

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 817**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2015 PCT/US2015/013960**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15117027**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2015 E 15744021 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3099334**

54 Título: **Una hemoglobina fetal mejorada para la corrección génica de la anemia falciforme**

30 Prioridad:

30.01.2014 US 201461933788 P

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

11.03.2020

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER
(100.0%)
3333 Burnet Avenue, MI 7032
Cincinnati, OH 45229-3039, US**

72 Inventor/es:

MALIK, PUNAM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 747 817 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

Una hemoglobina fetal mejorada para la corrección génica de la anemia falciforme

Campo de la invención

5 La invención descrita en el presente documento generalmente se refiere a métodos para determinar el quimerismo mínimo de células madre hematopoyéticas (HSC) y la dosis de genes para la corrección de una enfermedad hematopoyética; en particular, en un modelo *in vivo*. La invención también se refiere a vectores de expresión lentivirales SIN modificados para aumentar un título viral y a varios métodos para aumentar tales títulos, así como a vectores de expresión capaces de mejorar dichos títulos. La invención también se refiere a secuencias de aisladores funcionales derivadas del aislador de cromatina CHS4 para ayudar a aumentar la seguridad de los vectores de integración y aumentar la expresión. La invención también se refiere a métodos para la corrección génica de enfermedades o para reducir los síntomas de las mismas, tales como anemia falciforme y β -talasemia. La invención se refiere además a varios vectores de expresión capaces de corregir genéticamente la anemia falciforme o la β -talasemia, o reducir los síntomas de las mismas.

Antecedentes

15 Corrección génica y diseño vectorial

La corrección génica exitosa de enfermedades, mediada por células madre hematopoyéticas (HSCs), depende de la expresión génica estable, segura y dirigida de cantidades terapéuticas. Los vectores de expresión son fundamentales para el proceso de corrección génica y, en consecuencia, el tema de una investigación considerable. Aunque los avances significativos en el diseño vectorial han mejorado la eficacia de la terapia génica, ciertos obstáculos clave han surgido como barreras para una aplicación clínica exitosa. Entre esos obstáculos, la genotoxicidad del vector está entre las más formidables, como lo demuestra la aparición de terapia génica relacionada con leucemia en pacientes en ensayos de X-SCID, como se describe en este documento. Como resultado, los vectores gamma-retrovirales y los vectores lentivirales se han modificado a un diseño auto-inactivador (SIN) para eliminar los potenciadores ubicuamente activos en la región U3 de las repeticiones terminales largas (LTR) (como se describe el presente documento). El diseño SIN se ha mejorado para aumentar los títulos de los vectores. Posteriormente se han empleado varios métodos para mejorar la expresión transgénica.

Como una medida adicional de expresión de estabilización, muchos vectores ahora están diseñados con elementos aislantes de cromatina que reducen los efectos de posición de la cromatina. Si bien estos aisladores pueden mejorar los perfiles de seguridad y expresión de ciertos vectores, en algunos casos un efecto secundario indeseable es la disminución de los títulos en comparación con las versiones no aisladas. Los aisladores personalizados se han diseñado para proporcionar un aislamiento óptimo sin bajar los títulos.

Así, existe la necesidad en la técnica de un diseño del vector de expresión mejorado, dirigido a estabilizar de forma segura la expresión de transgenes, mientras se mantienen títulos virales clínicamente relevantes.

Determinación de parámetros críticos de corrección en anemia falciforme

35 Expresar una enorme cantidad de hemoglobina fetal/antifalciformación indudablemente corregirá la enfermedad, como se ha demostrado, pero no es prácticamente posible en un entorno clínico. Como ejemplo, se realizó una terapia génica inicial para la deficiencia de adenosina desaminasa (ADA) sin acondicionamiento, y no fue terapéutica, a pesar de que se injertaron unas pocas células madre con genes marcados, y fue evidente una ventaja selectiva para los linfocitos con corrección génica frente a ADA (como se describe en el presente documento). En un ensayo posterior, se usaron 4 mg/kg de busulfán antes del trasplante, como acondicionamiento, lo que dio como resultado una dosis de células madre corregidas genéticamente adecuada y células T modificadas genéticamente (como se describe en el presente documento). Así, existe la necesidad en la técnica de establecer métodos para determinar los umbrales para la corrección génica antes de embarcarse en estudios clínicos.

Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere a un gen de gammaglobina humana mutado que codifica una proteína que incluye la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el gen de la gammaglobina humana mutado puede tener una identidad de secuencia del 70% o mayor que la SEQ ID NO: 2.

En el presente documento se describen métodos para usar un gen de gammaglobina humana mutado que codifica una proteína que incluye la SEQ ID NO: 1 para corregir genéticamente la anemia falciforme o la β -talasemia o reducir los síntomas de la misma, incluyendo el método identificar a un sujeto que necesita tratamiento para anemia falciforme o β -talasemia; transfectar células madre hematopoyéticas autólogas (HSCs) con un lentivirus modificado que incluye el gen de gammaglobina humana mutada que codifica una proteína que incluye la SEQ ID NO: 1; y trasplantar las HSC transfectadas al sujeto.

En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano. En algunas realizaciones, el sujeto se trata con

acondicionamiento de intensidad reducida antes del trasplante.

5 En algunas realizaciones, el lentivirus modificado incluye además una secuencia señal de poliA heteróloga inversa de una secuencia viral 3' LTR en una cadena principal de vector lentiviral SIN estándar; y una o más secuencias USE derivadas de una señal de poliA tardía de SV40 en una región de delección de U3 de una cadena principal de vector lentiviral SIN estándar. En algunas realizaciones, el lentivirus modificado incluye además una o más secuencias de aisladores funcionales de longitud reducida derivadas de CHS4 flanqueantes. En algunas realizaciones, el lentivirus modificado incluye además una región de control de locus de beta-globina. En algunas realizaciones, el lentivirus modificado incluye además un elemento potenciador específico del linaje eritroide.

10 En algunas realizaciones, la hemoglobina fetal posterior al trasplante supera al menos el 20%; las células F pueden ser al menos 2/3 de los glóbulos rojos circulantes; la hemoglobina fetal por células F puede ser de al menos 1/3 de la hemoglobina total en los glóbulos rojos falciformes; y al menos un 20% de HSCs modificadas genéticamente pueden repoblar la médula ósea del sujeto.

15 Las realizaciones de la invención también abarcan vectores de expresión lentivirales capaces de corregir genéticamente la anemia falciforme o la β -talasemia o reducir los síntomas de la misma, incluyen un gen de gamma-globina humana mutado que codifica una proteína en la SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, el vector de expresión lentiviral incluye además una secuencia señal de poliA heteróloga inversa de una secuencia viral LTR 3' en una cadena principal de vector lentiviral SIN estándar; y una o más secuencias USE derivadas de una señal de poliA tardía de SV40 en una región de delección de U3 de una cadena principal de vector lentiviral SIN estándar. En algunas realizaciones, el vector de expresión lentiviral incluye además una o más secuencias de aisladores funcionales de longitud reducida derivadas de CHS4 flanqueantes. En algunas realizaciones, el vector de expresión lentiviral incluye además uno o más elementos de una región de control de locus de beta-globina clonada en orientación inversa a una unidad transcripcional viral. En algunas realizaciones, el vector de expresión lentiviral incluye además un elemento potenciador específico de linaje eritroide.

