sentido ACGCTACAGTACCCTGGAGAAACACActccatgtgtagagTGTGTTTCTCCAGGGTACTGTtag (SEQ ID NO:9)

35 Antisentido CGCActACAGTACCCTGGAGAAACACActctaccatggagTGTGTTTCTCCAGGGTACTGTa (SEQ ID NO:10)

Oligos no direccionados:

En sentido ACGCTCAACAAGATGAAGAGCACCActccatgtgtagagTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGag (SEQ ID NO:11)

40 Antisentido CGCActCAACAAGATGAAGAGCACCActctaccatggagTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGa (SEQ ID NO:12)

BCL11A E3G5 u oligos mod de E3: **(versión modificada)**

En sentido ACGCTGCGCTCGGAGACTCCAGACActccatgtgtagagTTGTCTGGAGTCTCCGAG**GCGC**ag(SEQ ID NO:13)



- Antisentido CGCActGCGCTCGGAGACTCCAGACAActctaccacatggagTTGTCTGGAGTCTCCGAG**GCGC**a(SEQ ID NO:14)
- BCL11A D8G5 u oligos mod de D8: **(versión modificada)**
- 5 En sentido ACGCTGCGCTTCTCTTGCAACACGCAactccatgtgtagagTGCGTGTTGCAAGAGA**GCGC**ag(SEQ ID NO:15)
- Antisentido CGCActGCGCTTCTCTTGCAACACGCAactctaccacatggagTGCGTGTTGCAAGAGA**GCGC**a(SEQ ID NO:16)
- Oligos XLC4G5 de BCL11A: **(versión modificada)**
- 10 En sentido ACGCTGCGCACAGTACCCTGGAGAAAactccatgtgtagagTTTCTCCAGGGTACTGT**GCGC**ag(SEQ ID NO:17)
- Antisentido CGCActGCGCACAGTACCCTGGAGAAAactctaccacatggagTTTCTCCAGGGTACTGT**GCGC**a(SEQ ID NO:18)
- mIR1 CGCACAGAACACTCATGGATTctccatgtgtagagAATCCATGAGTGTCTGTGCG (SEQ ID NO:25)
- (ARNsh1 o E3) TCGGAGACTCCAGACAATCGCctccatgtgtagagGCGATTGTCTGGAGTCTCCGA (SEQ ID NO:26)
- 15 (ARNsh2 o B5) CCTCCAGGCAGCTCAAAGATCctccatgtgtagagGATCTTTGAGCTGCCTGGAGG (SEQ ID NO:27)
- (ARNsh3 o D8) TTCTCTTGCAACACGCACAGActccatgtgtagagTCTGTGCGTGTTGCAAGAGAA (SEQ ID NO:28)
- (ARNsh4 o B11) TCAGGACTAGGTGCAGAAATGTctccatgtgtagagACATTCTGCACCTAGTCCTGA (SEQ ID NO:29)
- (ARNsh5 o 50D12 o D12) GATCGAGTGTGAATAATGATctccatgtgtagagATCATTATCAACACTCGATC (SEQ ID NO:30)
- 20 (ARNsh6 o 50A5 or A5) CAGTACCCTGGAGAAACACATctccatgtgtagagATGTGTTTCTCCAGGGTACTG (SEQ ID NO:31)
- (ARNsh7 o 50B11) CACTGTCCACAGGAGAAGCCAactccatgtgtagagTGGCTTCTCCTGTGGACAGTG (SEQ ID NO:32)
- (ARNsh8 o 50C4) ACAGTACCCTGGAGAAACACActccatgtgtagagTGTGTTTCTCCAGGGTACTGT (SEQ ID NO:33)
- 25 mIR1G5 ggcgCGCACAGAACACTCATGctccatgtgtagagCATGAGTGTCTGTGCGggcg (SEQ ID NO:34)
- (ARNsh1mod o E3G5) ggcgTCGGAGACTCCAGACAAactccatgtgtagagTTGTCTGGAGTCTCCGAgcg (SEQ ID NO:35)
- (ARNsh2mod o B5G5) ggcgCCTCCAGGCAGCTCAAactccatgtgtagagTTTGAGCTGCCTGGAGGggcg (SEQ ID NO:36)
- 30 (ARNsh3mod o D8G5) ggcgTTCTCTTGCAACACGCActccatgtgtagagTGCGTGTTGCAAGAGAAggcg (SEQ ID NO:37)
- (ARNsh4mod o B11G5) ggcgTCAGGACTAGGTGCAGActccatgtgtagagTCTGCACCTAGTCCTGAgcg (SEQ ID NO:38)
- (ARNsh5mod o 50D12G5 or D12G5) ggcgGATCGAGTGTGAATAactccatgtgtagagTTATTCAACACTCGATCggcg (SEQ ID NO:39)
- 35 (ARNsh6mod o 50A5G5) ggcgCAGTACCCTGGAGAAactccatgtgtagagGTTTCTCCAGGGTACTGggcg (SEQ ID NO:40)
- (ARNsh7mod o 50B11G5) ggcgCACTGTCCACAGGAGAactccatgtgtagagTTCTCCTGTGGACAGTGggcg (SEQ ID NO:41)
- 40 (ARNsh8mod o 50C4G5 or C4G5) ggcgACAGTACCCTGGAGAAactccatgtgtagagTTTCTCCAGGGTACTGTggcg (SEQ ID NO:42)
- (BCL11A D12G5-2 ARNsh): En sentido  
ACGCTCGCACAGAACACTCATGGATTctccatgtgtagagAATCCATGAGTGTCTGTGCGAG (SEQ. ID. NO:43)
- 45 (BCL11A D12G5-2 ARNsh): Antisentido  
CGCACTCGCACAGAACACTCATGGATTctctaccacatggagAATCCATGAGTGTCTGTGCGA (SEQ. ID. NO:44)

## ES 2 744 186 T3

5' -CCGGCGCACAGAACACTCATGGATTCTCGAGAATCCATGAGTGTTCTGTGCGTTTTT-  
3' (SEQ. ID. NO:86)

5' CGCTCGCACAGAACACTCATGGATTctccatgtggtagagAATCCATGAGTGTTCTGTGCG  
AGTG-3' (SEQ. ID. NO:87)

5' CGCTGCGCCGCACAGAACACTCATGctccatgtggtagagCATGAGTGTTCTGTGCGGCGCA  
GTG-3' (SEQ. ID. NO:88)

5' -CCGGACAGTACCCTGGAGAAACACACTCGAGTGTGTTTCTCCAGGGTACTGTTTTTT-  
3' (SEQ. ID. NO:89)

5' -CGCTACAGTACCCTGGAGAAACACActccatgtggtagagTGTGTTTCTCCAGGGTACTGT  
5 AGTG-3' (SEQ. ID. NO:90)

5' CGCTGCGCACAGTACCCTGGAGAAAActccatgtggtagagTTTCTCCAGGGTACTGTGCGCA  
GTG-3' (SEQ. ID. NO:91)

5' -CCGGTTCTCTTGCAACACGCACAGACTCGAGTCTGTGCGTGTTGCAAGAGAATTTTT-  
3' (SEQ. ID. NO:92)

5' CGCTTTCTCTTGCAACACGCACAGActccatgtggtagagTCTGTGCGTGTTGCAAGAGAAA  
GTG-3' (SEQ. ID. NO:93)

5' CGCTGCGCTTCTCTTGCAACACGCActccatgtggtagagTGCGTGTTGCAAGAGAAGCGCA  
GTG-3' (SEQ. ID. NO:94)

10 5' -CCGGGATCGAGTGTTGAATAATGATCTCGAGATCATTATTCAACACTCGATCTTTTT-  
3' (SEQ. ID. NO:95)

5' -CGCTGATCGAGTGTTGAATAATGATctccatgtggtagagATCATTATTCAACACTCGATC  
AGTG-3' (SEQ. ID. NO:96)

5' CGCTGCGCGATCGAGTGTTGAATAActccatgtggtagagTTATTCAACACTCGATCGCGCA  
GTG-3' (SEQ. ID. NO:97)

Nombre nuevo	Nombre antiguo
ARNsh1	E3
ARNsh2	B5
ARNsh3	D8
ARNsh4	B11
ARNsh5	50D12 o D12
ARNsh6	50A5 o A5
ARNsh7	50B11
ARNsh8	50C4

## ES 2 744 186 T3

Nombre nuevo	Nombre antiguo
ARNsh1mod	E3G5
ARNsh2mod	B5G5
ARNsh3mod	D8G5
ARNsh4mod	B11G5
ARNsh5mod	50D12G5 o D12G5
ARNsh6mod	50A5G5
ARNsh7mod	50B11G5
ARNsh8mod	50C4G5 o C4G5

## REIVINDICACIONES

1. Un microARN de BCL11A sintético que comprende;
- a) un primer segmento de BCL11A, un segmento de bucle; y
- b) un segundo segmento de BCL11A dispuesto en tándem en una dirección de 5' a 3',
- 5 en donde el segmento de bucle está entre y directamente vinculado al primer y segundo segmentos de BCL11A;
- en donde el segundo segmento de BCL11A es complementario al primer segmento de BCL11A de tal manera que el primer y el segundo par base de segmentos de BCL11A forman un bucle de horquilla con el segmento de bucle que forma la porción de bucle del bucle de horquilla así formado; y
- 10 el primer segmento de BCL11A comienza con un -GCGC- en el extremo 5' y el segundo segmento de BCL11A termina con un -GCGC- en el extremo 3'.
2. El microARN de BCL11A sintético de la reivindicación 1, en donde el primer y el segundo segmentos de BCL11A tienen una longitud de aproximadamente 18 a 25 nucleótidos.
3. El microARN de BCL11A sintético de la reivindicación 1 o 2, en donde:
- (a) el primer segmento de BCL11A contiene una secuencia derivada de una secuencia de ARNm de BCL11A;
- 15 (b) el primer segmento de BCL11A es complementario al segundo segmento de BCL11A;
- (c) el primer segmento de BCL11A comprende la secuencia de nucleótidos establecida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 y 65.
4. El microARN de BCL11A sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el segmento de bucle se deriva de un microARN.
- 20 5. El microARN de BCL11A sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el microARN comprende una secuencia de nucleótidos establecida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42.
6. Una célula que comprende al menos un microARN de BCL11A sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para uso en el aumento de los niveles de hemoglobina fetal expresados por la célula, en donde la célula es una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.
- 25 7. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42.
8. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 7.
9. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 8.
- 30 10. La célula de la reivindicación 9, en donde:
- (a) la célula es una célula madre embrionaria, una célula madre somática, una célula progenitora, una célula de médula ósea, una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética; o
- (b) la célula es un eritrocito.
11. Un virus que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 7.
- 35 12. El virus de la reivindicación 11, en donde el virus es
- (a) un lentivirus; o
- (b) un lentivirus seleccionado del grupo que consiste en: virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), virus de encefalitis por artritis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV).
- 40 13. Una composición que comprende un microARN de BCL11A sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5; una molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 7, un vector de la reivindicación 8, una célula huésped de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, o un virus de la reivindicación 11 o 12.
- 45 14. La composición de la reivindicación 13, que comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

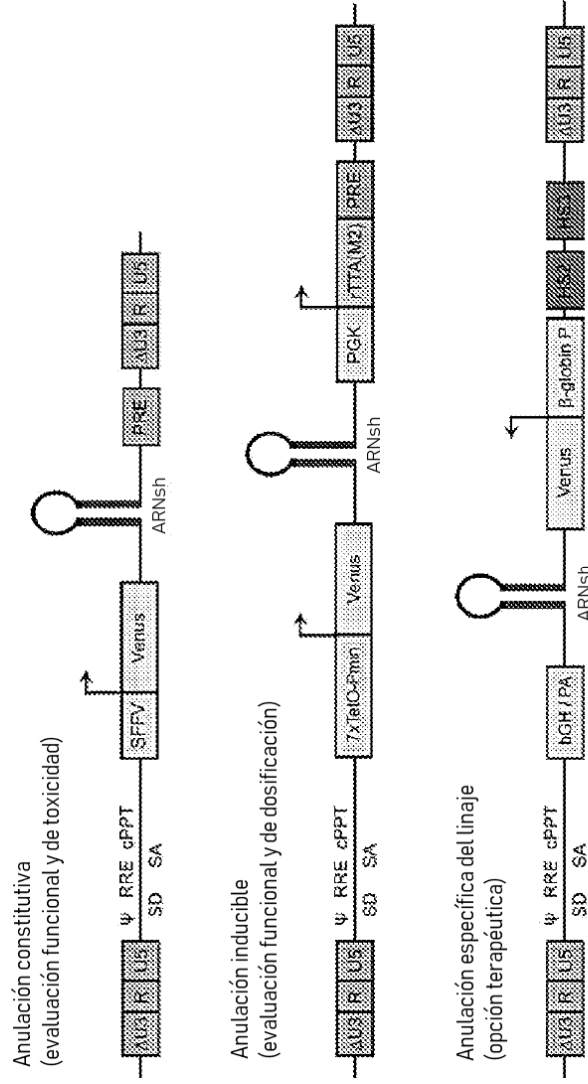
15. Una composición de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, para uso en el tratamiento o para reducir el riesgo de desarrollar una hemoglobinopatía en un sujeto.

**Oligonucleótidos Bcl11a miR1 :**  
 En sentido (SEQ. ID. NO: 1) ACGCTCGCACAGAACACTCATGGATTctccatgtggtagagAAATCCATGAGTGTCTGTGCGAG  
 Antisentido (SEQ. ID. NO: 2) CGCACTCGCACAGAACACTCATGGATTctctaccacatggagAAATCCATGAGTGTCTGTGCGA

**Oligonucleótidos Bcl11a miR2 :**  
 En sentido (SEQ. ID. NO: 3) ACGCTCCAGAGGATGACGATTGTTTActccatgtggtagagTAAACAATCGTCAATCCCTCTGGag  
 Antisentido (SEQ. ID. NO: 4) CGCACTCCAGAGGATGACGATTGTTTActctaccacatggagTAAACAATCGTCAATCCCTCTGGA

Bases en minúscula en cursiva = bucle de ARNsh  
 Bases en negrita y mayúsculas = Secuencia que direcciona a BCL11A para formar un ARNsh  
 Bases subrayadas = Termina la clonación (sintético)

**FIG. 1**



**FIG. 2**

SFFV-LV anula eficientemente Bcl11a e induce la expresión de  $\epsilon\gamma$ -globina

in vitro: células de eritroleucemia murina transducidas in vivo: LSK-HSC transducida transplantada

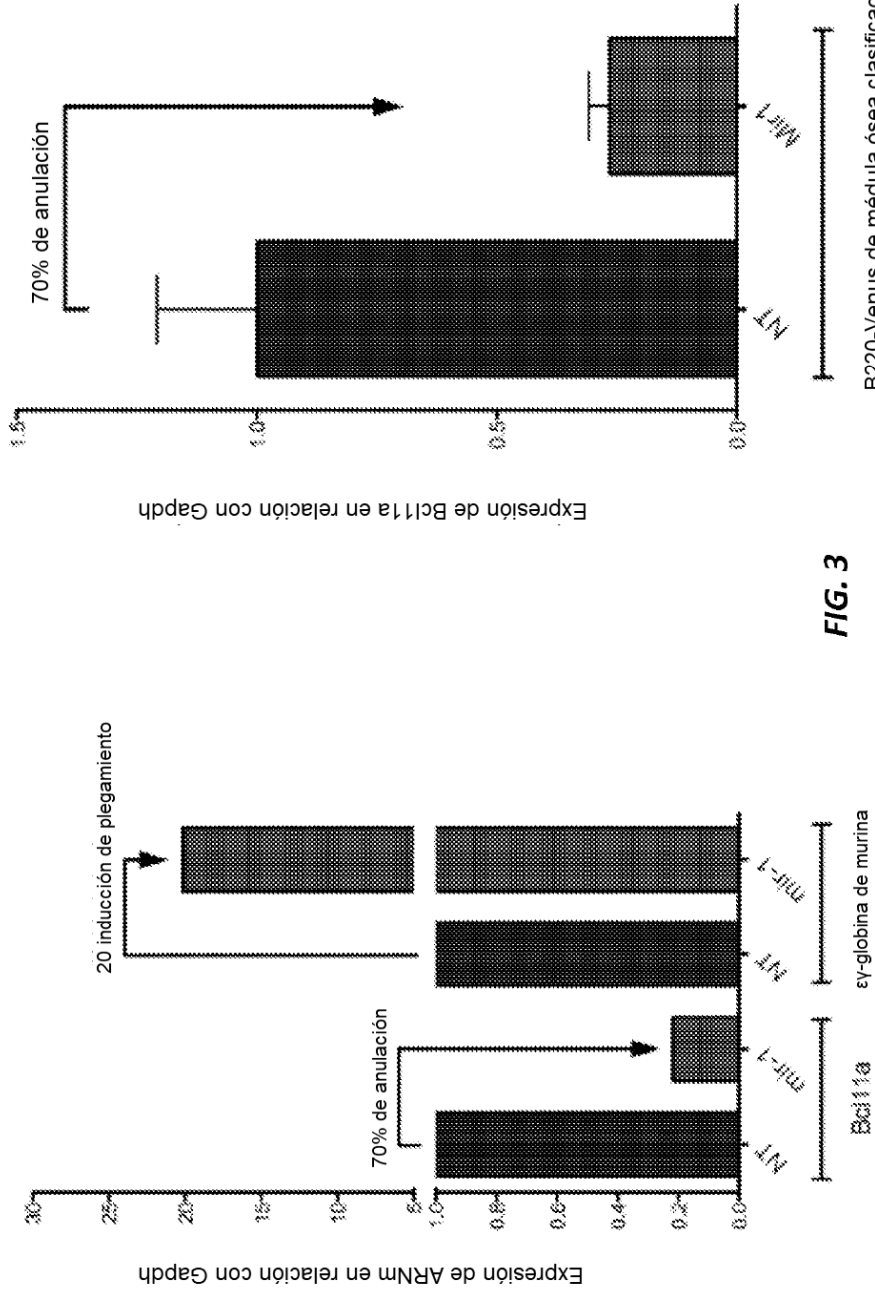
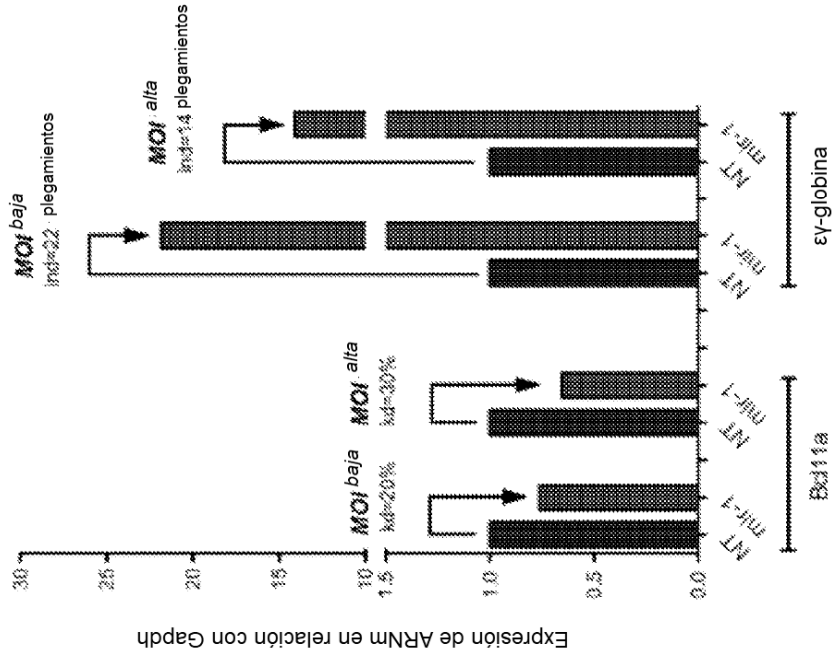