Breve descripción de las figuras

25 Los expertos en la materia entenderán que los dibujos, descritos a continuación, son solo para fines ilustrativos. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

30 La Figura 1 representa títulos del estándar y LV-SIN destripado (a) Una representación esquemática de los lentivirus SIN. sSIN-GFP, sBG-6 y sFIG son LV-SIN portadores de GFP, el gen de la β -globina (BG) o el ADNLV-SINc de Fanconi Anemia A, -IRES- GFP respectivamente. dsSIN-GFP, sBG-1 y ds-FIG son sus contrapartes destripadas. SD = sitio donante de empalme. SA = sitio aceptor de empalme. secuencia de empaquetado Ψ . cPPT: tracto central de polipurina. Se indican el gag (360 bp) y el fragmento *env* que contiene el RRE (~ 850 bp). (b) El virus obtenido después de la infección de células MEL y el análisis de células que expresan GFP y h β -globina con diferentes iteraciones del diseño "SIN". Los títulos se expresan como UI/ml de sobrenadante concentrado (n=3).

35 La Figura 2 representa las construcciones BG SIN-LV. Una representación esquemática de 10 formas provirales SIN-lentivirales (sBG-1 a sBG-10). Todos los vectores contienen BG (HS2, 3 y 4 elementos de la LCR, el (promotor β y gen) y cPPT. Se muestran fragmentos de Gag (630 bp o 360 bp), RRE, *env*. * indica una mutación puntual que interrumpe la SA.

40 La Figura 3 representa los títulos virales de BG LV-SIN (a) Los sobrenadantes virales de los vectores lentivirales sBG-1 a sBG-10 SIN se concentraron 1400 veces y se titularon en células MEL monitorizando las células positivas de β -globina mediante citometría de flujo (n=4). (b) Aumento de veces con inclusión de elementos-*cis*. Los títulos se normalizaron al del vector completamente destripado (sBG-1), que se consideró 1. El diseño sBG-6 mostró un aumento marcado en los títulos.

45 La Figura 4 representa el efecto de los elementos-*cis* del LV sobre la estabilidad y expresión del provirus. (a) Integridad proviral: análisis de transferencia Southern de células MEL transducidas con sBG-127 a sBG-10, restringidas con AflIII que corta las LTR virales y sondeadas con un fragmento de h β -globina. Todos los vectores SIN se transmiten de manera estable. (b) Expresión de h β -globina en células MEL: análisis de diagrama de puntos de células MEL transducidas con sBG-1 a sBG-10 de un experimento representativo; Las IMF se indican en la esquina superior derecha del diagrama de puntos.

50 La Figura 5 representa las transcripciones de ARNv en las células de empaquetamiento. Análisis de transferencia Northern de (A) ARN total de células de empaquetamiento 293T transfectadas con plásmidos SIN LV y sondadas con un fragmento de h β -globina marcado con ³²P. El panel inferior muestra el mismo punto hibridado con una sonda 18S como control de carga. Una banda de longitud completa del tamaño esperado es visible para todos los vectores. * indica vectores en los que SA está presente y son visibles tanto la longitud completa como las bandas empalmadas. Un pequeño esquema de las secuencias-*cis* del vector se muestra arriba de los carriles del vector para representar la secuencia de empaquetamiento Ψ ; R: RRE; SA: sitio aceptor de empalme en el fragmento *env*; SG: fragmento corto gag (360 bp); LG: fragmento largo gag (630 bp) en vectores. (B) ARN citoplasmático para vectores con y sin RRE del mismo experimento mostrado en el panel A, que muestra la eficacia de la exportación de ARNv al citoplasma. Las relaciones citoplasmático/total cuantificadas con fosfoimager se muestran en la Figura 6E.

La Figura 6 representa el empaquetamiento de ARNv en viriones (a) Un análisis de transferencia de puntos representativo en ARNv extraído de la serie sBG de sobrenadantes de virus que muestra que la cantidad de ARNv es proporcional a los títulos infecciosos. El virus se realizó a partir de los diez vectores y se concentró de forma idéntica como se describe, y la transferencia de puntos se sondeó con un fragmento de β -globina. NC = control negativo. Cuatro diluciones diferentes para cada vector se cargaron por duplicado en el experimento representativo mostrado. Se realizaron un total de tres experimentos (B) recuentos de fosfoimager obtenidos en la transferencia de 28 puntos que se muestra en el panel (A). (C) Cuantificación relativa de ARNv de los tres experimentos. (D) actividad de p24 en virus concentrado de todos los vectores (n=2). (E) Relación de ARN citoplasmático/total a partir de 2 análisis de transferencia Northern (NB) en células de empaquetamiento (la relación de ARN citoplasmático/total se normalizó al valor para el vector completamente destripado que carece de RRE (SBG-1) y de ARN 18S (para cargar) en dos experimentos independientes. Los vectores análogos con y sin RRE se marcan como I, II y III para permitir comparaciones fáciles).

La figura 7 representa construcciones de vectores y diseño experimental. A. El vector lentiviral auto-inactivador (SIN) que porta el gen $h\beta$ -globina y los HS2, HS3 y HS4 de la región de control de locus se muestra como sBG. Usando esta cadena principal, se generaron una serie de vectores para incorporar el núcleo de cHS4 59 250 bp, 2 repeticiones en tándem del núcleo, 5' 400 bp o 59800 bp de cHS4, y el aislador cHS4 de 1,2 Kb de longitud completa. Los vectores sBG400S y sBG800S además de los espaciadores de ADN inerte central portan 1 bacteriófago. B. Esquema de análisis in vitro e in vivo: las células MEL se transdujeron con varios vectores para obtener clones MEL de copia única y la expresión de $h\beta$ -globina y el análisis de ChIP se realizó en clones diferenciados. El análisis in vivo se realizó usando células LSK donantes $Hbb^{th3/+}$ transducidas con vector trasplantadas en receptores $Hbb^{th3/+}$ irradiados letalmente y analizados a los 6 meses después del trasplante. Los trasplantes secundarios se realizaron para el análisis de CFU-S. C. Gráfica de FACS representativa que muestra células que expresan $h\beta$ -globina (% $h\beta+$) para clon MEL de copia única no aislada (sBG, verde) y aislada (sBG-I, rosa) con coeficiente de variación (CV) de expresión mostrada por flechas.

La Figura 8 representa células que expresan β -globina humana en clones MEL. A. Proporción de células que expresan $h\beta$ -globina (% $h\beta+$) en clones MEL. Cada círculo representa una copia única individual del clon MEL. B. Valores CV de la expresión de $h\beta$ -globina de cada clon. Las medias se representan con una línea horizontal y la media \pm 6 SEM de % de células MEL $h\beta+$ y el CV de la expresión de $h\beta$ -globina para cada vector se indican en el cuadro anterior. Los círculos rellenos representan clones representativos seleccionados para el análisis de ChIP. * $P < 0,05$ por ANOVA, en comparación con sBG.