FIG. 3

# LCR/TET-LV anula eficientemente Bcl11a e induce la expresión de $\epsilon\gamma$ -globina

LCR-LV : efectos de una mayor transducción de MOI



TET-LV : dependencia de la dosis en inducción de doxyciclina

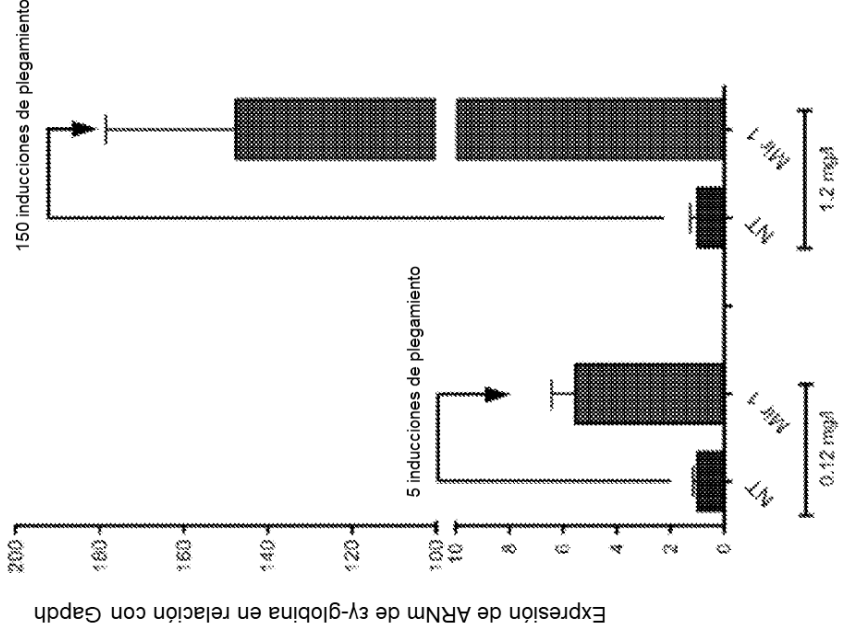
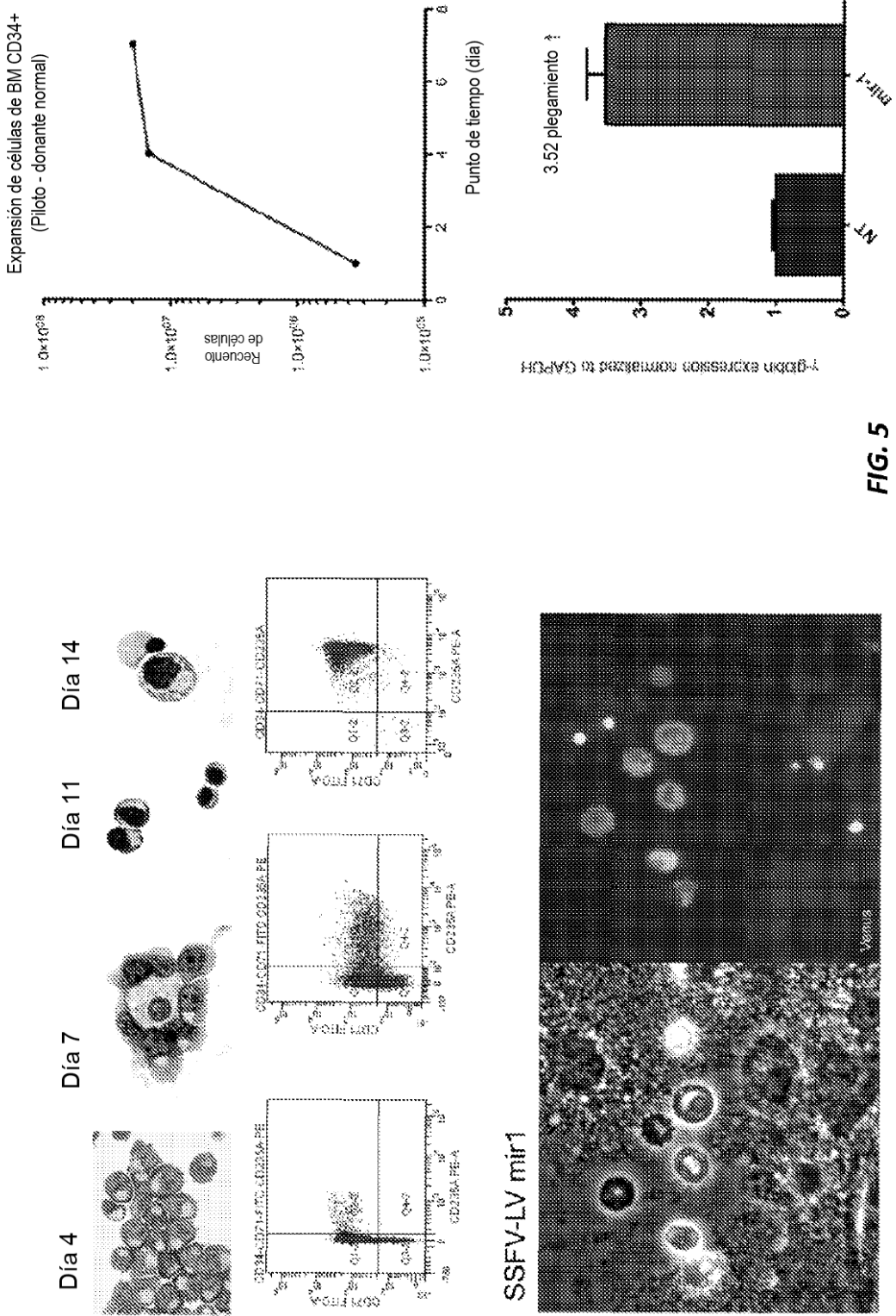


FIG. 4



**HSC CD34 transducida se diferencia ex-vivo en eritrocitos y expresa Hbf**



**FIG. 5**

HSCs CD34+ transducidas con LCR-LV de pacientes con SCD trasplantada en NSG

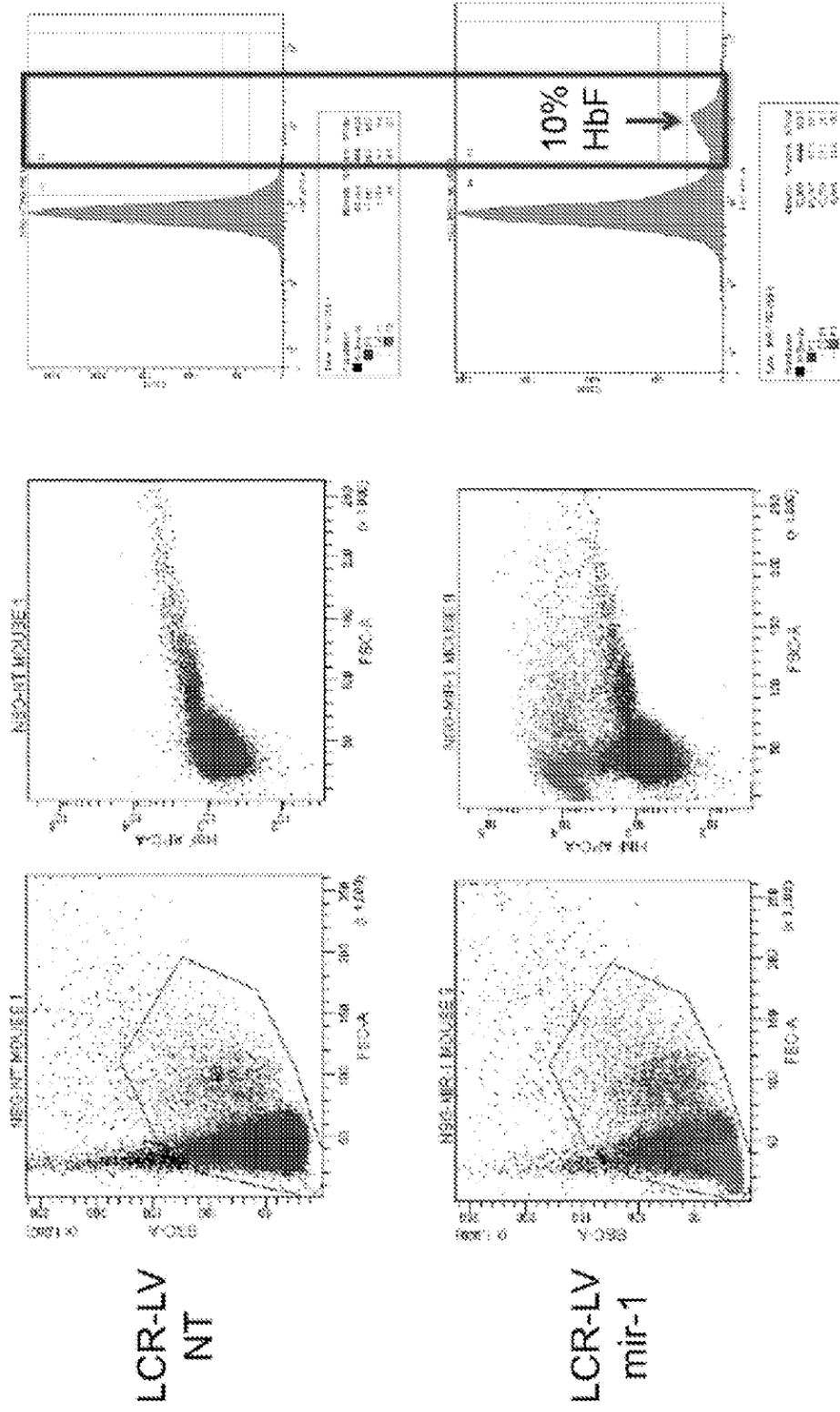
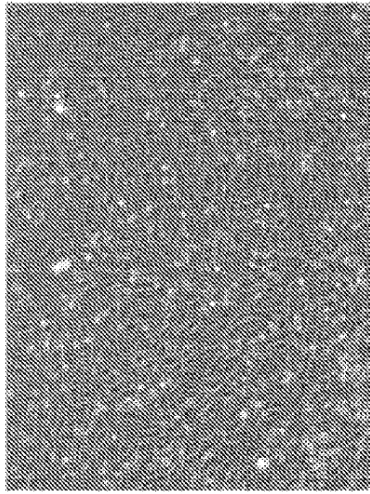


FIG. 6

Investigación de la toxicidad potencial del papel de Bcl11a en el desarrollo linfóide



HSC hCD34 clasificadas para Venus en MS-5, 100x

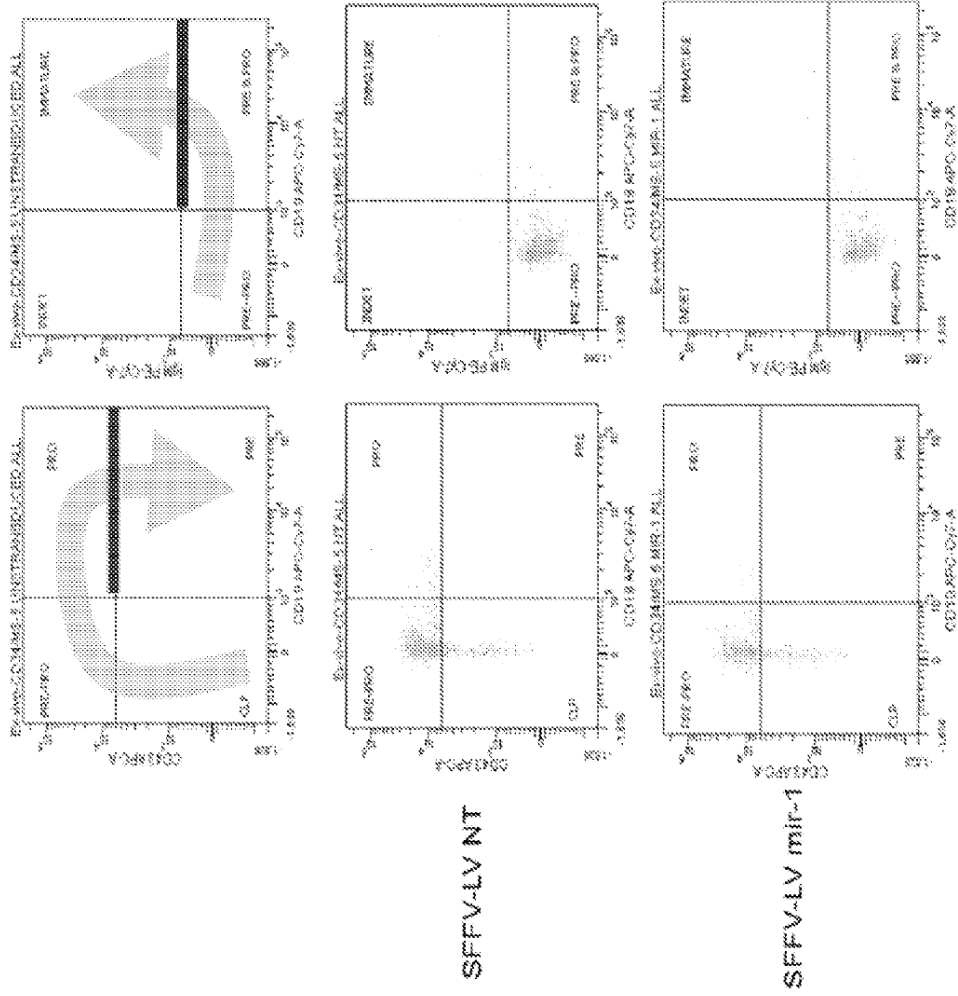
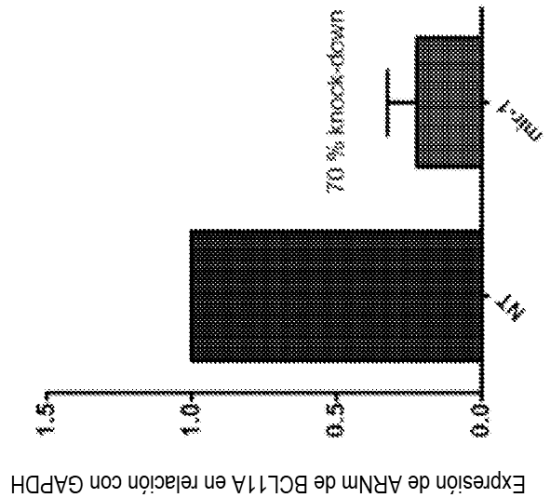
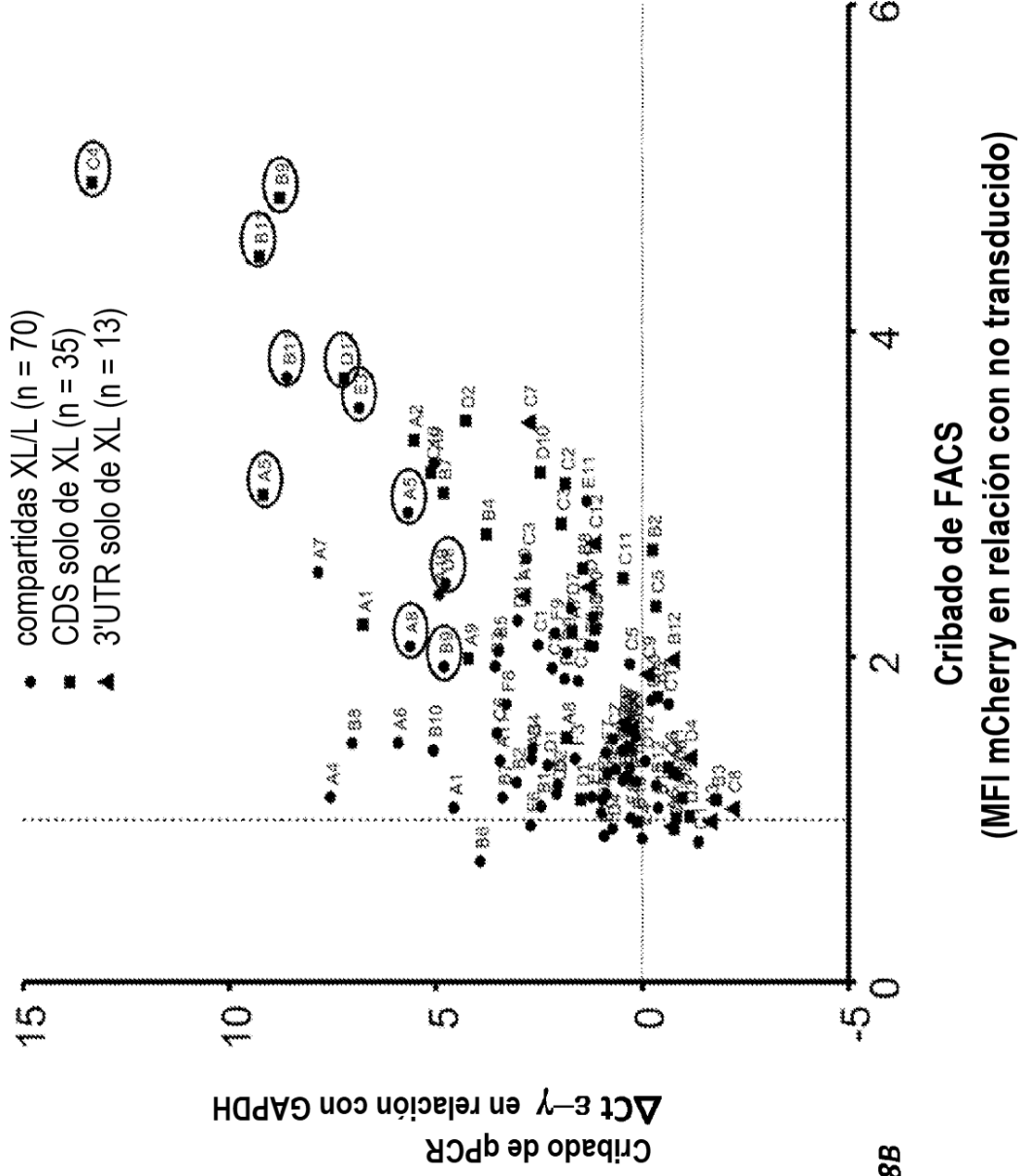


FIG. 7



Cribado de ARNish direccionado a Bcl11A usando el vector pLKO



Anulación de BCL11A e inducción de  $\epsilon$ -y en esqueletos de pLKO y LEGO

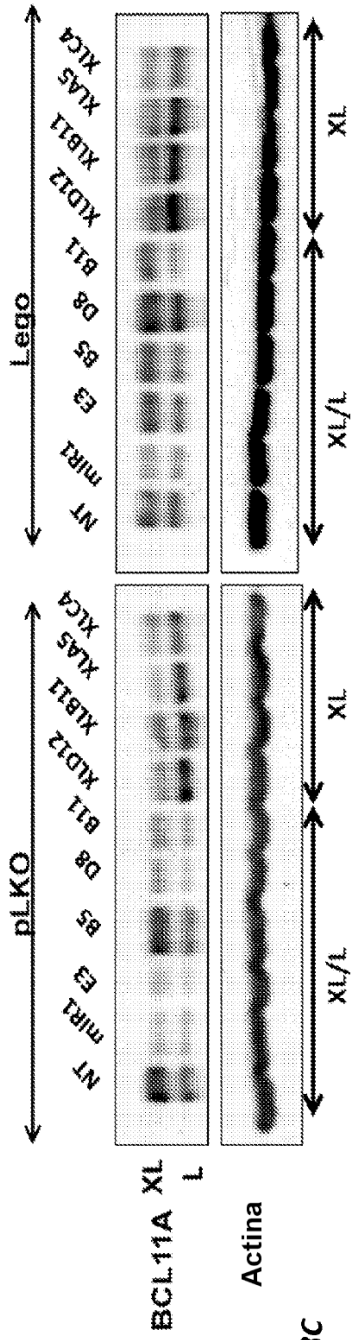


FIG. 8C

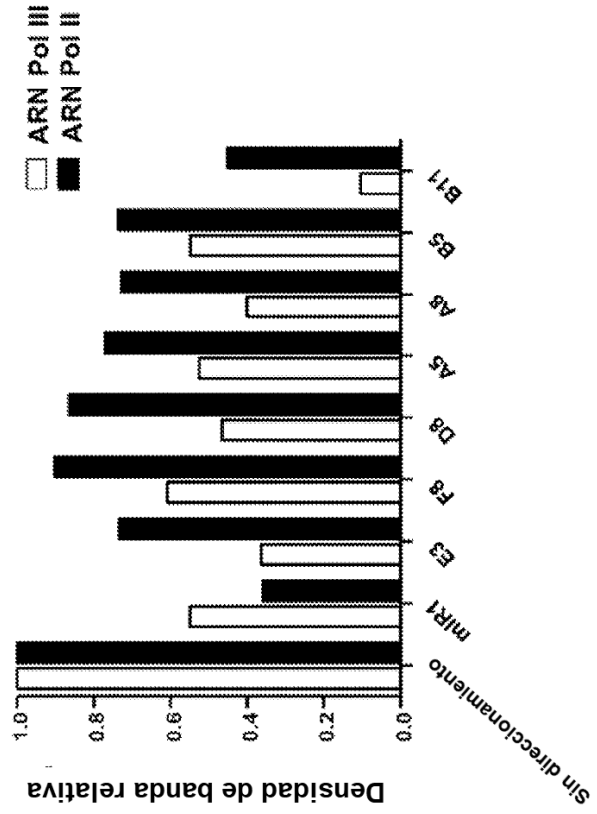


FIG. 8D

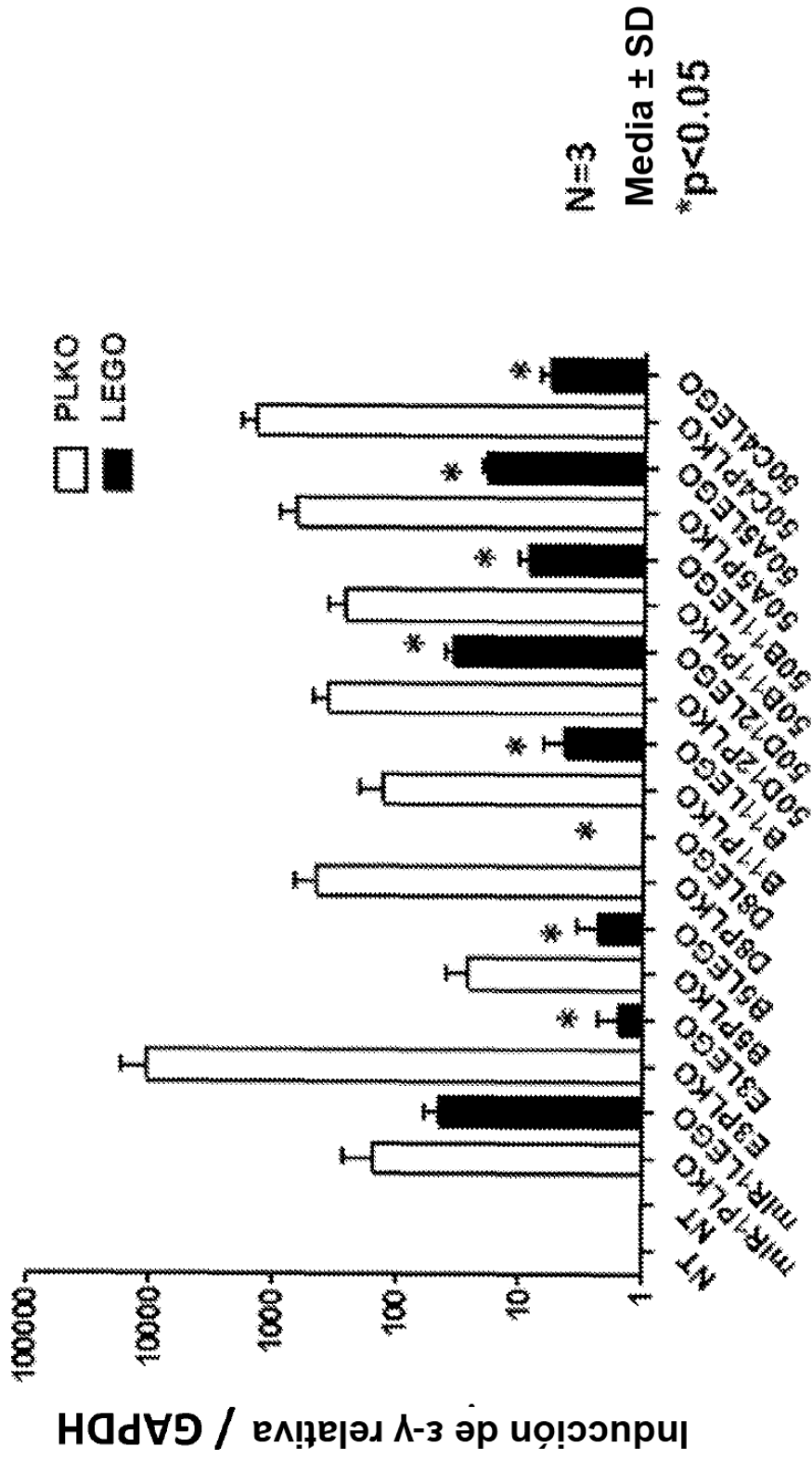


FIG. 8E





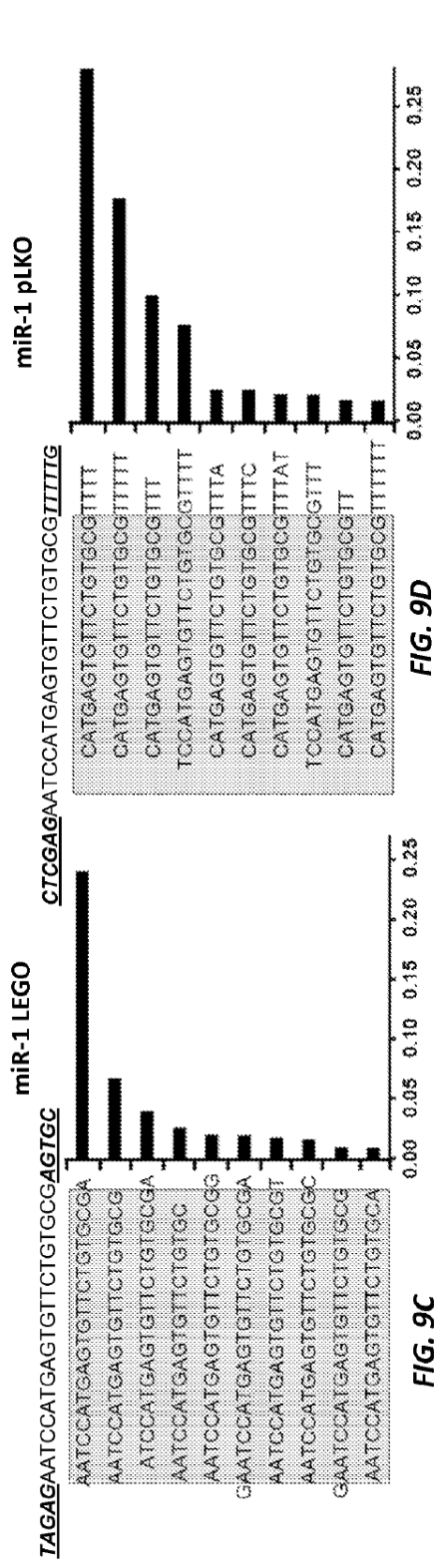


FIG. 9D

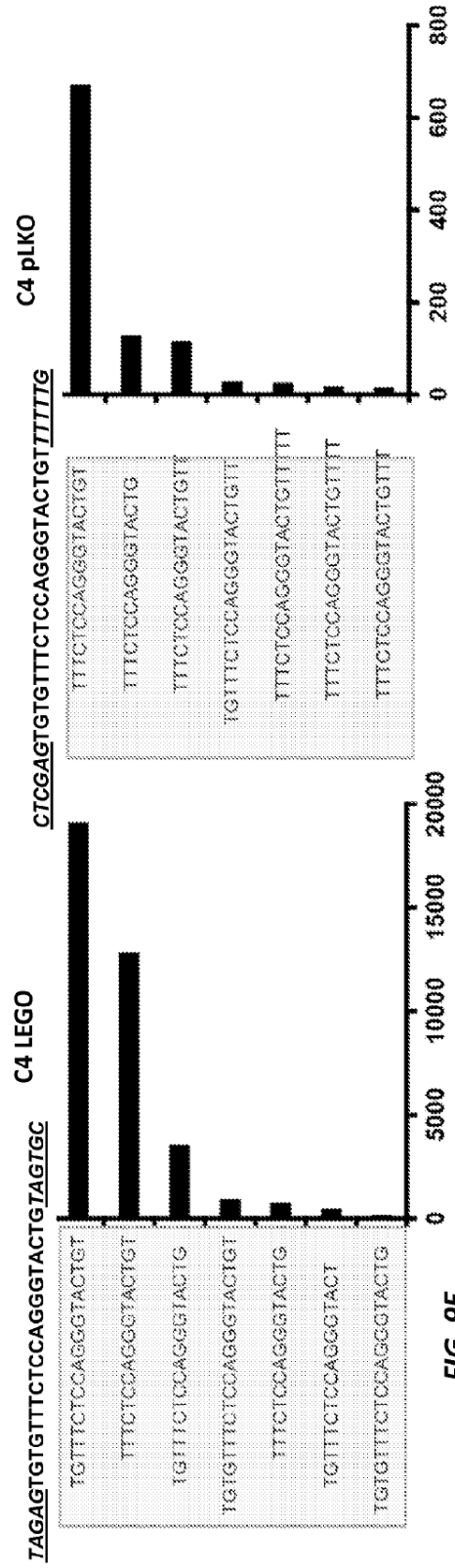


FIG. 9C

FIG. 9E

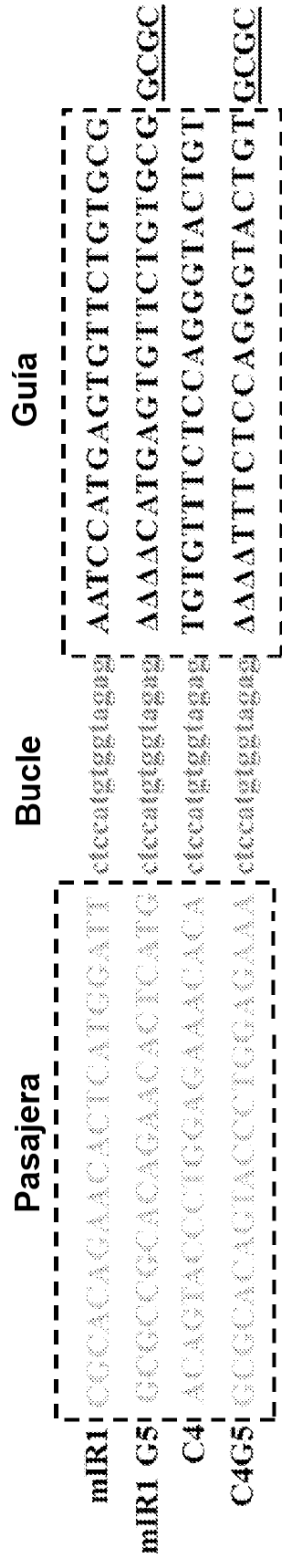


FIG. 10A

Sin direccionamiento  
 mIR1G1-G21  
 mIR1G4-G21  
 mIR1G5-G21  
 E3 G1-G21  
 E3 G4-G21  
 E3 G5-G21  
 C4 G1-G21  
 C4 G4-G21  
 C4 G5-G21

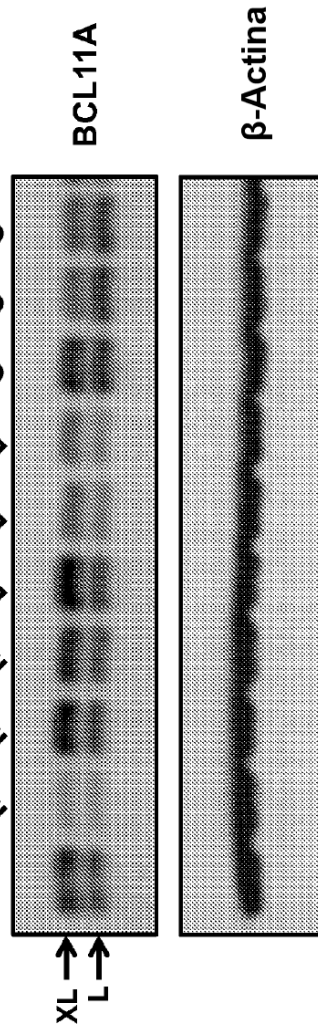


FIG. 10B

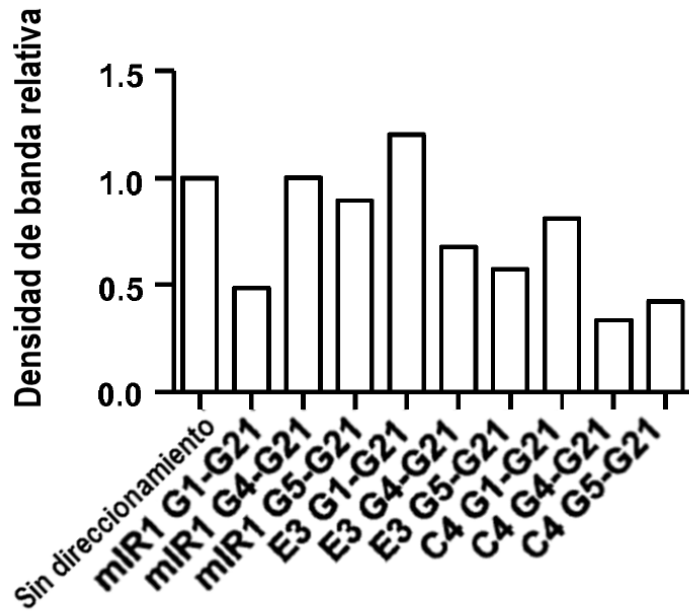


FIG. 10C

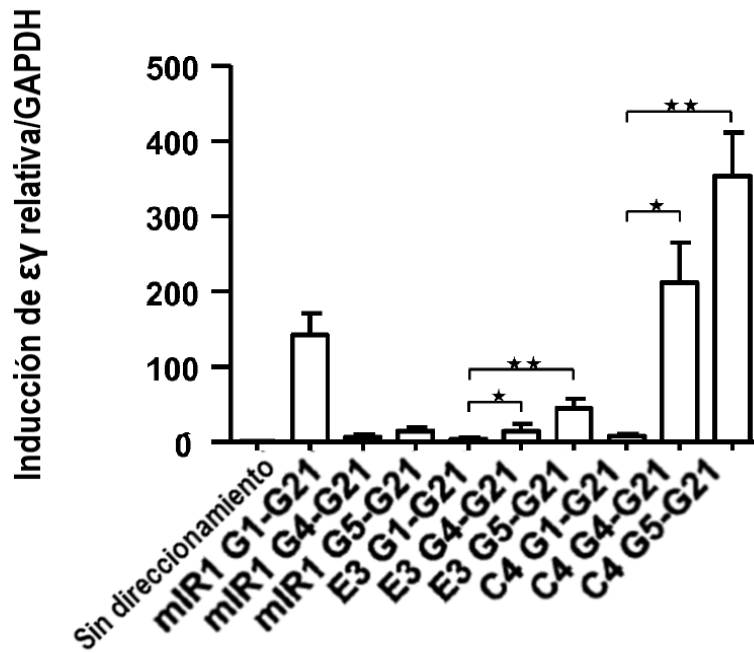
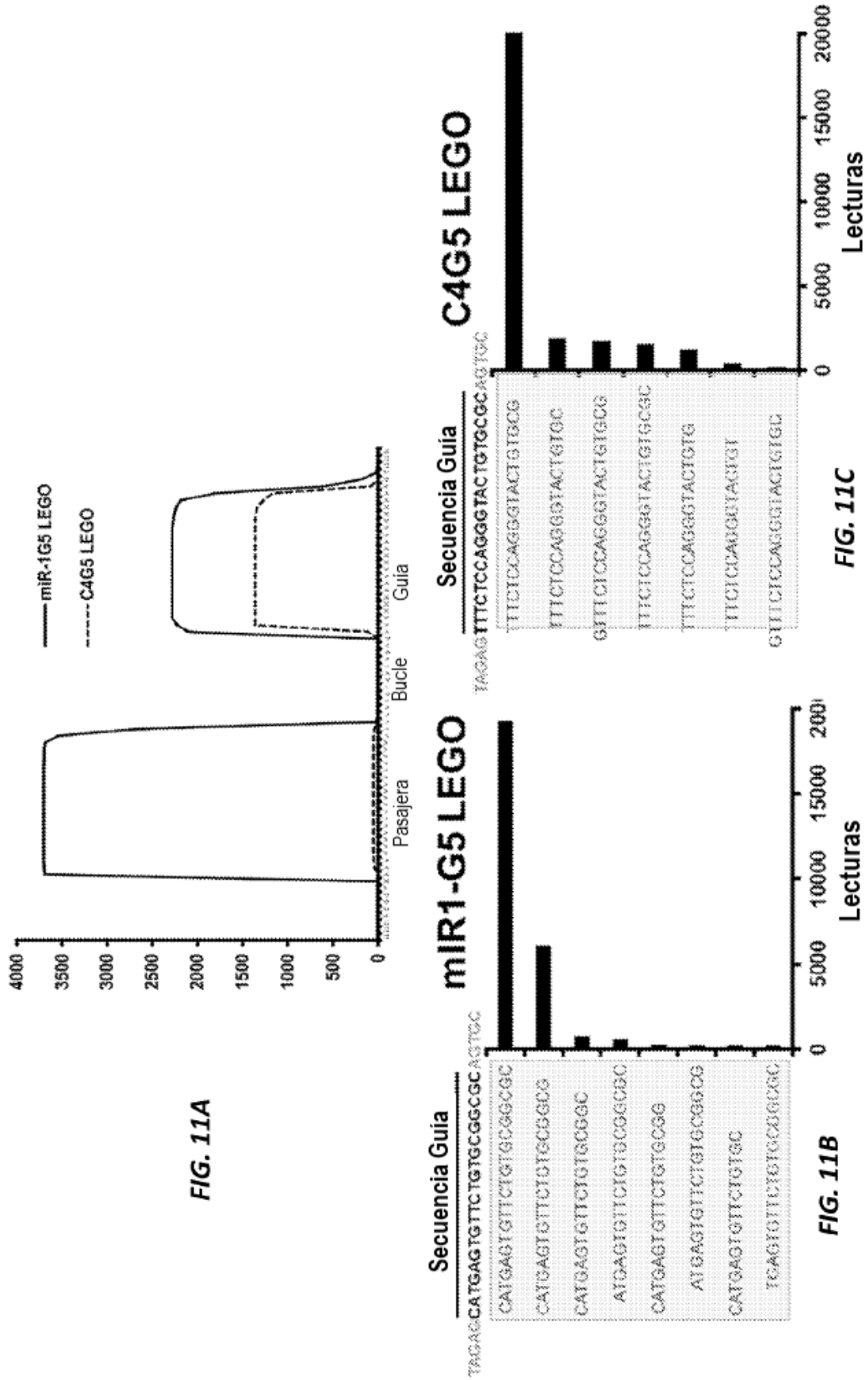