La Figura 9 representa la expresión de β -globina humana en RBCs y una copia única de CFU-S secundaria. A. Se muestran histogramas FACS representativos (% $h\beta +$ RBC se indican dentro del histograma). B. Datos acumulativos sobre el porcentaje de $h\beta +$ RBCs normalizados a la copia de vector. C. El coeficiente de variación (CV) de la expresión de hp en RBCs. D. Datos acumulativos sobre % de células $h\beta+/CFU-S$. Cada círculo representa un único integrante individual CFU-S. E. El CV de la expresión de $h\beta$ en el CFU-S individual. Los números sobre los diagramas de barras representan la media \pm 6 SEM y los valores significativamente diferentes de los controles de ANOVA están marcados con un asterisco. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

La Figura 10 representa el análisis de ChIP que muestra las histonas marcadas activas y represivas en el núcleo 5' 250 bp cHS4 y el promotor hp en clones de células MEL. A. Mapa de la forma proviral del vector. Las flechas muestran la posición de los pares de cebadores utilizados para PCR y qPCR; y las líneas representan fragmentos de aisladores. B-C. Los ChIP con anticuerpos contra el control IgG, acH3, acH4, H3K4-me2, H3K9-me3 y H3K27-me3 y cebadores de PCR semicuantitativos para la región promotora de β -globina D-F ChIP con anticuerpos contra Ach3 y Ach4 (D), H3K4-me2 (E); H3K9-me3 y H3K27-me3 (F) seguido de qPCR usando cebadores que amplifican el núcleo de cHS4 (paneles izquierdos) y el promotor de $h\beta$ -globina (panel derecho) en clones agrupados (mostrados en la Figura 2A). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

La Figura 11 representa la expresión de β -globina humana en ratones. A. Parámetros de RBC, reticulocitos y copias de vectores. Los valores representan medias \pm SEM. Hb = hemoglobina, MCV = volumen corpuscular medio, MCHC = concentración de hemoglobina corpuscular media, copia de vector = copias de vectores en leucocitos mediante qPCR. B. Análisis mediante HPLC de la proteína β -globina humana en los lisados de la sangre como porcentaje de la hemoglobina total [$h\beta$ -ma/($h\beta$ -ma + $m\beta$ -ma)]. Los datos se normalizan a copia de vector/célula en leucocitos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

La Figura 12 representa el efecto de la región de 3'400 bp del aislador cHS4. A. Diseño vectorial del vector sBG³⁴⁰⁰. El cHS4 de longitud completa se muestra para comparación. B-C. Proporción de células $h\beta+$ (B) y el coeficiente de variación de la expresión de hp de sBG³⁴⁰⁰ (C) en clones MEL. Cada círculo representa un único clon MEL integrante. Las medias se representan con una línea horizontal y la media \pm SEM se representa en la figura. D-E. El porcentaje de $h\beta$ -globina + RBC (D) y el CV de la expresión de hp (E) en ratones. F-G. células (F) que expresan $h\beta$ -globina y el CV de la expresión de hb (G) en una sola copia CFU-S seguido del trasplante secundario. Cada círculo representa CFU-S individual. Se muestran los valores medios \pm SEM y P-. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

La Figura 13 representa el efecto de la combinación del núcleo 5' con las regiones 3' 400 bp del aislador cHS4. A. Diseño vectorial de sBG⁶⁵⁰. El cHS4 de longitud completa se muestra para comparación. B. Proporción de células $h\beta+$

y C. CV de la expresión de hb-globina en clones MEL sBG⁶⁵⁰. Cada círculo representa una copia única del clon MEL. Las medias se representan con una línea horizontal y la media + SEM se indica sobre cada grupo. D. Porcentaje de RBC que expresan hbglobina en ratones trasplantados. E. Porcentaje de células que expresan hβ-globina en una sola copia CFU-S de ratones secundarios. F- G. Cromatina ChIP activa y represiva seguida por PCR semicuantitativa (F) o qPCR (G) de la región central de cHS4 o la región promotora de hβ-globina.

La Figura 14 representa patrones de cromatina sobre los 3'400 bp y su interacción con la región central de 5'. A. Un mapa de LTR 3' que muestra la ubicación del aislador de 1,2 kb de longitud completa y la posición de los cebadores usados en el análisis de ChIP. Los vectores probados con las regiones centrales indicadas se representan debajo del mapa B ChIP con anticuerpos contra Ach3 y Ach4, H3K4-me2 y H3K9-me3 y H3K27-me3 seguido de una PCR semicuantitativa de la región 3'400 en los provirus en sBG³⁴⁰⁰, sBG⁶⁵⁰, sBG-I. C-D ChIP con anticuerpos contra USF-1 y CTCF seguido de PCR semicuantitativa (C) o qPCR (D) para la región central. E-F ChIP con anticuerpos contra USF-1 y CTCF seguido de PCR semicuantitativa (C) o qPCR (D) para la región de 3/400 bp de los provirus sBGC, sBG³⁴⁰⁰, sBG⁶⁵⁰ y sBG-I en grupos de tres clones MEL de copia única. (G) Figura S1 Histogramas representativos (FACS) que muestran células que expresan hb en CFU-S de copia única control, sBG, sBGC, sBG2C, sBG400 y sBGI. El % de células hβ+ se indica dentro del histograma. (H) Expresión de ARN mensajero (ARNm) de β-globina humana en CFU-S secundaria única copia de sBG, sBGC, sBG2C, sBG400 y sBG-I mediante qPCR. La expresión de α-globina murina sirvió como control interno contra el cual se normalizó la expresión de hβ-globina. Los valores de P se muestran en la figura. ** indica P<0,01. (I) Se muestran los cebadores y sondas utilizados en la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). 'F' representa cebador directo y 'R' representa cebador inverso. (J) Análisis de sitio de inserción en clones MEL de copia única de sBG no aislado y vector sBG-I aislado con aciertos génicos según <http://genome.ucsc.edu>.

La figura 15 representa títulos virales de vectores lentivirales con insertos en el LTR 3' que eran inversamente proporcionales a la longitud del inserto LTR. (A) Representación esquemática de los vectores lentivirales. Todos los vectores se basaron en sBG, un vector lentiviral SIN que porta el gen de la β-globina, el promotor de la β-globina y los elementos de control de la región de control del locus HS2, HS3 y HS4. Se insertaron diferentes fragmentos del sitio cHS4 en la región U3 del sBG de LTR 3' (que se muestra arriba del vector sBG). Se hicieron insertos de tamaño similar reemplazando la región inversa del núcleo de cHS4 con espaciadores de ADN inerte del ADN del fago lambda (que se muestra debajo del vector sBG). (B) Los títulos virales de los vectores aislados disminuyeron a medida que aumentó la longitud del inserto del aislador. Los títulos reflejan el virus concentrado creado simultáneamente para todos los vectores en cada experimento (n=4). Todos los títulos fueron significativamente más bajos que los títulos del vector de control sBG (p<0,01; ANOVA de 1 vía). (C) Los títulos cayeron con la inserción de una longitud creciente de un espaciador de ADN inerte inversa del núcleo. Los títulos de los vectores lentivirus aislados (barras sombreadas) son similares a los que contienen espaciadores de ADN inertes en la LTR (barra abierta) en cuatro experimentos independientes. Los títulos de sBG con un espaciador de 400bp fueron ligeramente superiores (* p<0,05). (D) El vector sBG^{2C}, que porta repeticiones en tándem del núcleo de cHS4 recombinado con alta frecuencia. Se muestra una representación esquemática de los vectores provirales sBG-I y sBG^{2C}, cuando están intactos o cuando los elementos centrales se recombinan con la pérdida de uno o dos núcleos con la región sondeada y el sitio de restricción de la enzima usada (AflII). El tamaño de la banda esperada se muestra adyacente a cada dibujo vectorial. El panel derecho es el análisis de transferencia Southern que muestra una única banda esperada de 8Kb para la población de células MEL transducidas con sBG-I, y dos bandas en la población de células MEL transducidas con sBG^{2C}, que representan sBG^{2C} con pérdida de uno o ambos núcleos.