FIG. 10D



Candidatos del cribado de ARNsh direccionada a BCL11A usando el vector pLKO

	Pasajera	Bucle	Guía	
mIR1	CGCACAGAACACTCATGGATTctccatgtggtagag	AATCCATGAGTGTCTGTGCGG	SEQ. ID. NO: 25	
E3	TCGGAGACTCCAGACAATCGCctccatgtggtagag	GCGATTGTCIGGAGTCTCCGA	SEQ. ID. NO: 26	
B5	CCTCCAGGCAGCTCAAAGATCctccatgtggtagag	GATCTTTGAGCTGCCCTGGAGG	SEQ. ID. NO: 27	
D8	TTCTCTTGCAACACGCACAGActccatgtggtagag	TCTGTGCGTGTGCAAGAGAA	SEQ. ID. NO: 28	
B11	TCAGGACTAGGTCAGAAATGTctccatgtggtagag	ACATTTCGCACCTAGTCTCTGA	SEQ. ID. NO: 29	
50D12	GATCGAGTGTGAAATAATGATctccatgtggtagag	ATCATTATTCAACACTCGATC	SEQ. ID. NO: 30	
50B11	CACTGTCCACAGGAGAAGCCActccatgtggtagag	TGGCTTCTCCTGTGGACAGTG	SEQ. ID. NO: 32	
50A5	CAGTACCCCTGGAGAAACACATctccatgtggtagag	ATGTGTTTCTCCAGGGTACTG	SEQ. ID. NO: 31	
50C4	ACAGTACCCCTGGAGAAACACActccatgtggtagag	TGTGTTTCTCCAGGGTACTGT	SEQ. ID. NO: 33	

FIG. 12A

Composición y distribución de secuencia de cadena guía en PLKO

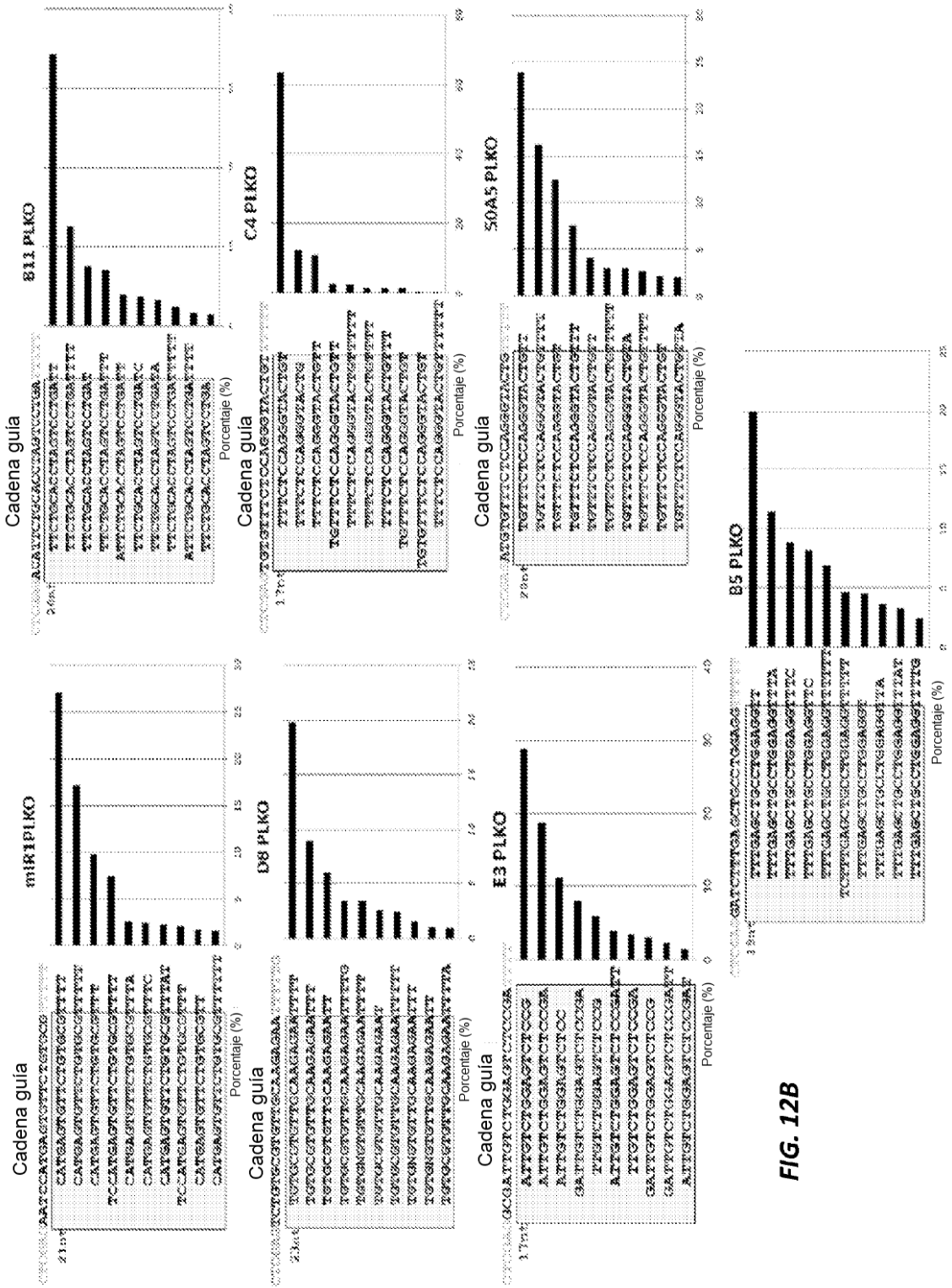


FIG. 12B

Composición y distribución de secuencia de cadena guía en LEGO

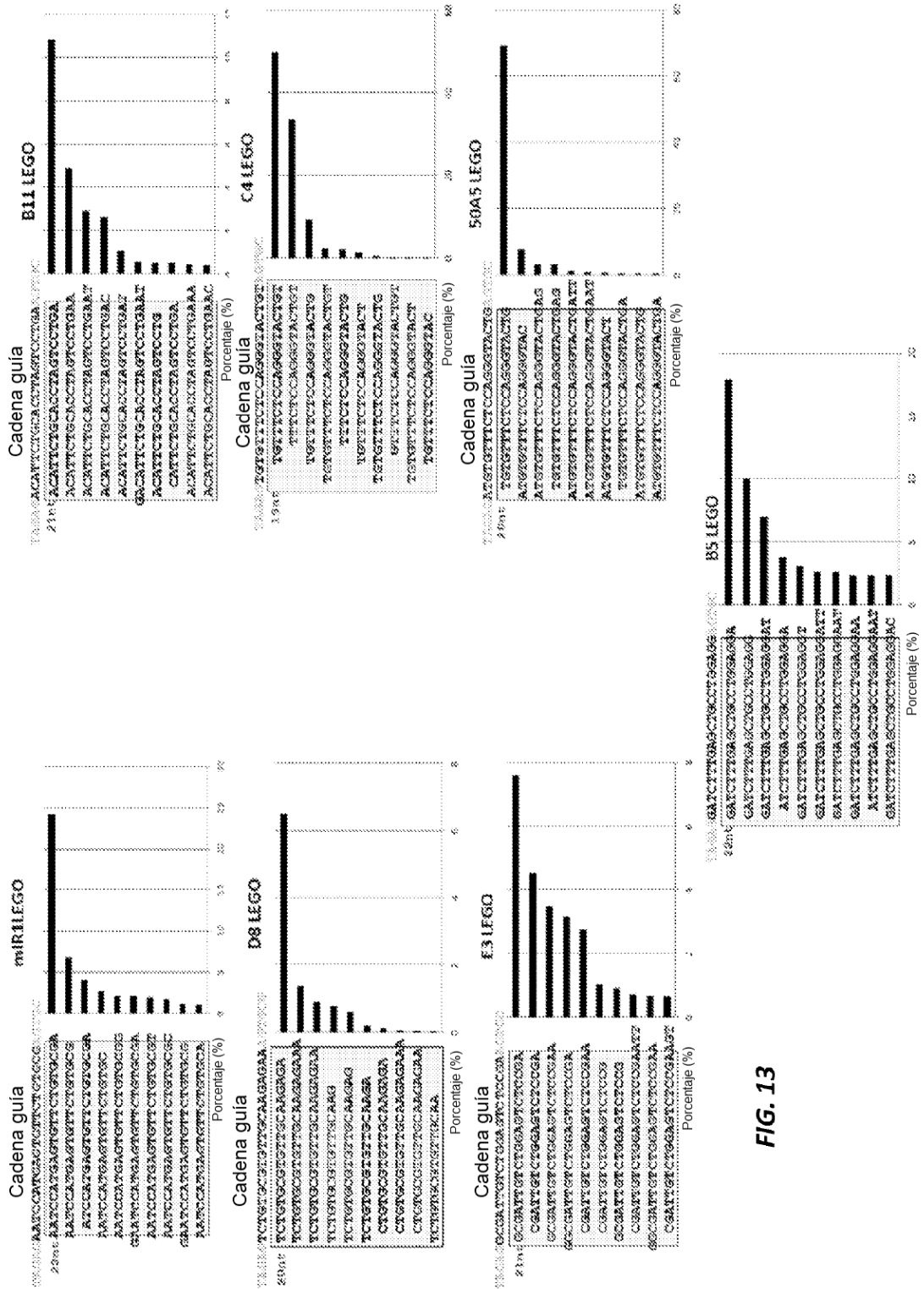


FIG. 13

Diseño de nuevos ARNsh para imitar cadenas guía maduras producidas en el vector pLKO

	Pasajera	Bucle	Guía	
mIR1G5	gcgcccacagAACACTCATGxxxxctccatgtggtagagxxxxCATGAGTGTCTGTGCGgcgc			SEQ. ID. NO: 34
E3G5	gcgcTCGGAGACTCCAGACAAXxxxxctccatgtggtagagxxxxTTGTCTGGAGTCTCCGAgcgc			SEQ. ID. NO: 35
B5G5	gcgcCCTCCAGGCAGCTCAAXxxxxctccatgtggtagagxxxxTTTGAGCTGCCTGGAGGgcgc			SEQ. ID. NO: 36
D8G5	gcgcTTCTCTTCCAACACGCCAAXxxxxctccatgtggtagagxxxxTGGTGTTCGAAGAGAAgcgc			SEQ. ID. NO: 37
B11G5	gcgcTCAGGACTAGGTGCAGAXxxxxctccatgtggtagagxxxxTCTGCACCTAGTCTGAgcgc			SEQ. ID. NO: 38
50D12G5	gcgcGATCGAGTGTGAATAAXxxxxctccatgtggtagagxxxxTTATCAACACTCGATCgcgc			SEQ. ID. NO: 39
50B11G5	gcgcCACTGTCCACAGGAGAAAXxxxxctccatgtggtagagxxxxTTCTCTGTGGACAGTggcgc			SEQ. ID. NO: 41
50A5G5	GCGCCAGTACCCTGGAGAAACxxxxctccatgtggtagagxxxxGTTTCTCCAGGTACTGgcgc			SEQ. ID. NO: 40
50C4G5	gcgcACAGTACCCTGGAGAAAXxxxxctccatgtggtagagxxxxTTCTCCAGGTACTGTgcgc			SEQ. ID. NO: 42