La Figura 16 representa cantidades similares de ARN viral que se produjeron a partir de los vectores aislados y no aislados en células de empaquetamiento. El análisis de transferencia Northern en las células de empaquetamiento 293T después de la transfección con vectores sBG y sBG-I mostró la longitud esperada de ARN viral. La membrana se hibridó con una sonda de p-globina marcada con ³²P (panel superior) y 18S (panel inferior) como control de carga. Una banda esperada de 7,3Kb y 8,5Kb corresponde a sBG y se detectó ARN viral de sBG-I. El ARNr 18S y 28S se sondeó de forma no específica con esta sonda. No se detectaron bandas recombinantes extrañas con ninguno de los dos vectores. Las relaciones cuantificadas de fosfoimager de ARN viral y ARNr 18S de ambos vectores se enumeran debajo de los carriles y no muestran diferencias en la cantidad de ARN-v entre los dos vectores.

La Figura 17 representa que la producción de virus no se vio afectada por la inserción de cHS4 en la actividad de transcriptasa inversa de LTR 3' (A) en sBG y sobrenadantes virales sBG-I es similar (23 ± 5 vs. 27 ± 3 ; $n=3$, $p>0,5$). (B) los niveles de p24 detectados en la preparación viral concentrada son los mismos con sBG y sBG-I. ($2,9 \pm 0,5 \times 10^5$ versus $1,7 \pm 0,5 \times 10^5$; $n=3$, $p>0,1$) (C) El análisis de transferencia por puntos de ARN viral extraído del sobrenadante viral de sBG y sBG-I muestra cantidades similares de ARN viral empaquetado en viriones en ambos vectores. Tenga en cuenta que 4 diluciones diferentes de ARN viral se cargaron por duplicado para los dos vectores. La membrana se hibridó con una sonda de p-globina marcada con ³²P. Solo se muestra uno de los dos experimentos representativos. (D) Se cuantificó la cuantificación de fosfoimager de dos experimentos independientes y mostró cantidades similares de ARN viral en los viriones sBG y sBG-I ($1,9 \pm 0,7 \times 10^6$ vs. $1,9 \pm 0,6 \times 10^6$ $n=2$, $p>0,5$).

La Figura 18 representa la cinética de la transcripción inversa y la translocación nuclear en el elemento del aislador portador del vector lentivirus en el LTR. En el panel (A) se ilustra un esquema del proceso de transcripción inversa y translocación nuclear de lentivirus. A la derecha, un resumen de los ensayos de q-PCR realizados para analizar varias etapas del proceso. Línea delgada: ARN; línea gruesa: ADN. Cuadrados abiertos: tracto de polipurina (PPT). Círculo abierto: sitio de unión de cebado (BPS). El inserto de ADN LTR 3' se ilustra en el primer diagrama de transferencia de

cadena. Se muestran las posiciones de los ensayos de q-PCR. El ADN de las células MEL después de la infección con el virus sBG y sBG-I se recogió en diferentes momentos después de la infección y se analizó mediante qPCR. Línea continua: sBG. Línea discontinua: sBG-I. (B) La cinética de la transcripción inversa antes de la primera transferencia de cadena (R/U5) no muestra diferencia entre los dos virus. (C-D) Después de la transferencia de la primera cadena (U3/R y Psi) hay una disminución en la eficacia de la transcripción inversa en presencia del aislador. (n=3)

La Figura 19 representa la inserción de cHS4 en la integración viral afectada LTR. El ADNc viral lineal se circulariza y es la forma que integra; los círculos 1-LTR y 2-LTR representan productos de integración abortiva de recombinación homóloga y unión final no homóloga, respectivamente. Por lo tanto, los círculos 1 y 2-LTR se usan como marcadores de translocación nuclear. (A) Hay círculos reducidos de 2-LTR, analizados mediante qPCR en el ADN extraído de células MEL infectadas en diferentes momentos después de la infección con virus, lo que sugiere una translocación nuclear reducida o una unión final no homóloga. (B) Análisis de transferencia Southern de células MEL 72 h después de la infección con la misma cantidad de virus sBG y sBG-I. La digestión de *Stu* del ADN genómico permite la identificación de círculos 1-LTR, círculos 2-LTR, ADN lineal y ADN integrado (un frotis) para sBG y sBG-I. Los tamaños de banda esperados se muestran para ambos vectores. Mientras que los círculos y 1-LTR y 2 lineales se ven en el carril sBG, no se detectan ADN lineales o círculos 2-LTR en el carril de sBG-I. Sin embargo, los círculos 1-LTR son casi tan prominentes como en el carril de sBG. Las relaciones relativas de los círculos lineales, 1-LTR y 2 sugieren un aumento de los productos de integración abortiva recombinada con el vector sBG-I y, por lo tanto, dan como resultado una integración ineficaz. (C) Las células MEL transducidas con sBG y sBG-I muestran integrantes provirales intactos (7,5Kb y 8,0 Kb respectivamente). Hubo una diferencia de 8 veces en los recuentos de fosfoimager de las dos bandas. El número de copias de vectores por celda también se cuantificó mediante qPCR y se representa debajo de los carriles.

La Figura 20 representa la hipótesis del mecanismo por el cual la secuencia del aislador disminuye el título viral. En el VIH de tipo natural, las moléculas lineales de ADNc se translocan al núcleo donde un pequeño porcentaje se somete a recombinación y ligadura de unión final para formar círculos 1 y 2-LTR, respectivamente. Solo la forma lineal es el precursor inmediato del provirus integrado. En el caso de vectores LV aislados, se muestra un aumento en la formación del círculo 1-LTR, debido a la presencia de una secuencia U3 más larga que podría facilitar un aumento en la recombinación homóloga. Este proceso agota la cantidad de ADN viral disponible para la integración, así como la cantidad de formación del círculo 2-LTR, como se muestra en el presente documento. La disminución de la cantidad de ADN disponible para la integración podría explicar la pérdida de títulos para el vector lentiviral que porta insertos grandes en el LTR. (B) Una adición adicional de un casete interno PGK-MGMT de 1,2Kb al vector BG-I, denominado BGM-I, no redujo más los títulos (C) Un diseño optimizado del vector da como resultado títulos de virus razonables sin pérdida de actividad del aislador. Una secuencia de 650 bp de cHS4, optimizada para la actividad del aislador a través de un análisis de función de estructura. Se descubrió que un vector que contiene este fragmento de 650 bp (sBG650) tenía títulos ~ 2 veces más bajos que el vector sBG no aislado (n=3). (D) La PCR para la presencia de insertos LTR 3' en provirus derivados de clones MEL de copia única muestra una transmisión estable de todos los insertos excepto los presentes como repeticiones en tándem. Las células MEL se clonaron de agrupaciones con transferencia de genes <5%. Se detectaron clones de copia única usando cebadores de β -globina y confirmados por un qPCR usando cebadores que abarcan la región v. La PCR con cebadores que abarcan el núcleo de 250 bp se realizó en los clones de copia única, ya que estas secuencias del núcleo eran comunes a todos los vectores. El inserto cHS4 de 1,2Kb en el vector sBG-I fue confirmado adicionalmente por cebadores de PCR que abarcan el núcleo 5' y el extremo 3' de cHS4. (E) cebadores de PCR.