FIG. 14A



Composición y distribución de secuencias de cadena guía en LEGO modificado

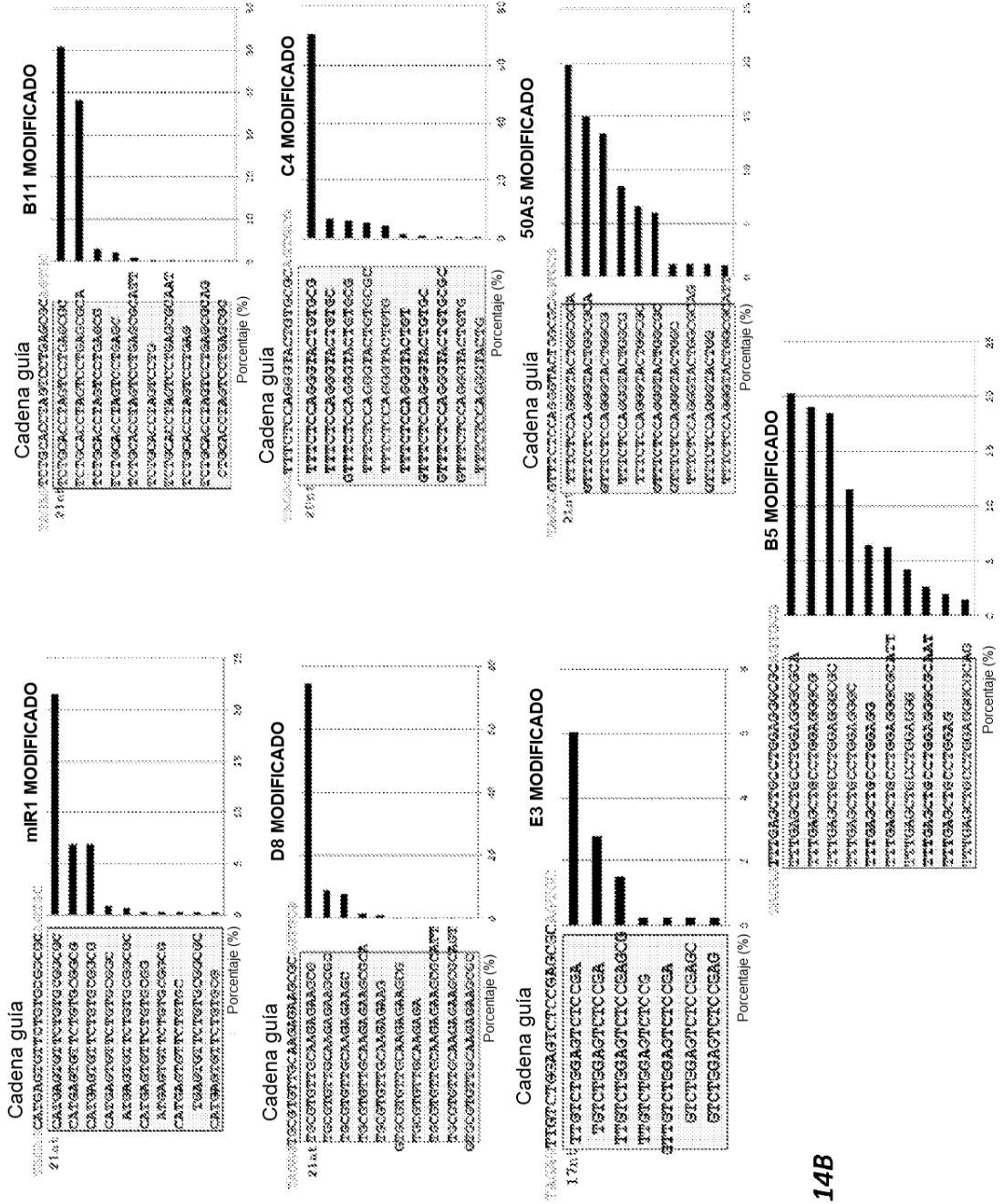


FIG.14B

Comparación de la anulación de BCL11A con secuencias guía modificadas

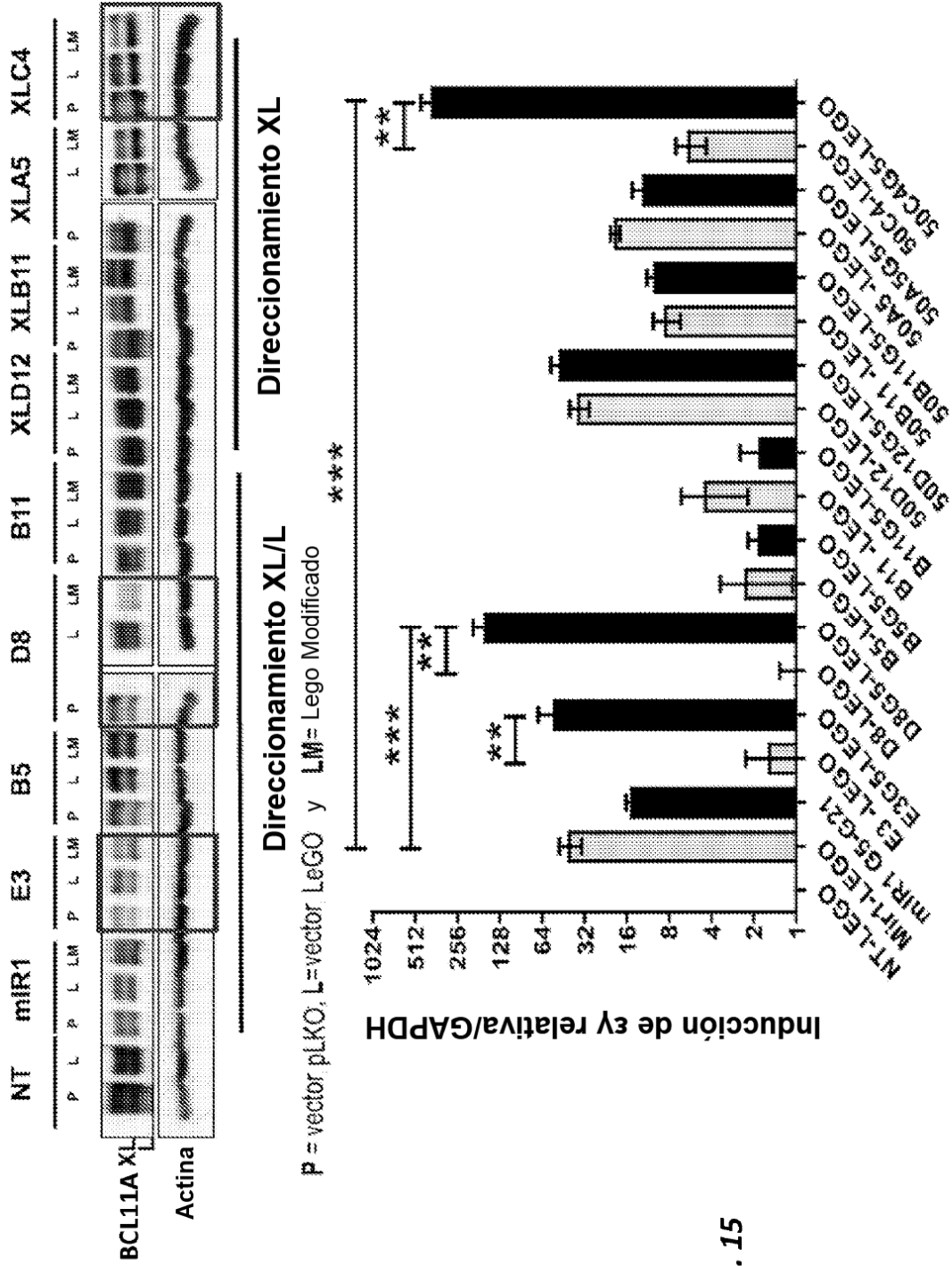


FIG. 15

Comparación de la expresión miR con secuencias guía modificadas

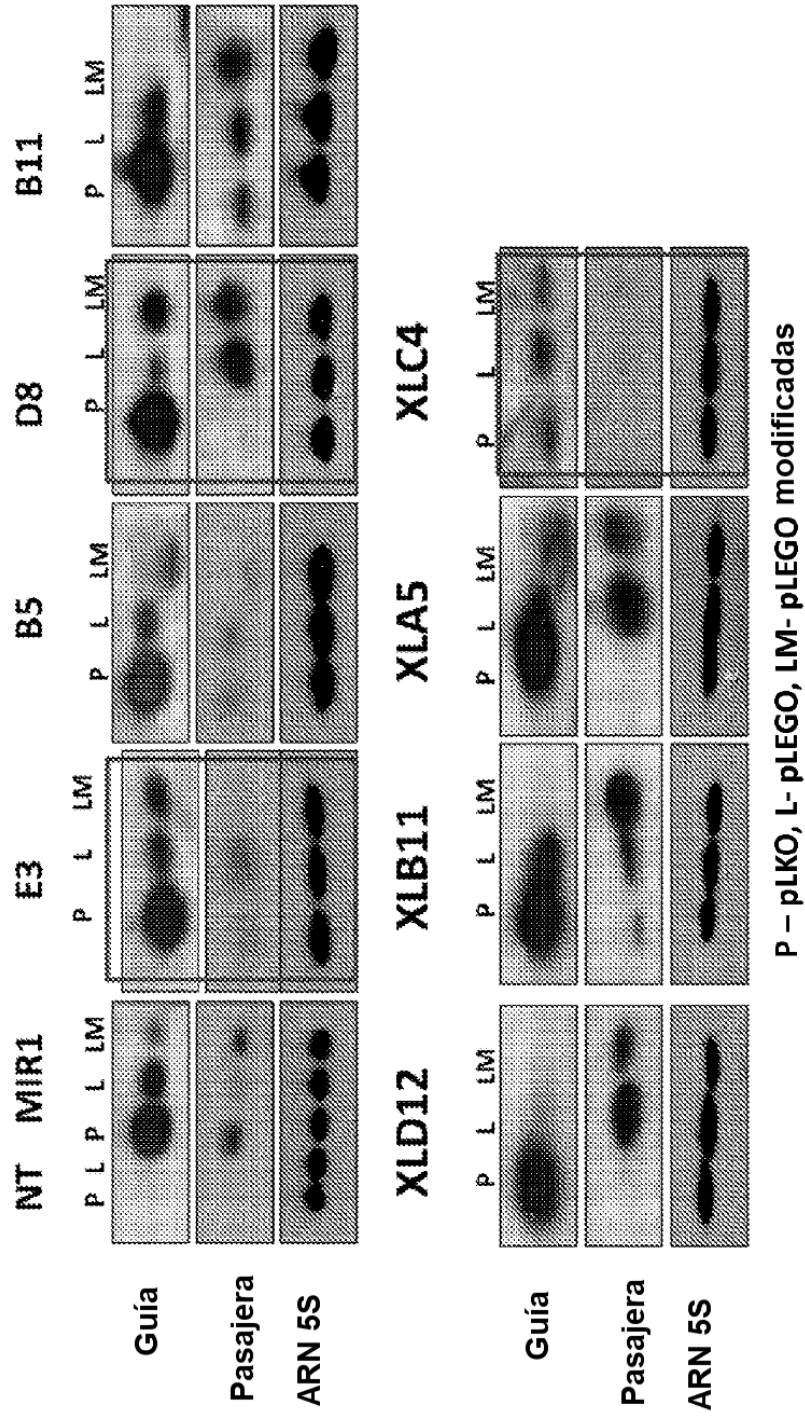


FIG. 16

Eficiencia de anulación de BCL11A e inducción de  $\gamma$  con vectores LEGO

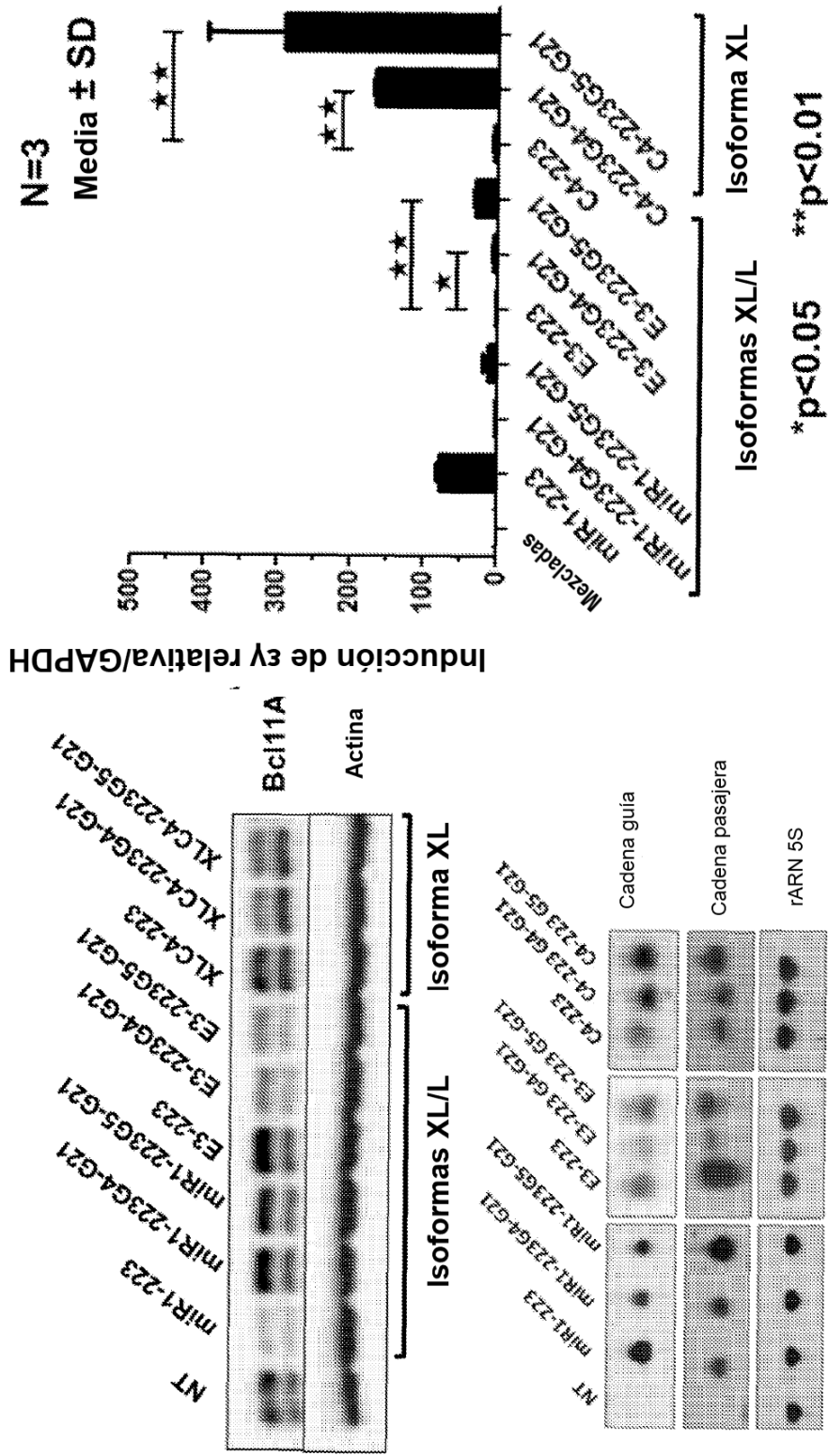


FIG. 17

Procesamiento diferencial en vectores de ARNsh pol-III y vectores de ARNsh adaptados con microARN pol-II