La Figura 21 representa ratones sG^bG que se sometieron a un trasplante después del acondicionamiento mieloablativo tienen una alta producción de HbF que es estable y estable en ratones primarios y secundarios. Los ratones sG^bG que eran completamente quiméricos para los sRBCs de los donantes se analizaron en diferentes momentos. La proporción de células HbF (A) y F (B) en sangre de ratones individuales, según lo determinado mediante análisis de HPLC de intercambio iónico y análisis FACS, respectivamente, se muestra en diferentes puntos de tiempo después de los trasplantes primarios y secundarios. (C) La cantidad de HbF en sangre directamente correlacionada con la proporción de células F. (D) La cantidad de HbF producida fue directamente proporcional al número de copias del vector en la médula ósea. Cada símbolo representa un ratón (y consistentemente representa el mismo ratón en particular en todos los paneles). (E) Parámetros hematológicos de ratones sG^bG que se sometieron a trasplante después del acondicionamiento mieloablativo. Hb indica hemoglobina; MCV, volumen corpuscular medio; MCH, hemoglobina corpuscular media; RDW, ancho de distribución de glóbulos rojos; Plt, plaquetas; pri, ratones primarios; y sec, ratones secundarios. * Los valores de *P* representan la comparación de ratones control primarios con el grupo sG^bG. Las comparaciones estadísticas de ratones secundarios no se realizaron ya que solo un ratón control secundario estaba vivo en el momento del análisis.

La Figura 22 representa ratones sG^bG que se sometieron a un trasplante después del acondicionamiento mieloablativo, lo que resultó en la corrección de parámetros hematológicos que se correlacionaron con la expresión de HbF. Hubo una reducción sostenida en los reticulocitos (A), y un aumento en los números de hematocrito (B) y RBC (C) con el tiempo. (D) La leucocitosis disminuyó con la normalización de los recuentos de WBC. Los datos mostrados representan los valores medios (\pm SEM) de los ratones sG^bG (n = 5; •) y los ratones que se sometieron a un trasplante control (n = 10; O). Una estrella representa los valores medios en ratones BERK que fueron donantes de HSC para los trasplantes sG^bG y control. (E-G) La disminución de reticulocitos, y el aumento de los números de hematocrito y RBC se correlacionó con la proporción de células F en ratones individuales. (H) Los recuentos de

leucocitos disminuyeron pero se normalizaron cuando las células F excedieron el 60%. Los recuentos de leucocitos, contados con un analizador automático, eran representativos de los leucocitos circulantes, ya que solo se observaron RBCs nucleados ocasionales en frotis periféricos. Cada punto/símbolo de datos en los paneles E-H representa un ratón sG^bG y los símbolos para ratones individuales se han mantenido consistentes, para rastrear ratones individuales.

5 Una estrella representa los valores medios en ratones BERK que fueron donantes de HSC para los trasplantes sG^bG y control. La Figura 23 representa ratones sG^bG que se sometieron a un trasplante después del acondicionamiento mieloablativo, lo que resultó en la corrección de los parámetros funcionales de RBC en ratones primarios y secundarios. (A) Frotis de sangre periférica que muestran numerosas células falciformes irreversibles (ISC) en un ratón que se sometió a un trasplante control y una escasez de ISC en un ratón sG^bG. (B) Cuantificación de ISC en frotis de sangre periférica de ratones BERK que no se sometieron a trasplante (n = 5), ratones control (n = 3) y ratones sG^bG (n = 5). (* P < .05; ** P < .01). (C) La desoxigenación de la sangre induce la falciformación de los RBCs en un ratón control; la falciformación está ausente en gran medida en un ratón sG^bG. (D) Cuantificación de RBCs falciformes tras hipoxia graduada (por tonometría) en los ratones sG^bG (*), en comparación con los ratones control (O). (E) Capacidad de deformación de RBC mediante análisis LORCA en ratones sG^bG, control y normales (C57, círculo con x en el centro) analizados a las 18 semanas en receptores de trasplante primario. Se observaron datos similares en receptores secundarios. El flujo a bajo (3 Pa) y alto (28 Pa) esfuerzo de cizalla está representado por áreas sombreadas. (F) Vida media de RBC (determinada por marcaje de biotina in vivo) en ratones sG^bG, ratones control/BERK y ratones normales después de trasplantes primarios. Se observaron resultados similares en receptores secundarios. (G) Corrección de la patología del órgano en ratones sG^bG que se sometieron a un trasplante con acondicionamiento mieloablativo. 2+ infarto de hígado indica 2 a 3 infartos/sección; 3+ infarto de hígado, más de 3 infartos/sección; y EM, extramedular. Se observa congestión leve de los vasos del bazo con RBCs falciformes cuando se restaura la arquitectura esplénica.

Esto no se nota cuando la arquitectura esplénica se ve borrada por la eritropoyesis extramedular. Hiperplasia eritroide esplénica: severa es la obliteración completa de los folículos esplénicos; moderado, más de 1 folículo presente/sección; y leve, preservación de folículos con evidencia de islas eritroides. Médula ósea: la eritropoyesis normal indica M/E = 5:2; hiperplasia eritroide leve, M/E = 2:1; hiperplasia eritroide moderada, M/E = 1:1; e hiperplasia eritroide severa, M/E = 1:3. La eritropoyesis de la médula ósea se expresa como relación mieloide-eritroide (M/E). Los números entre paréntesis indican la característica histológica observada en el número de ratones/número total de ratones analizados en ese grupo.

La Figura 24 representa la expresión de HbF y la corrección funcional en ratones sG^bG que se sometieron a un trasplante después de un acondicionamiento de intensidad reducida, separados en 2 grupos: ratones con HbF de 10% o más (sG^bG>10) y ratones con HbF de menos de 10 % (sG^bG<10). (A) HbF en ratones BERK individuales 18 semanas después del trasplante de HSC BERK transducidas con sG^bG, después del acondicionamiento de intensidad reducida. (B-C) Expresión estable y alta de HbF y repoblación de células F en supervivientes a largo plazo analizados a los 11 meses. (D) Gráfico de recuadro y bigote que muestra los números de copia del vector en ratones sG^bG<10 y sG^bG>10, con el número medio de copias del vector indicado por la línea. Los símbolos en los paneles A C representan grupos de ratones: O = control (HbF 0%), ▼ = sG^bG<10 (HbF <10%) y • = sG^bG>10 (HbF > 10%). (E) La proporción de ISC se redujo (P < .04) en ratones sG^bG<10, pero se redujo notablemente en ratones sG^bG>10 (P < .001), en comparación con los ratones control. (F) La desoxigenación graduada por tonometría demuestra una reducción significativa en la formación a presiones parciales de oxígeno fisiológicamente relevantes (PO₂) en ratones sG^bG>10, mientras que los RBC de ratones sG^bG<10 falciformes similares a los controles. (G-H) La capacidad de deformación de los RBC mostró una mejora muy variable en la capacidad de deformación en ratones sG^bG<10. Por el contrario, la capacidad de deformación de los RBC en ratones sG^bG>10 mejoró significativamente a alto y bajo esfuerzo de cizalla (P<.001). Los símbolos representan grupos de ratones: O, control; ▼, sG^bG<10; ●, sG^bG>10; y (círculo con x en el centro), ratones de tipo natural (C57BL/6). Los rectángulos sombreados en gris son representativos del esfuerzo de cizalla bajo y alto a través de microvasos y vasos grandes, respectivamente. Las barras de error indican SEM.