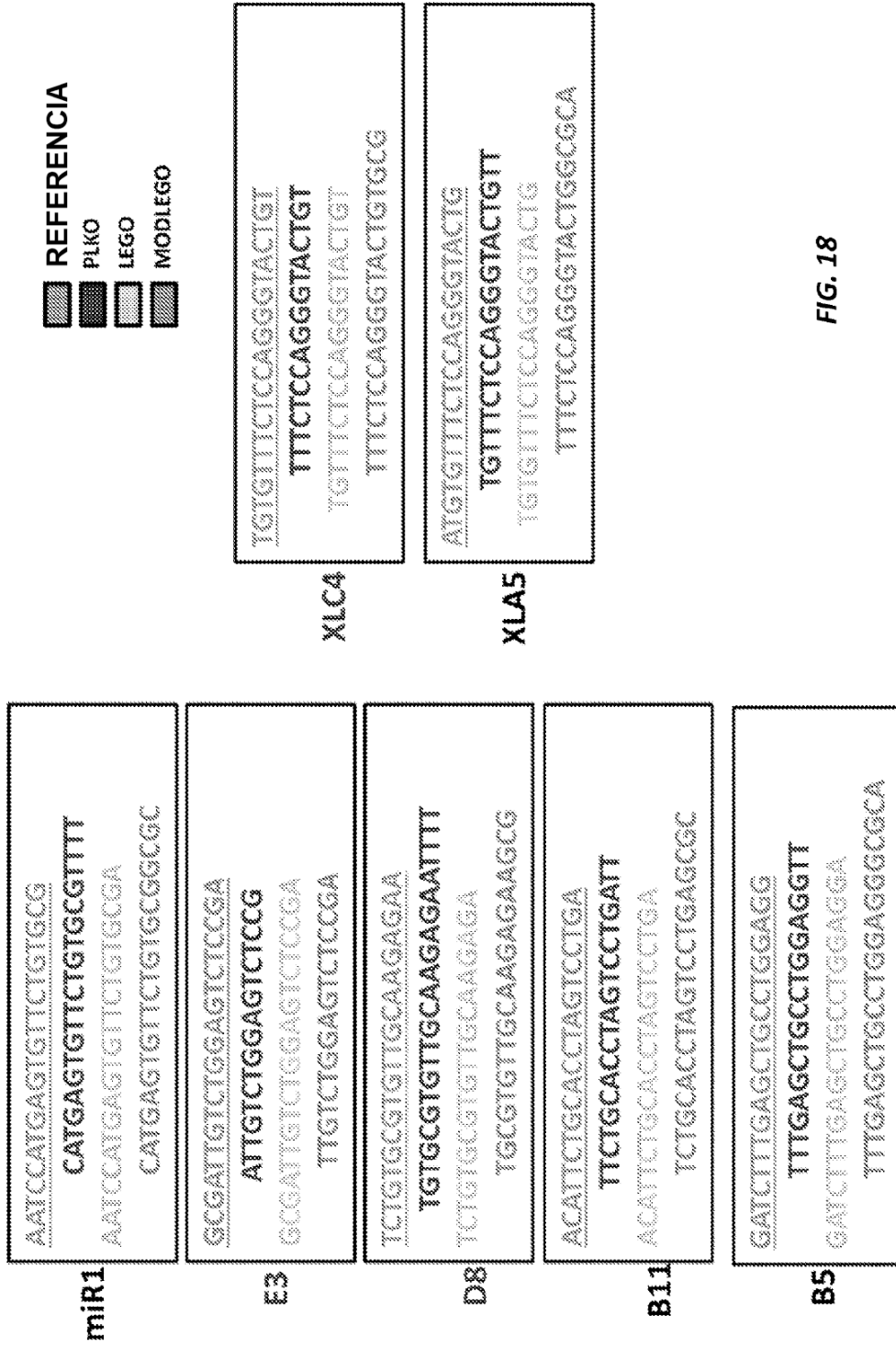


FIG. 18

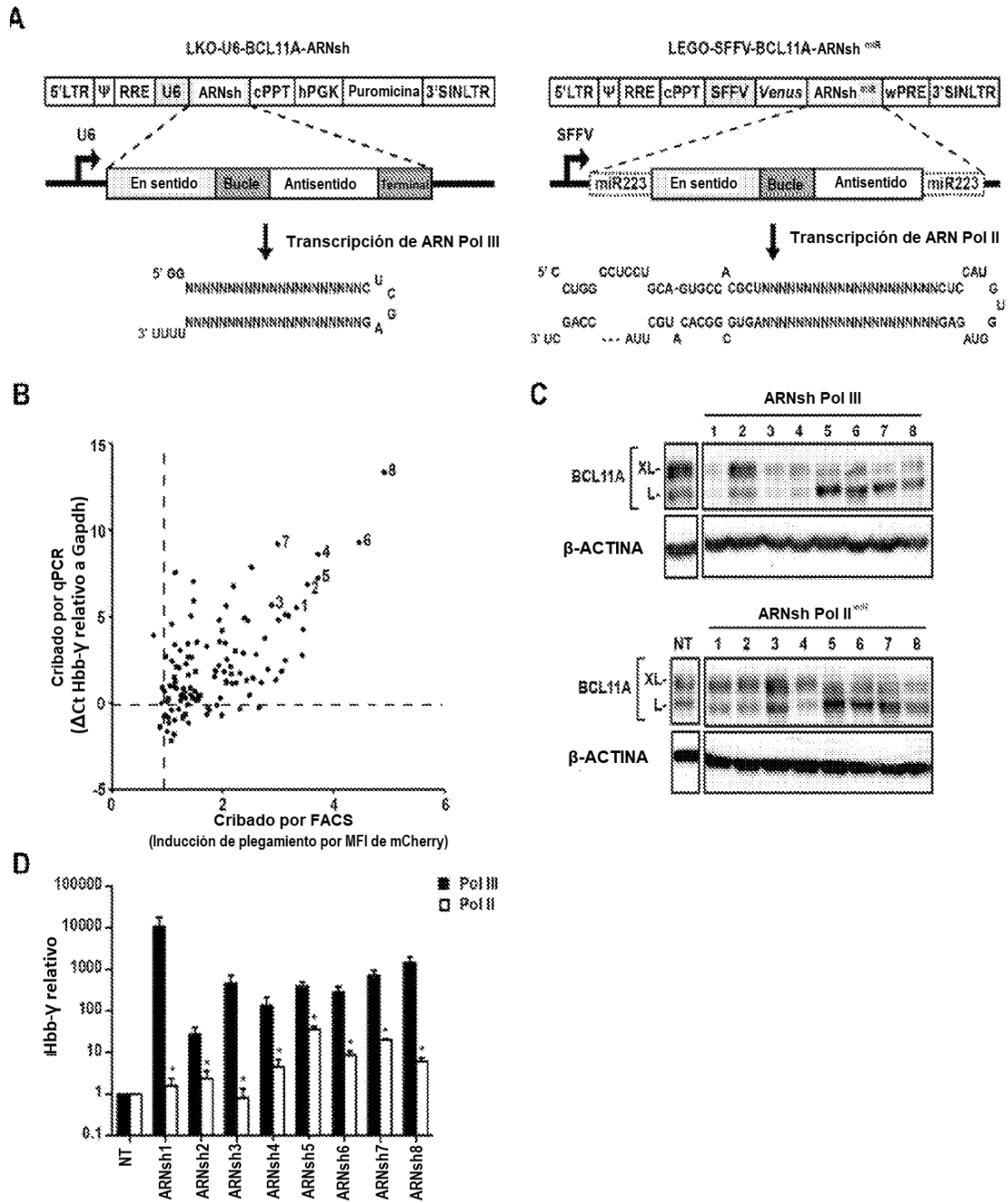


FIG. 19

Transcripción basada en polimerasa Pol III

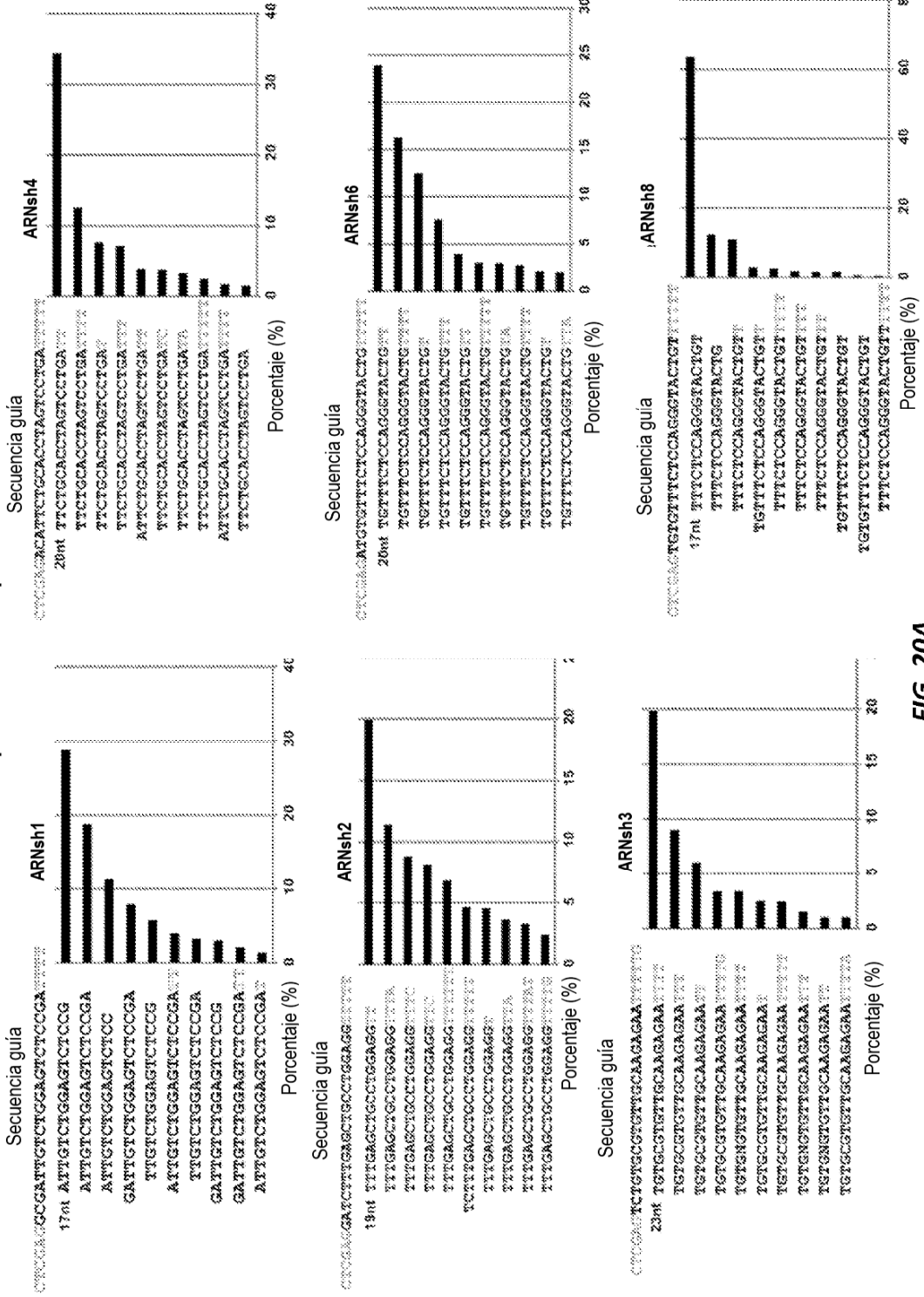


FIG. 20A

Transcripción basada en polimerasa Pol II

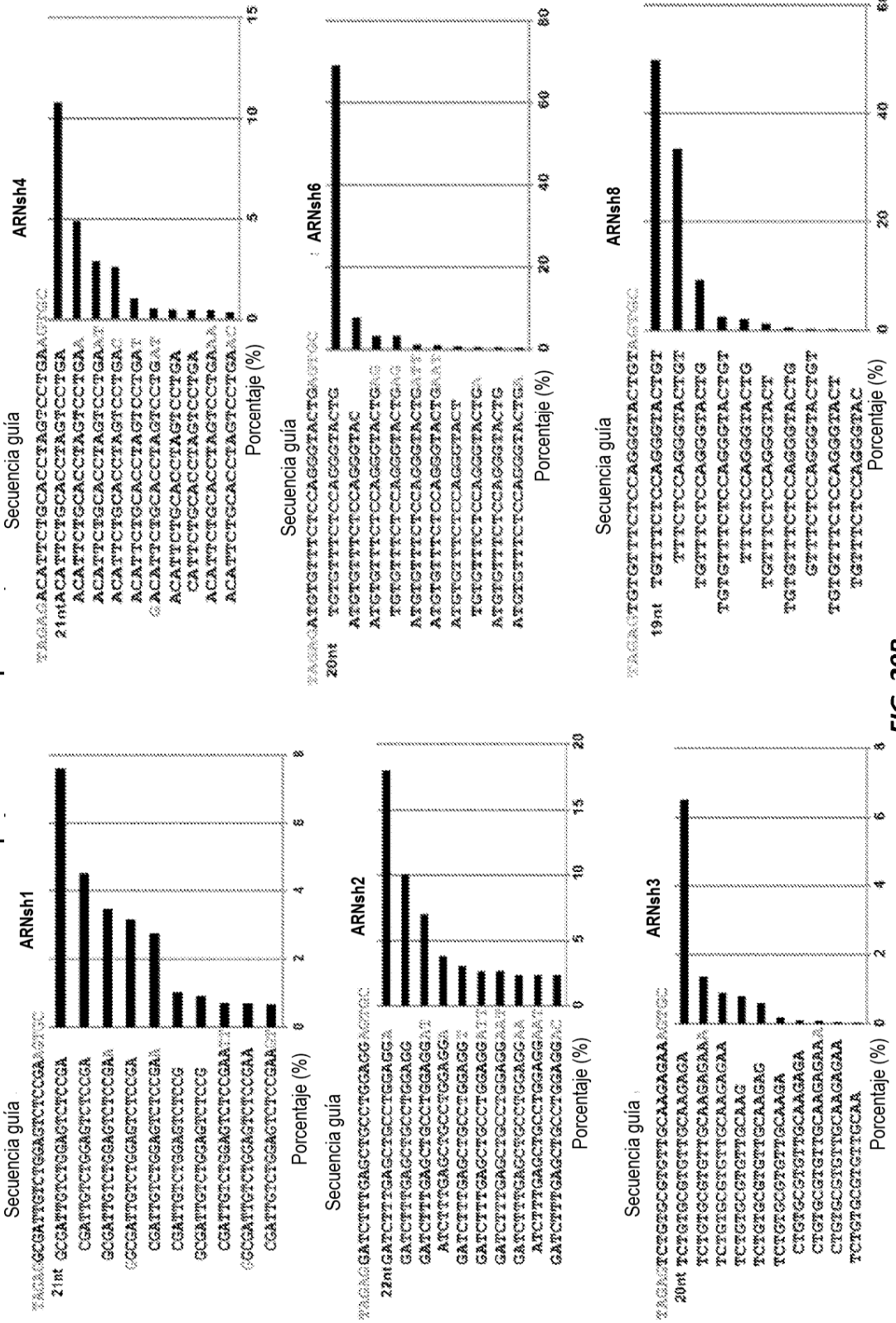


FIG. 20B



		Pasajera	Bucle	Guía	
ARNsh miR	1	ARNsh <sup>miR</sup>	TCGGAGACTCCAGACAATGCC	ctccatgtggttagag	GCGATTGTCTGGAGTCTCCGA
		ARNsh <sup>miR</sup> mod	GCGCTCCGAGACTCCAGACAA	ctccatgtggttagag	TTGTCTGGAGTCTCCGAGCGC
	2	ARNsh <sup>miR</sup>	CCTCCAGGCAGCTCAAACTC	ctccatgtggttagag	GATCTTTGAGCTGCCTGGAGG
		ARNsh <sup>miR</sup> mod	GCGCCCTCCAGGCAGCTCAAA	ctccatgtggttagag	TTTGAGCTGCCTGGAGGCGC
	3	ARNsh <sup>miR</sup>	TTCTCTTGCAACACGCACAGA	ctccatgtggttagag	TCTGTGCGTGTTCGAAGAGAA
		ARNsh <sup>miR</sup> mod	GCGCTTCTCTTGCAACACCCA	ctccatgtggttagag	TGCGTGTTCGAAGAGAAGCGC
	4	ARNsh <sup>miR</sup>	TCAGGACTAGGTGCAGAAATGT	ctccatgtggttagag	ACATTCTGCACCTAGTCTCTGA
		ARNsh <sup>miR</sup> mod	GCGCTCAGGACTAGGTGCAGA	ctccatgtggttagag	TCTGCACCTAGTCTCTGAAGCGC
	5	ARNsh <sup>miR</sup>	GATCGAGTGTTCGAATATATGAT	ctccatgtggttagag	ATCATTATTCAACACTCGATC
		ARNsh <sup>miR</sup> mod	GCGCGATCCAGTGTTCGAATAA	ctccatgtggttagag	TTATTCAACACTCGATCGCGC
	6	ARNsh <sup>miR</sup>	CAGTACCTCCAGAGAAACACT	ctccatgtggttagag	ATGTGTTTCTCCAGGGTACTG
		ARNsh <sup>miR</sup> mod	GCGCCAGTACCCTGGAGAAAC	ctccatgtggttagag	GTTTCTCCAGGGTACTGGCGC
	7	shRNA <sup>miR</sup>	CACTGTCCACAGGAGAAAGCC	ctccatgtggttagag	TGGCTTCTCCTGTGGACAGTG
		ARNsh <sup>miR</sup> mod	GCGCCACTGTCCACAGSAGAA	ctccatgtggttagag	TTCTCCTGTGGACAGTGGCGC
	8	ARNsh <sup>miR</sup>	ACAGTACCCTCCAGAAACAC	ctccatgtggttagag	TGTGTTTCTCCAGGGTACTGT
		ARNsh <sup>miR</sup> mod	GCGCACAGTACCCTGGAGAAA	ctccatgtggttagag	TTTCTCCAGGGTACTGTGGCGC

FIG. 21A

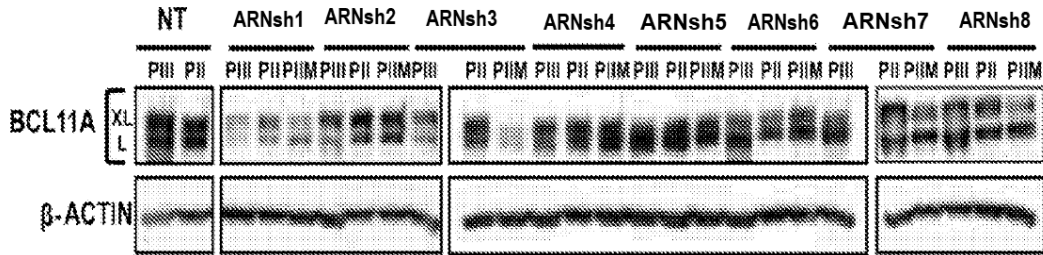


FIG. 21B

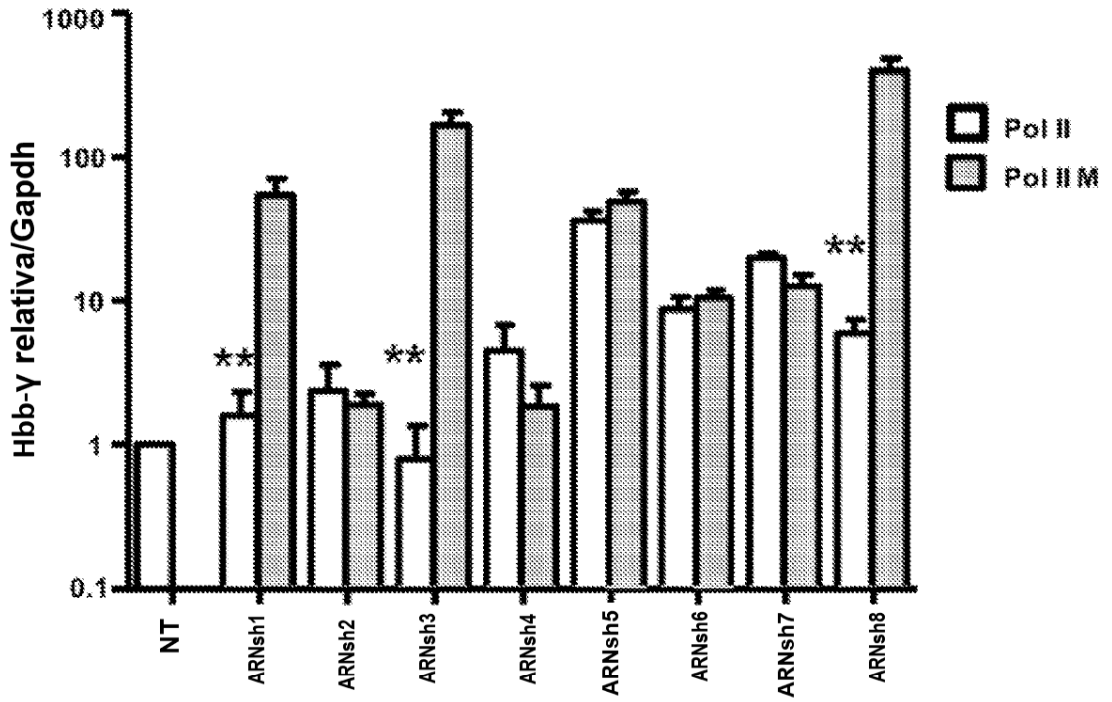


FIG. 21C

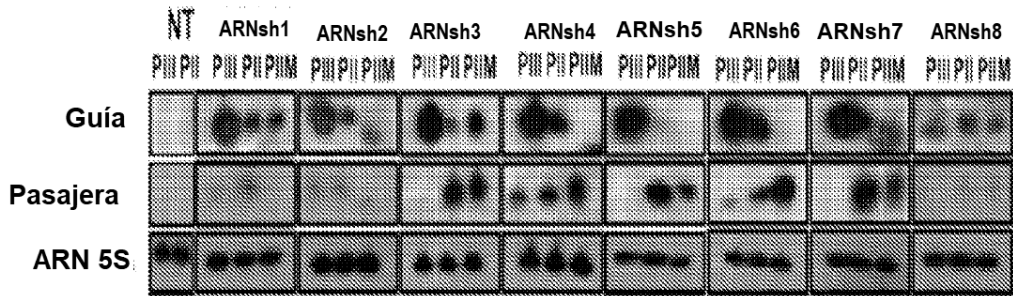


FIG. 21D



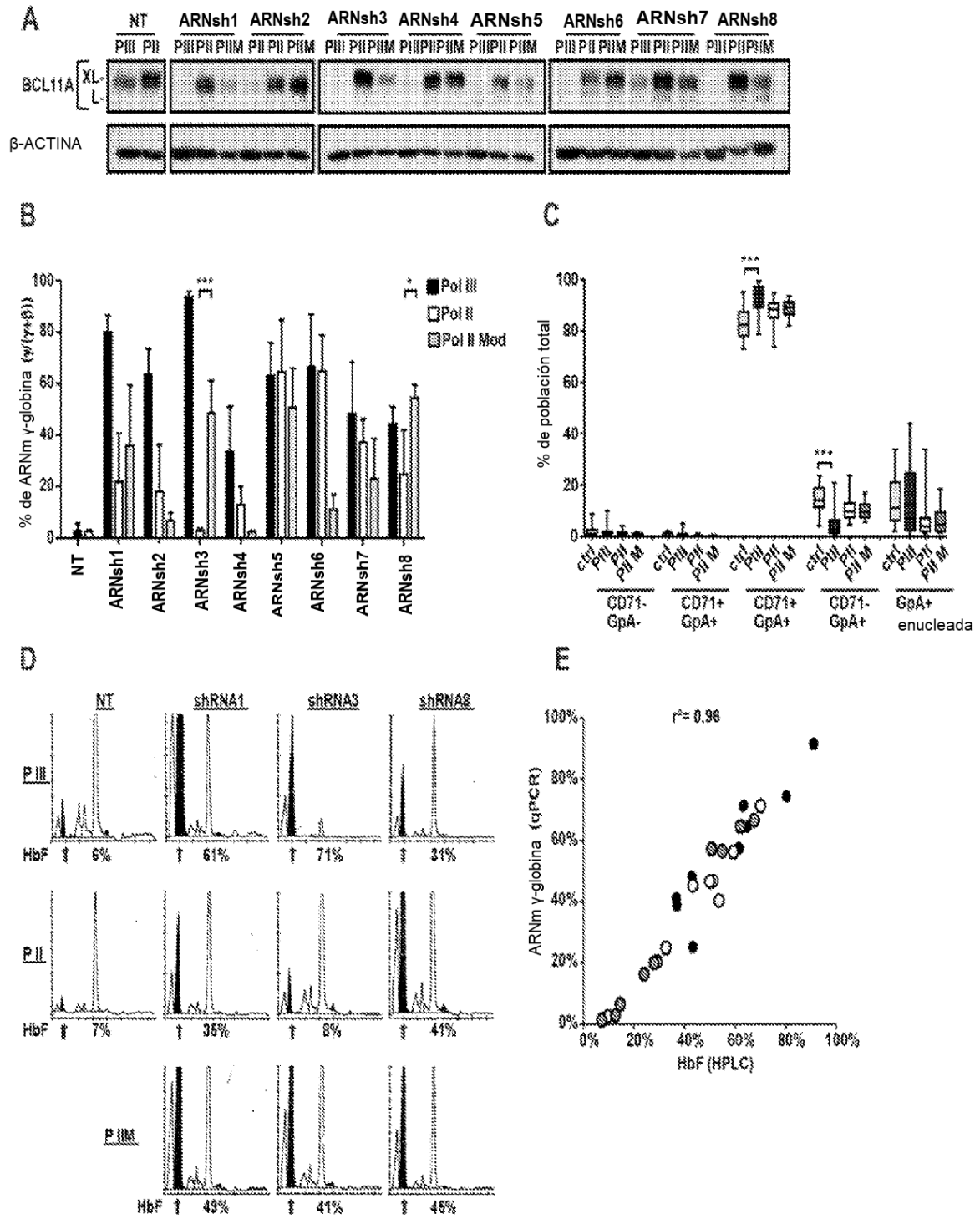


FIG. 22

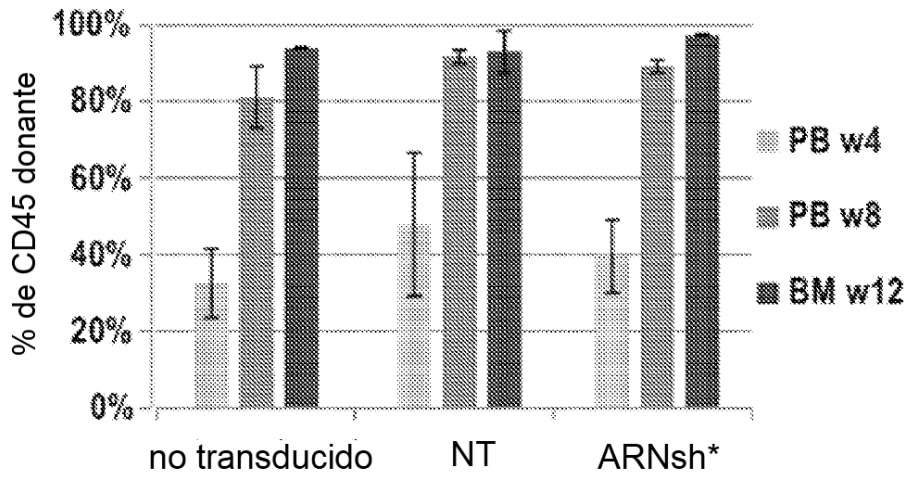


FIG. 23A

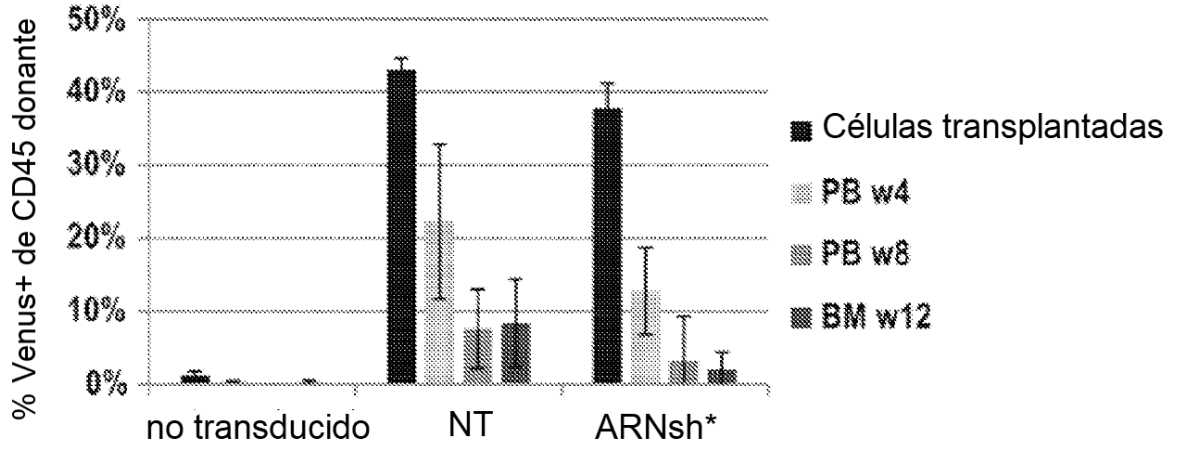
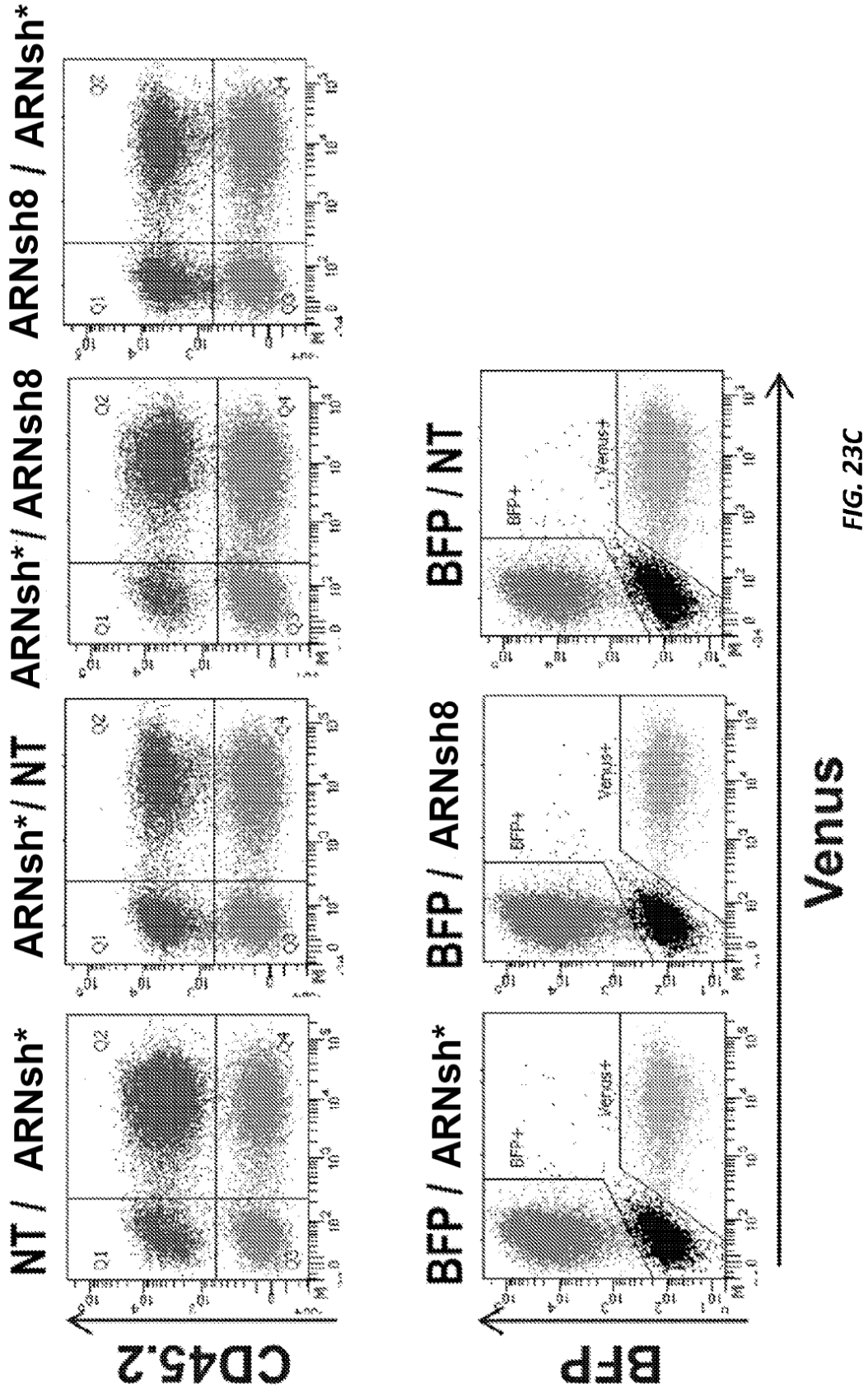