La Figura 25 representa la corrección de la patología de los órganos en ratones sG^bG^A10 que se sometieron a un trasplante después de un acondicionamiento de intensidad reducida y una mejor supervivencia general. (A) Secciones teñidas con hematoxilina-eosina representativas de un riñón, hígado y bazo de ratones sG^bG>10 y sG^bG<10 48 a 50 semanas después del trasplante de acondicionamiento de intensidad reducida y un control BERK de 3 meses. La información de adquisición de imágenes está disponible en datos suplementarios. (B) La curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostró una supervivencia significativamente mejorada de los ratones sG^bG>10 en comparación con los ratones control/sG^bG<10 a las 50 semanas. La supervivencia a las 24 semanas se denota mediante una línea vertical discontinua para comparar con la supervivencia de los ratones sG^bG en el modelo de trasplante mieloablativo. (C) Parámetros hematológicos de ratones sG^bG que se sometieron a trasplante seguido de un acondicionamiento de intensidad reducida. Parámetros hematológicos y abreviaturas como se indica en la figura. Los valores de P representan comparaciones de ratones control con sG^bG≥10 a 12 (*), 18 (†) y 24 (‡). (D) Patología de órganos en ratones sG^bG que se sometieron a trasplante después de un trasplante de intensidad reducida. E-M indica extramedular; y 1 + infarto de hígado. 1 infarto/sección. * Congestión de vasos y presencia de RBC falciformes en los vasos. En particular, los vasos congestionados eran visibles en los bazos solo cuando se reducía la hiperplasia eritroide que afectaba la arquitectura esplénica. La terminología utilizada para cuantificar la patología de los órganos es la misma que se documenta en la figura.

La Figura 26 representa el efecto de HbF, células F y el porcentaje de células HbF/F requeridas para la mejora

funcional en la supervivencia y la capacidad de deformación de los RBC. (A) Vida media de RBC. El panel izquierdo muestra un ratón sG^bG representativo inyectado con biotina con células F marcadas con biotina (cuadrantes superiores derechos) y células no F (cuadrantes inferiores derechos) determinadas por FACS. El panel derecho muestra la supervivencia de las células F (cuadrado hueco con círculo sólido en el centro), en comparación con las células no F (círculo hueco con círculo sólido en el centro) en ratones sG^bG (n = 4); ratones de tipo natural (A); y ratones Berkeley (O). (B) Una cohorte de ratones sG^bG analizados para la supervivencia de RBC in vivo, basada en el porcentaje de células HbF/F. Cada símbolo representa un grupo de ratones con porcentaje de HbF y número de ratones enumerados en la leyenda de la tabla adyacente. (C) Todos los ratones sG^bG y control (n = 34) que se analizaron para determinar la capacidad de deformación de los RBC se dividieron en grupos basados en la proporción de células F 0%, 1% a 33%, 33% a 66%, y más de 66 %, y la capacidad de deformación de los RBC totales en estos ratones se trazó con un esfuerzo de cizalla bajo (3 Pa, A) y alto (28 Pa, triángulo hueco invertido). La capacidad de deformación significativamente mejorada sobre los controles control se denota por * (P<,05) y ** (P <,01). Las barras de error indican SEM

La Figura 27 representa la proporción de HSC transducidas en ratones sG^bG. Se muestran las partes en los modelos de trasplante mieloablativo (A) y de intensidad reducida (B). La proporción de HSC transducidas con sG^bG se determinó mediante colonias de bazo (30-36 colonias/ratón) mediante tinción intracelular con HbF y HbS. Cada barra representa un ratón individual. (A) En el modelo de trasplante mieloablativo, los símbolos debajo de cada barra (que representan un ratón) son consistentes con los símbolos en los ratones etiquetados. (B) En el grupo de intensidad reducida, la médula ósea se aspiró con éxito de 8 ratones a las 24 semanas y los ratones fueron seguidos durante 24 semanas adicionales. La expresión de HbF en sangre periférica mediante HPLC y el número de copias de médula ósea de los respectivos ratones a las 24 semanas se marcan debajo de cada barra.

La Figura 28 muestra la mejora en la supervivencia de ratones después de una terapia génica exitosa.

La Figura 29 representa la corrección de la talasemia en ratones Hbb^{th3/+} con el vector sGbG. La hemoglobina (Figura 29A) y el hematocrito (Figura 29B) se corrigieron a niveles normales con aproximadamente un 20% de expresión de HbF (Figura 29C). Los recuentos de reticulocitos (Figura 29D) también se redujeron significativamente, mostrando un recambio reducido de células eritroides.

La Figura 30 representa el mapa vectorial anotado para el vector sG^bG^M.

La Figura 31 representa la secuencia del vector sG^bG^M, junto con las diversas regiones de la secuencia.

La Figura 32 representa una expresión superior de HbF del vector sG^bG^M. La expresión de HbF del vector sG^bG^M en ratones falciformes Berkeley muestra una expresión de HbF superior por copia del vector, cuando se compara con el vector sG^bG (Figura 32A). Los ratones falciformes trasplantados con células madre hematopoyéticas transducidas con sG^bG^M muestran una reducción en el recuento de reticulocitos que es proporcional a la producción de HbF (Figura 32B). Los ratones con 30% o más de HbF producida a partir del vector sG^bG^M tienen recuentos de reticulocitos casi normales. Los valores normales de reticulocitos se representan a través del rectángulo sombreado.

La Figura 33 representa la expresión de HbF del vector sG^bG^M en comparación con el vector sG^bG en ratones falciformes. La expresión de HbF del vector sG^bG^M en ratones falciformes Berkeley (Figura 33A) y ratones falciformes UAB knock-in (Figura 33B) muestra una expresión de HbF superior por copia de vector, en comparación con el vector sG^bG. Los ratones falciformes trasplantados con células madre hematopoyéticas transducidas con sG^bG^M muestran una corrección superior de la anemia (Figuras 33C-D) y una reducción de la reticulocitosis (Figuras 33E-F) que es proporcional a la producción de HbF. Los ratones con 30% o más de HbF producida a partir del vector sG^bG^M tienen recuentos de reticulocitos casi normales y corrección del fenotipo falciforme.

Descripción de la invención

Se refiere a la Solicitud no provisional de EE. UU. No. 12/928,302, presentada el 6 de diciembre de 2010, publicada como solicitud de patente de EE. UU. No. 2011-0294114 y a la Solicitud provisional No. 61/267.008, presentada el 4 de diciembre de 2009. También se refiere a un vector del gen de la gammaglobina humana para la corrección génica de la anemia de células falciformes en un modelo de ratón humanizado y determinantes críticos para la corrección exitosa de la misma como se describe en "A novel human gamma-globin gene vector for genetic correction of sickle cell anemia in a humanized mouse model: critical determinants for successful correction". Blood (2009) 114: 1174-1185 Perumbeti A, Higashimoto T, Urbinati F, Franco R, Meiselman H *et al.*

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); Marzo, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 5ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); y Sambrook y Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001), proporcionan a un experto en la materia una guía general de muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

Como se usa en el presente documento, el término "SIN" es una abreviatura de auto-inactivación.