FIG. 23B



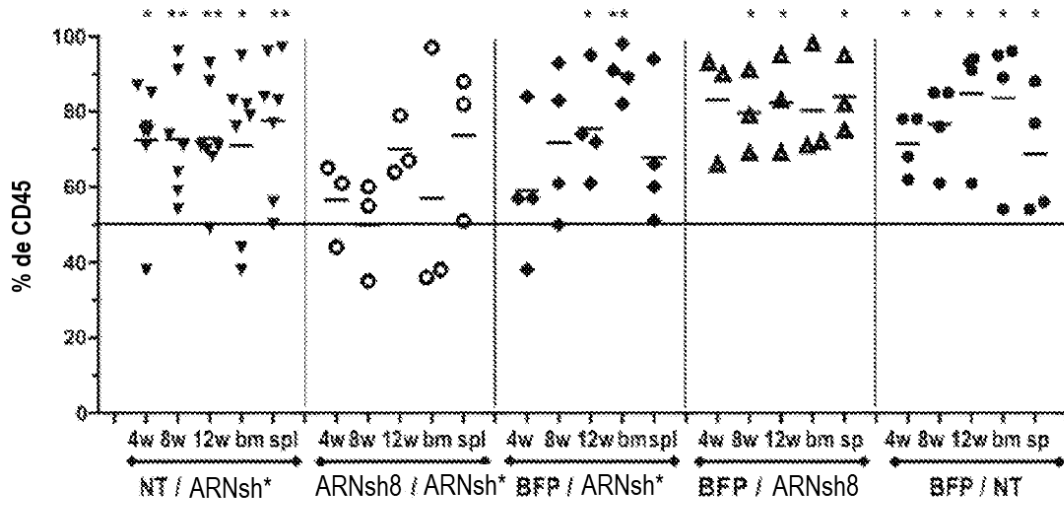


FIG. 23D

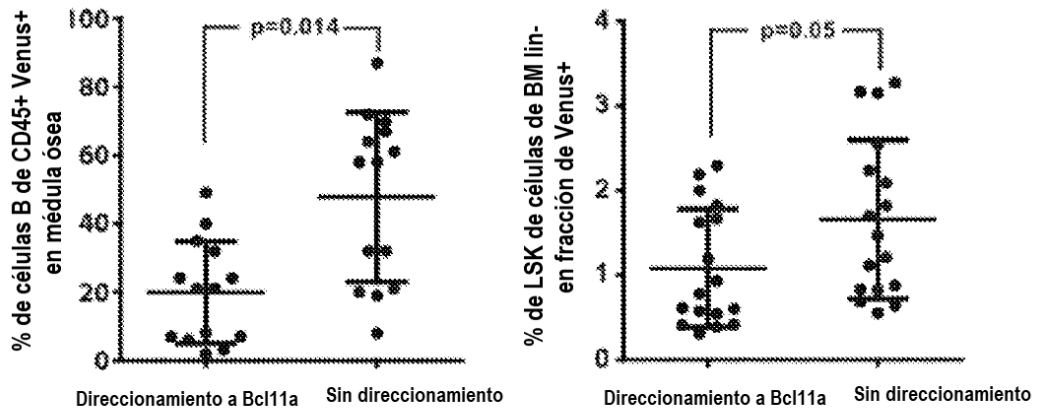


FIG. 23E

ARNsh<sup>miR</sup> de LCR-BCL11A

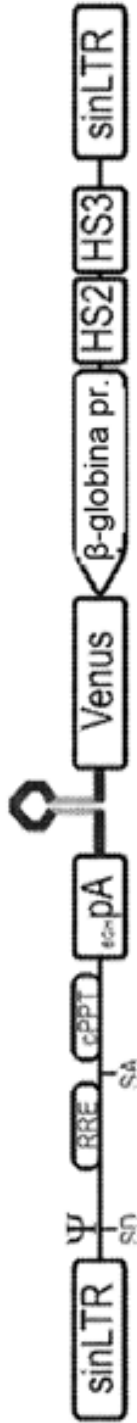


FIG. 23F

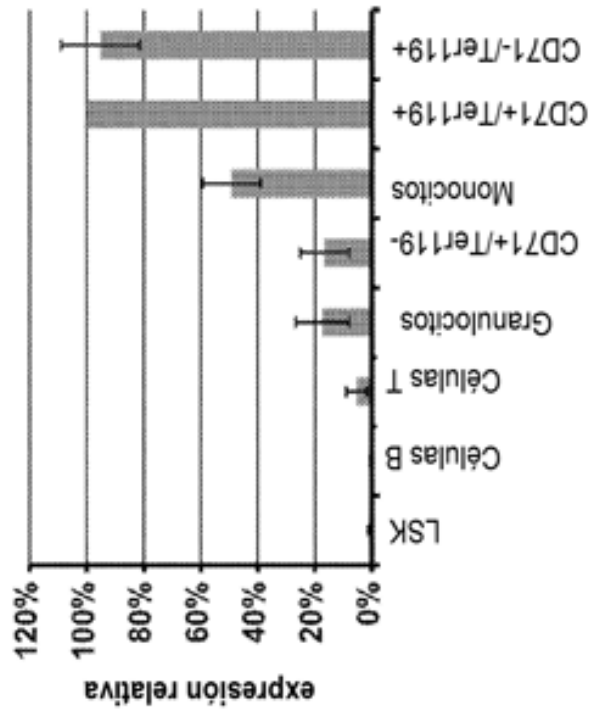


FIG. 23G

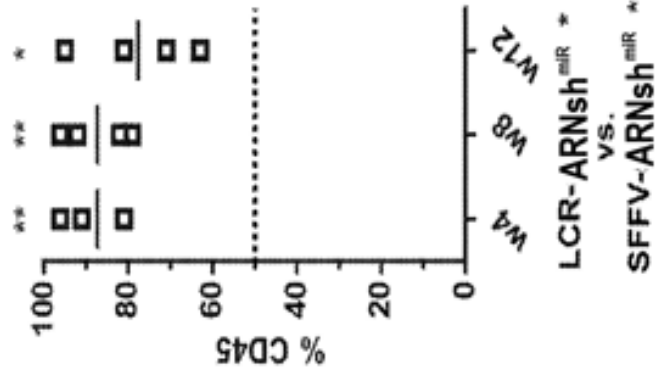


FIG. 23H



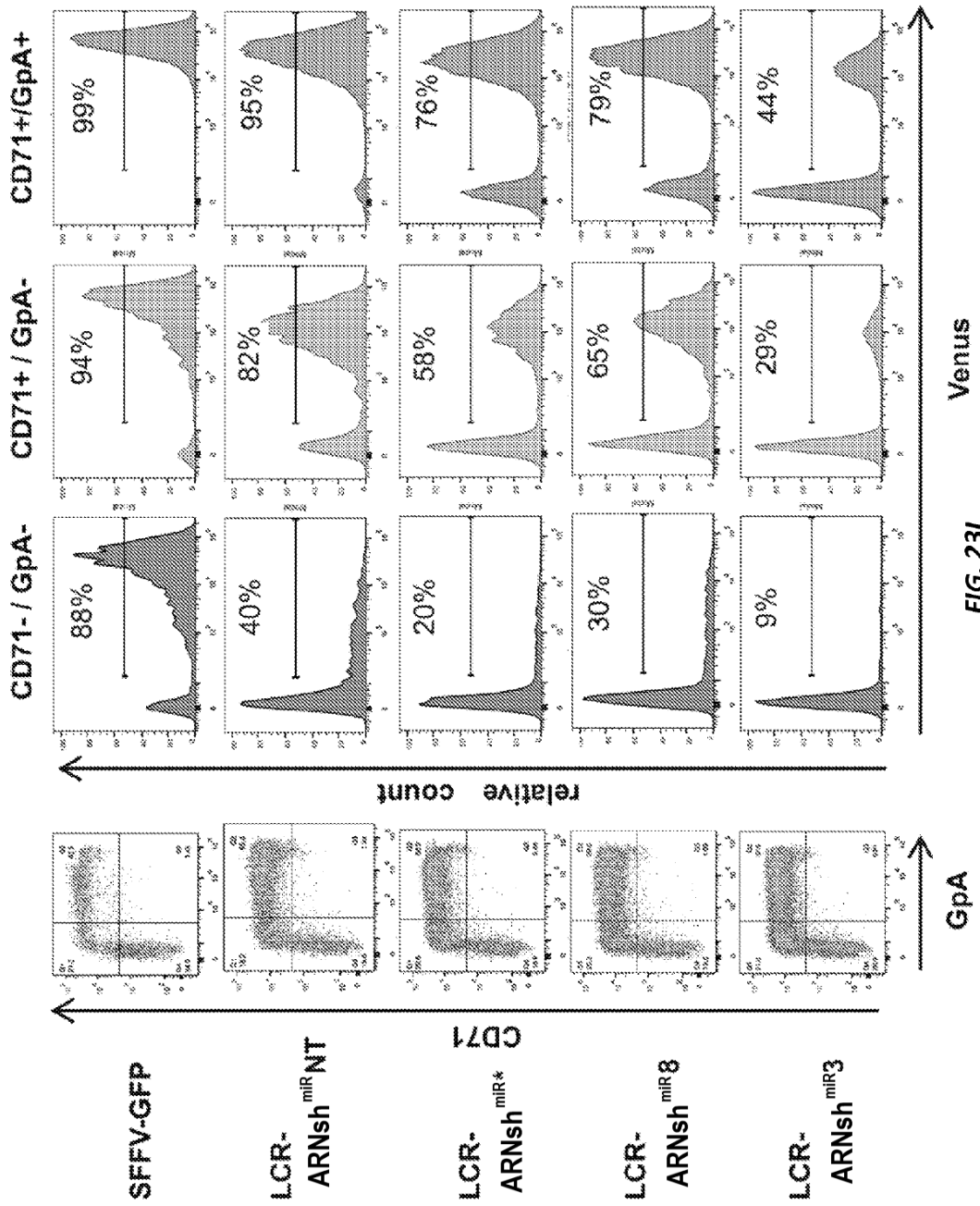


FIG. 23I

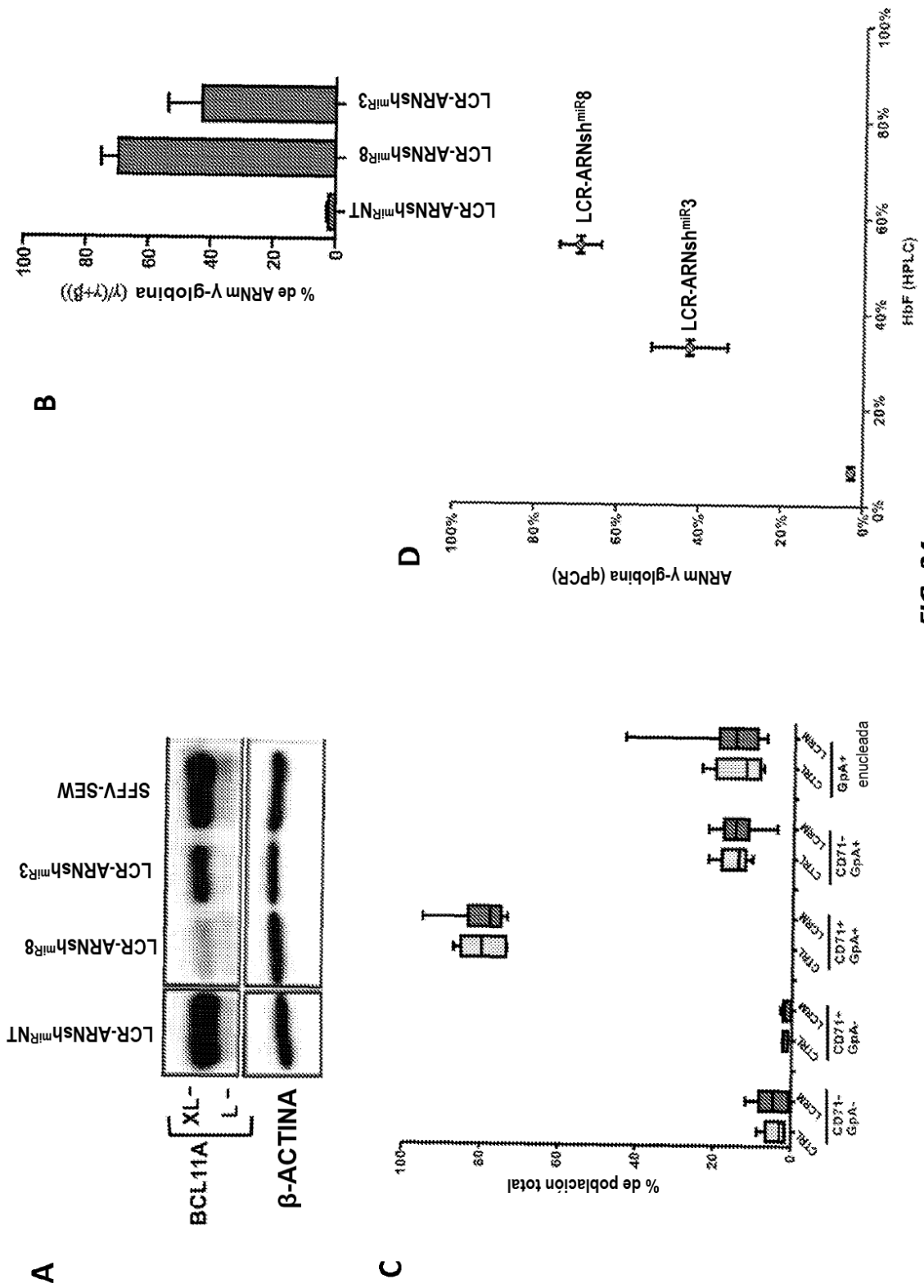


FIG. 24

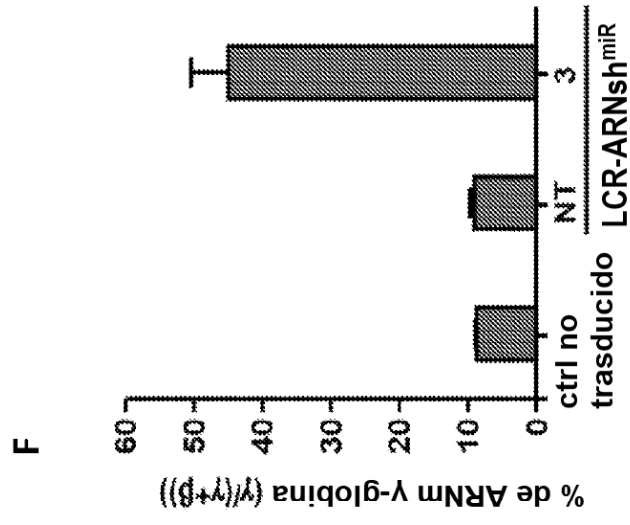
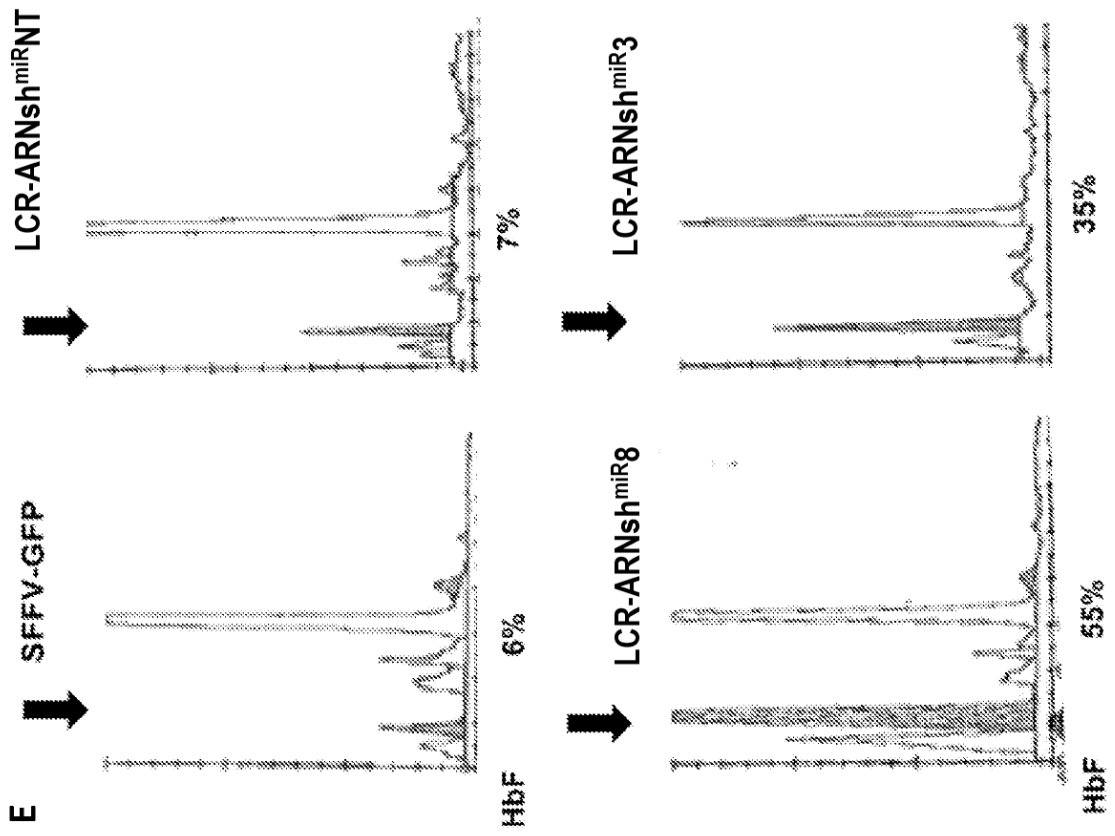
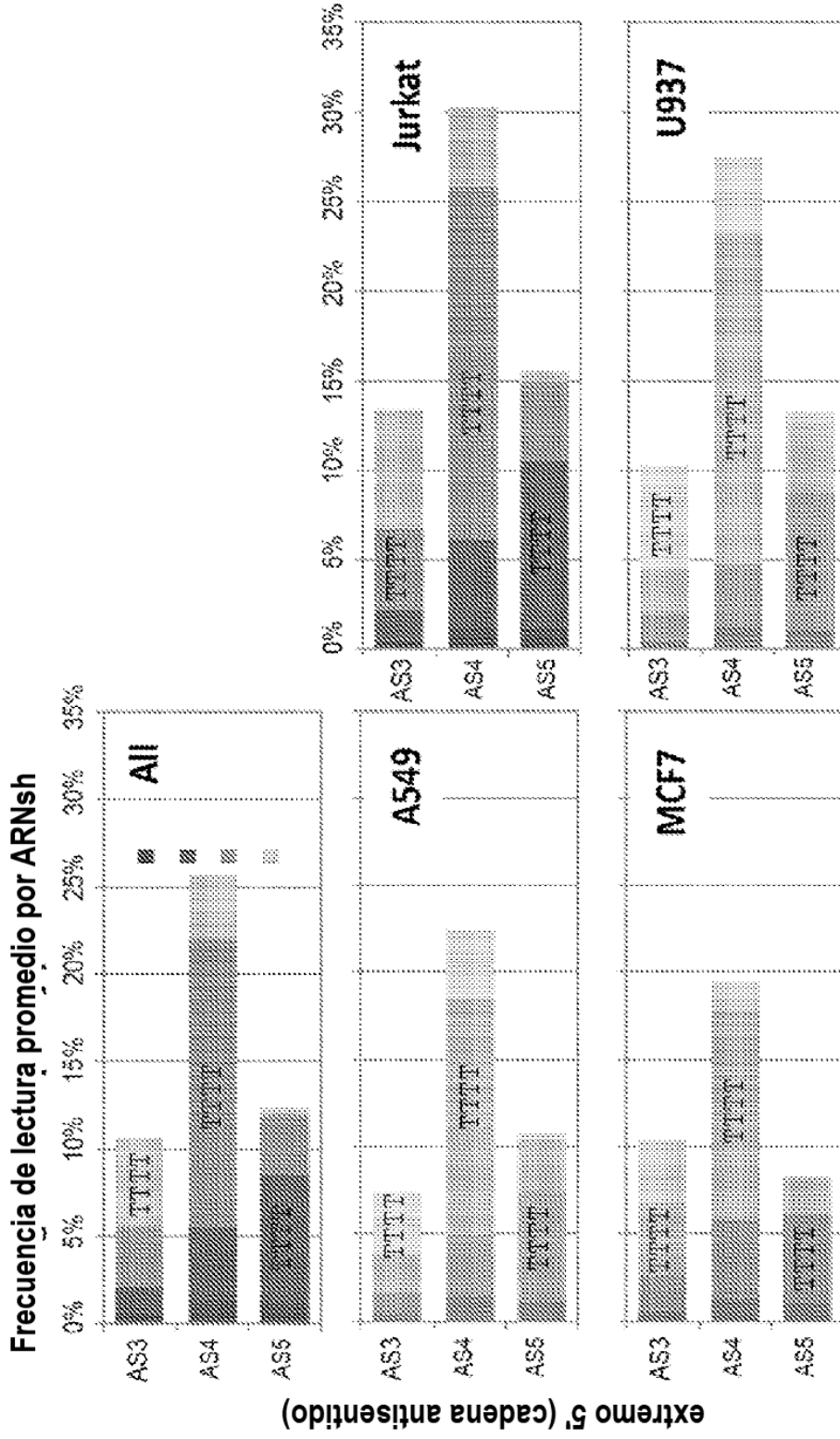