Como se usa en el presente documento, el término "VIH" es una abreviatura del virus de inmunodeficiencia humana.

Como se usa en el presente documento, el término "GFP" es una abreviatura de proteína verde fluorescente.

Como se usa en el presente documento, el término "ADNc" es una abreviatura de ADN complementario.

Como se usa en este documento, el término "LTR" es una abreviatura de repetición terminal larga.

5 Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de USO" se refiere a un elemento de secuencia aguas arriba.

Como se usa en el presente documento, el término "poliA" es una abreviatura de poliadenilación.

Como se usa en el presente documento, el término "cHS4" es una abreviatura de elemento hipersensible de sitio 4 de pollo.

10 Como se usa en el presente documento, el término "HSC" es una abreviatura de células madre hematopoyéticas.

Como se usa en el presente documento, el término "GOI" es una abreviatura de gen de interés.

Como se usa en el presente documento, el término "HbF" es una abreviatura de hemoglobina fetal.

Como se usa en el presente documento, el término "RBC" es una abreviatura de glóbulo rojo. Como se usa en el presente documento, el término "IDUA" es una abreviatura de alfa-L-iduronidasa.

15 Como se usa en el presente documento, el término "LCR" es una abreviatura de la región de control de locus.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, un sujeto es un paciente humano.

20 Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", "tratar", "corregir" y similares, con respecto a una afección específica, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. El "tratamiento", como se usa en este documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un sujeto, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado como tenerlo; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad y/o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad. El "tratamiento" también puede abarcar la administración de un agente o la administración de una terapia para proporcionar un efecto farmacológico, incluso en ausencia de una enfermedad o afección. El término "tratamiento" se usa en algunas realizaciones para referirse a la administración de un compuesto de la presente invención para mitigar una enfermedad o un trastorno en un huésped, preferiblemente en un sujeto mamífero, más preferiblemente en humanos. Por lo tanto, el término "tratamiento" puede incluir incluye: prevenir que ocurra un trastorno en un huésped, particularmente cuando el huésped está predispuesto a adquirir la enfermedad, pero aún no se le ha diagnosticado la enfermedad; inhibiendo el desorden; y/o aliviar o revertir el trastorno. En la medida en que los métodos de la presente invención están dirigidos a prevenir trastornos, se entiende que el término "prevenir" no requiere que el estado de la enfermedad sea completamente frustrado (ver el Noveno Diccionario Colegiado Webster). Más bien, como se usa en el presente documento, el término prevención se refiere a la capacidad del experto en la materia para identificar una población que sea susceptible a trastornos, de modo que la administración de los compuestos de la presente invención pueda ocurrir antes del inicio de una enfermedad. El término no significa que el estado de la enfermedad deba evitarse por completo.

40 Como se usa en el presente documento, los términos "mutado", "mutación", "mutante" y similares, se refieren a un cambio en una secuencia, tal como una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, de un patrón nativo, de tipo natural, estándar o versión de referencia de la secuencia respectiva, es decir, la secuencia no mutada. Estos términos pueden referirse a uno o más genes mutados, como los ácidos desoxirribonucleicos, ácidos ribonucleicos y similares, o uno o más productos génicos mutados, como las proteínas. Un gen mutado puede dar como resultado un producto génico mutado. Un producto génico mutado diferirá del producto génico no mutado en uno o más residuos de aminoácidos.

45 En algunas realizaciones, un gen mutado que da como resultado un producto génico mutado puede tener una identidad de secuencia del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de la secuencia de nucleótidos no mutada correspondiente. En algunas realizaciones, un gen mutado que da como resultado un producto génico mutado puede tener una identidad de secuencia del 96%, 97%, 98%, 99% o mayor a la secuencia de nucleótidos no mutada correspondiente. El gen mutado en la presente invención es un gen de gammaglobina humana mutada que codifica una proteína que comprende la SEC ID NO: 1.

50 En algunas realizaciones, el gen de gamma-globina humana mutado se usa para corregir genéticamente la anemia falciforme o la β -talasemia o reducir los síntomas de la misma, incluidas las etapas de identificar a un sujeto que necesita tratamiento para la anemia de células falciformes o la β -talasemia; transfectar células madre hematopoyéticas

autólogas (HSCs) con un lentivirus modificado que comprende el gen gamma-globina humano mutado; y trasplantar las HSC transfectadas en el sujeto.

En algunas realizaciones, la hemoglobina fetal posterior al trasplante supera al menos el 20%; las células F constituyen al menos 2/3 de los glóbulos rojos circulantes; la hemoglobina fetal por células F representa al menos 1/3 de la hemoglobina total en los glóbulos rojos falciformes; y al menos el 20% de HSC modificadas genéticamente repobla la médula ósea del sujeto. En algunas realizaciones, la hemoglobina fetal posterior al trasplante supera el 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% o más. En algunas realizaciones, la hemoglobina fetal posterior al trasplante supera el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más. En algunas realizaciones, las células F constituyen al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de los glóbulos rojos circulantes. En algunas realizaciones, la hemoglobina fetal por células F representa al menos 1/3 de la hemoglobina total en los glóbulos rojos falciformes. En algunas realizaciones, la hemoglobina fetal por células F representa al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de la hemoglobina total en los glóbulos rojos falciformes. En algunas realizaciones, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, o más, las HSC modificadas genéticamente repoblan la médula ósea del sujeto.

15 Elementos *cis* esenciales y la optimización del diseño vectorial

Como se describe en el presente documento, se realizó una experimentación para determinar si las secuencias *cis* no codificantes de lentivirus desempeñaban un papel específico en la exportación de ARN, el empaquetamiento o la expresión de β -globina. El ciclo de vida del vector se estudió en los virus auto-activadores (SIN), portadores del gen de la β -globina y la región de control del locus (BG), o ADNc de GFP. El análisis sistemático comenzó con un lentiviral SIN mínimo completamente "destripado" que portaba sólo la región de empaquetado; y el lentiviral SIN que contienen elementos *cis* de VIH crecientes, junto con un gamma retrovirus SIN para identificar elementos *cis* óptimos para incluir en la cadena principal SIN-LV. Para clonar el vector rSIN-GFP, el LTR 3' de una estructura principal de SIN-LV estándar utilizada previamente, como se describe en este documento, se modificó para mejorar la terminación de la transcripción. Específicamente, se añadió la señal de poliadenilación de la hormona de β -crecimiento inversa del LTR 3' y se añadió una secuencia USE derivada de la señal de poliadenilación tardía de SV40 en la delección de U3.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, el retrovirus de gamma SIN o un GFP destripado/mínimo de lentiviral SIN que codifica GFP generó títulos elevados y medió una alta expresión de GFP. Sin embargo, el gamma retrovirus SIN o el lentiviral SIN destripado que codifica BG o un transgén grande de tamaño similar tenían títulos apenas detectables en comparación con el lentiviral SIN que portaba elementos *cis*. La adición sistemática de elementos *cis* demostró que Rev/RRE era lo más esencial, seguido de secuencias aceptoras de empalme *gag* y *env*, para el ensamblaje/empaquetamiento eficaz de partículas de lentivirus, no para la exportación de ARNm. Sin embargo, estas secuencias *cis* de VIH eran prescindibles para transgenes más pequeños. Estos estudios identifican elementos *cis* clave de lentivirus y el papel que desempeñan en vectores que portan insertos grandes, y tienen implicaciones importantes para la terapia génica.