FIG. 24



**FIG. 25**

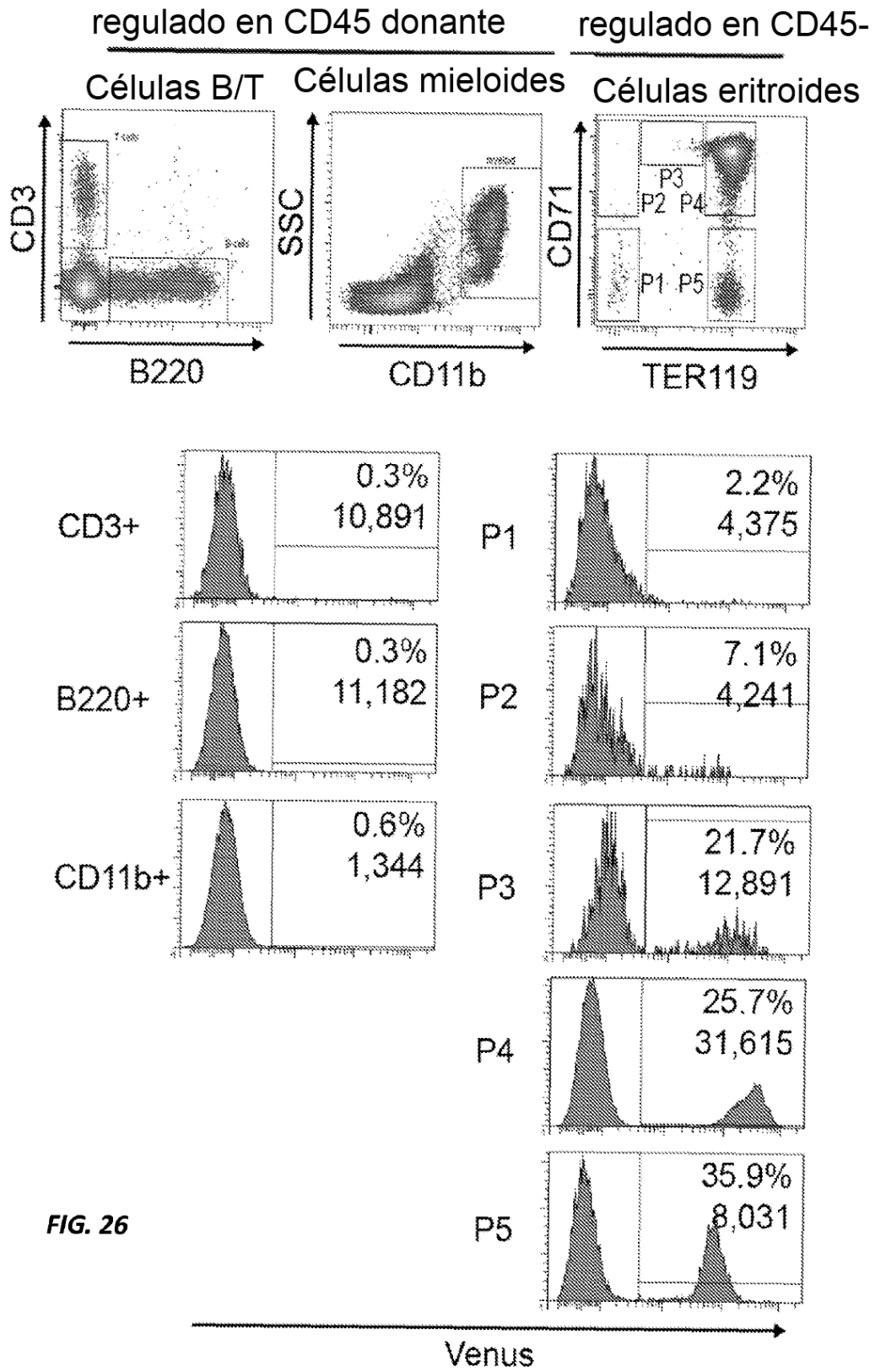


FIG. 26

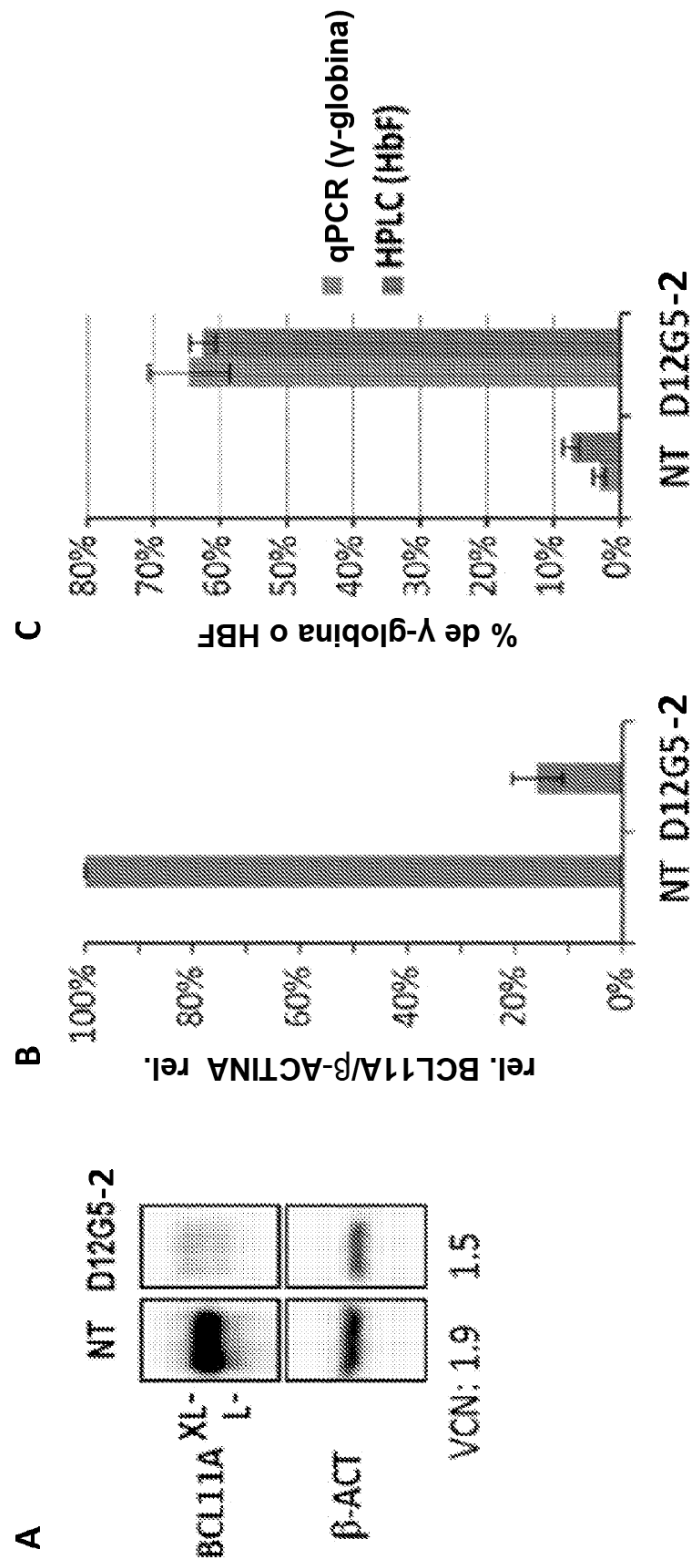


FIG. 27

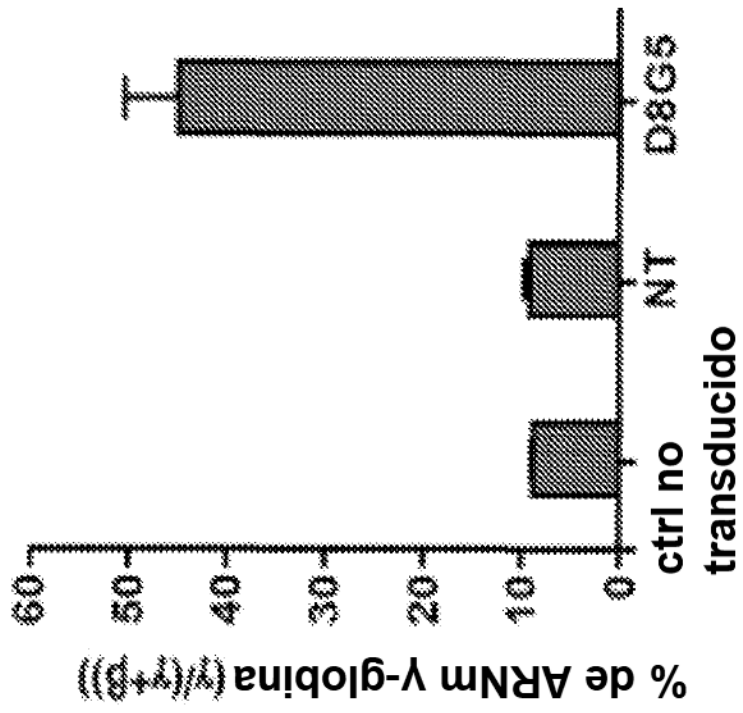


FIG. 28

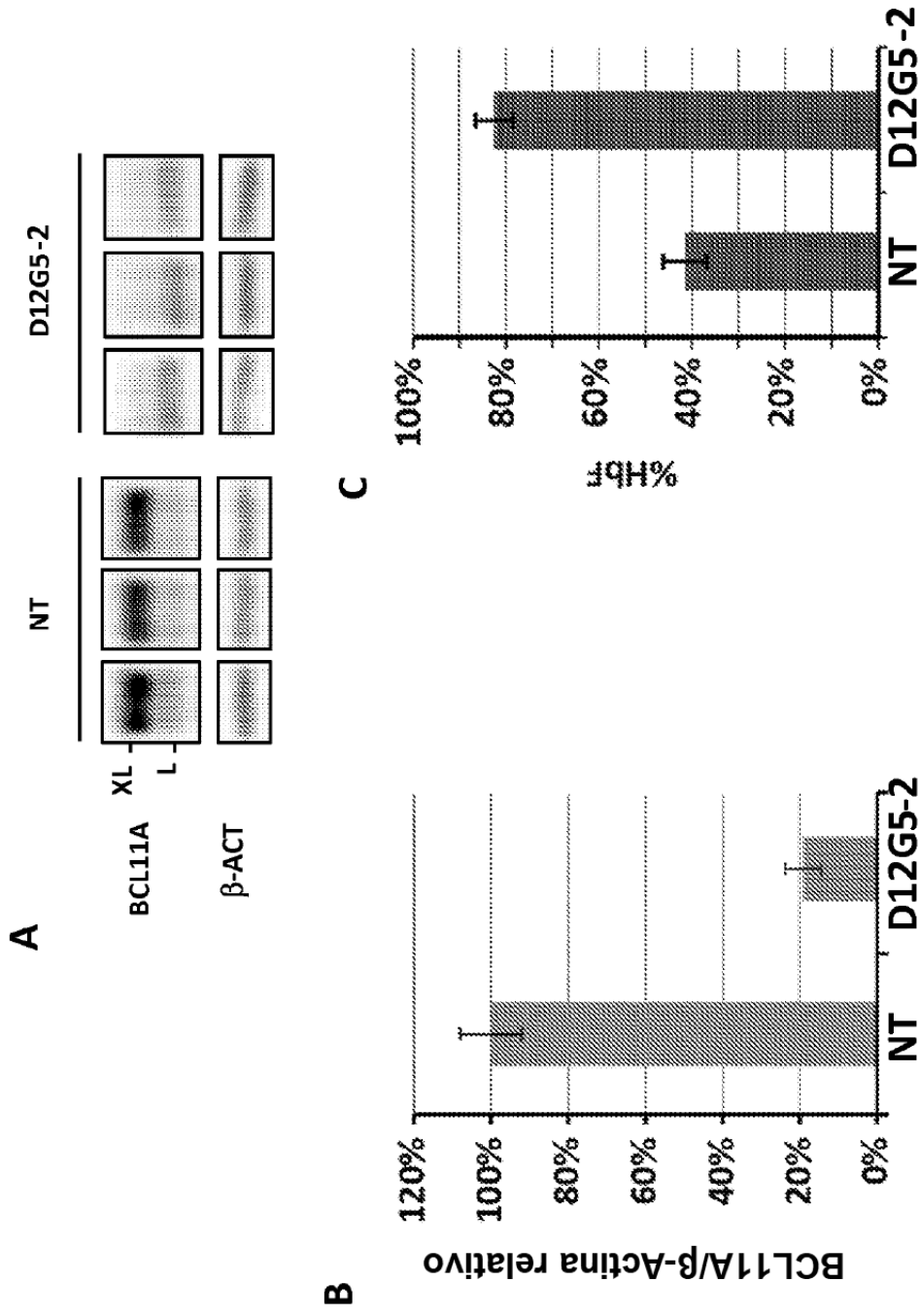


FIG. 29



Anulación de BCL11A con secuencias tanto en los esqueletos de SFFV como de LCR en células eritroides diferenciadas CD34

ARNsh	SECUENCIA	SEQ. ID. NO: 25
Mir1	CGCACAGAACTCATGGATTctccatgtgtagagAAIcCATGAGTGTCTGTGCG	SEQ. ID. NO: 25
E3G5	GCGCTCGGAGACTCCAGACAActccatgtgtagagTTGTCTGGAGTCTCCGAgcgc	SEQ. ID. NO: 35
D8G5	GCGCTTCTTTGCAACACGCActccatgtgtagagTGGGTGTGCAAGAGAagcgc	SEQ. ID. NO: 37
C4G5	GCGCACAGTACCCTGGAGAAActccatgtgtagagTTTCTCCAGGGTACTGTgccc	SEQ. ID. NO: 42
D12G5	GCGGATCGAGTGTGAATAActccatgtgtagagTTATTC AACACTCGATCgccc	SEQ. ID. NO: 39
D12	GATCGAGTGTGAATAATGATctccatgtgtagagATCATATTCAACACTCGATC	SEQ. ID. NO: 30
A5	CAGTACCCTGGAGAAACACAActccatgtgtagagATGTGTTCTCCAGGGTACTG	SEQ. ID. NO: 31
NT	CAACAAGATGAAGAGCACCAActccatgtgtagagTTGGTGTCTTCATCTTGTG	SEQ. ID. NO: 45

FIG. 30

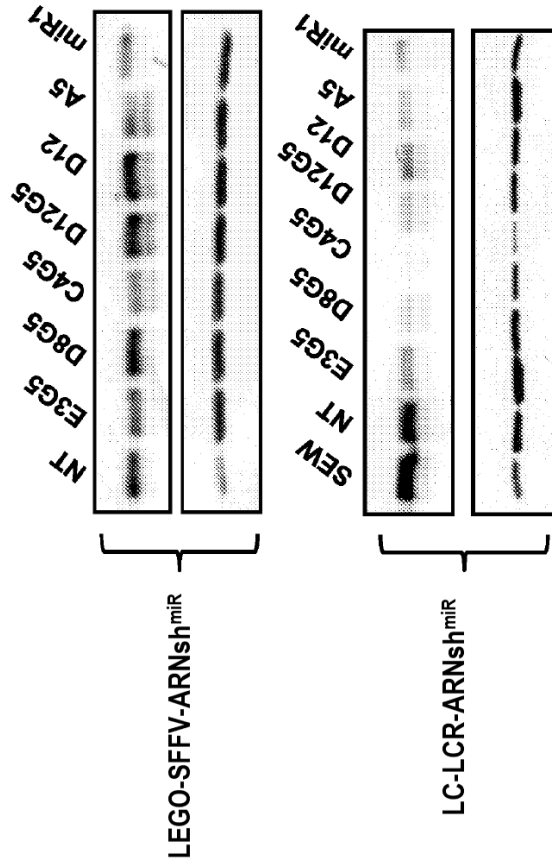


FIG. 31