En una realización, se describe en el presente documento un método para aumentar el título de un vector de expresión lentiviral SIN modificado en comparación con un vector de expresión lentiviral SIN estándar. En otra realización, el vector de expresión lentiviral SIN se modifica insertando una secuencia señal de poliadenilación heteróloga (poliA) inversa de una secuencia de repetición terminal larga viral 3' en una cadena principal de vector lentiviral SIN estándar. En otra realización, la señal poliA es la secuencia señal de la hormona de crecimiento bovina poliA. En otra realización, el vector lentiviral SIN se modifica insertando una o más de una secuencia potenciadora de poliA inversa (secuencia USE) en un LTR 3' de una cadena principal de vector lentiviral SIN estándar. En otra realización, la secuencia USE se deriva de la señal de poliA tardía de SV40. En otra realización, se insertan 2-3 copias de la secuencia USE en un LTR 3' de una cadena principal de vector lentiviral SIN estándar. En otra realización, se insertan de 2 a 10 copias de la secuencia de USO en un LTR 3' de una cadena principal de vector lentiviral SIN estándar. En otra realización, se insertan 3-5 copias de la secuencia USE en un LTR 3' de una cadena principal de vector lentiviral SIN estándar. En otra realización, una o más copias de la secuencia USE se inserta en la región U3. En otra realización, la señal de poliA de la hormona de crecimiento β y una o más copias de la secuencia de USO derivada de la señal de poliA tardía de SV40 se incorporan al vector de expresión. En otra realización, el vector de expresión contiene un gen de interés (GOI). En otra realización, el gen está operativamente unido a un promotor. En otra realización, el promotor es un promotor específico de linaje. En otra realización, el promotor es un promotor específico eritroide. En otra realización, del GOI es β -globina. En otra realización, el GOI es gamma-globina. En otra realización de la invención, el gen de gamma-globina está bajo el control de elementos reguladores de β -globina. En otra realización, el vector se usa para tratar la anemia falciforme mediante terapia génica. En otra realización, el vector se usa junto con acondicionamiento de intensidad reducida para tratar la anemia falciforme. En otra realización, el lentiviral SIN comprende una variedad de lentivirus derivados de bovinos, equinos, felinos, ovinos/caprinos o primates. En otra realización, el lentiviral SIN es un lentiviral SIN derivado del VIH. En otra realización, el vector lentiviral SIN modificado se introduce en una célula eucariota por transfección.

En una realización, la presente descripción proporciona un método para diseñar un vector lentiviral SIN recombinante y menos seguro, y por lo tanto menos recombinogénico y más seguro para la expresión de pequeños transgenes terapéuticos que no requieren elementos *cis* extensivos para la eficacia. En otra realización, los pequeños transgenes terapéuticos son de igual tamaño o más pequeños que la proteína verde fluorescente (GFP). En otra realización, los

pequeños transgenes terapéuticos son más pequeños que la β -globina humana.

Elementos aislantes de cromatina

Como se describe en el presente documento, los elementos aislantes de cromatina evitan la propagación de la heterocromatina y el silenciamiento de los genes, reducen los efectos de posición de la cromatina y tienen una actividad de bloqueo mejorada. Estas propiedades son deseables para la expresión predecible consistente y la administración segura de transgenes con vectores de integración aleatoria. Superar los efectos de la posición de la cromatina puede reducir el número de copias requeridas para un efecto terapéutico y reducir el riesgo de genotoxicidad de los vectores. La genotoxicidad del vector se ha convertido en un área de estudio intenso desde la aparición de leucemia relacionada con la terapia génica en pacientes en los ensayos de X-SCID. Los vectores gamma-retrovirales y los vectores lentivirales se han modificado a un diseño auto-inactivador (SIN) para eliminar los potenciadores ubicuamente activos en la región U3 de las repeticiones terminales largas (LTR). Se ha insertado un sitio 4 hipersensible a ADNsa de 1,2Kb (cHS4) del locus de p-globina de pollo en el LTR 3' para permitir su duplicación en el LTR 5' en vectores de gamma retrovirus y lentivirus. Los vectores aislados tienen efectos de posición de cromatina reducidos y proporcionan una expresión general consistente y, por lo tanto, mejorada. Se realizó una comparación lado a lado de los vectores de lentivirus aislados y no aislados de cHS4 que portaban h β -globina y la región de control de locus, y resultó en el descubrimiento de que los vectores aislados mostraban una expresión consistente y predecible, independientemente del sitio de integración en la progenie diferenciada de células madre hematopoyéticas, lo que resulta en una expresión general 2-4 veces mayor. La evidencia reciente también sugiere que los vectores de lentivirus aislados con cHS4 pueden reducir el riesgo de activación por inserción de oncogenes celulares. A pesar de los efectos beneficiosos de los vectores aislados, también conducen a una reducción significativa en los títulos con la inserción del elemento de aislador cHS4 de 1,2Kb de longitud completa en el LTR 3' de los vectores lentivirus. Hay informes similares de disminución de títulos virales o transmisión inestable con vectores de gamma retrovirus que contienen inserciones en el 3' LTR. Esta reducción en los títulos se vuelve prácticamente limitante para la ampliación de la producción de vectores para ensayos clínicos, especialmente con vectores que portan casetes de expresión relativamente grandes, como el gen de la β -globina humana (h β) y la región de control de locus (LCR), que tienen títulos moderados incluso sin elementos aislantes.

No se han abordado los efectos de las inserciones de fragmentos exógenos en el LTR en el ciclo de vida viral. Por lo tanto, se estudió el mecanismo por el cual se insertó cHS4 u otros insertos en los títulos inferiores víricos LTR 3' de los vectores lentivirales. La LTR grande inserta títulos más bajos a través de una restricción posterior a la entrada en la transcripción inversa, y aumenta la recombinación homóloga en las LTR del ADNc viral, reduciendo así la cantidad de ADN del virus disponible para la integración. Estos resultados tienen implicaciones importantes para el diseño vectorial para la terapia génica clínica. Los estudios sobre el elemento (cHS4) del sitio 4 hipersensible de pollo, un aislador prototípico, han identificado motivos CTCF y USF-1/2 en los 250 bp proximales de cHS4, denominados "núcleo", que proporcionan actividad de bloqueo potenciador y reducen los efectos de posición. Sin embargo, el núcleo por sí solo no aísla eficazmente los vectores virales. Mientras que el cHS4 de longitud completa tiene excelentes propiedades aislantes, su gran tamaño compromete severamente los títulos de los vectores. Se realizó un análisis de estructura-función de los vectores lentivirus flanqueantes de cHS4 y se analizó la expresión transgénica en la progenie clonal de células madre hematopoyéticas y se analizaron los cambios epigénicos en cHS4 y el promotor transgénico.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, el núcleo solo redujo la variedad clonal en la expresión. La actividad única del aislador residía en las secuencias distales de cHS4 de 400 bp, que cuando se combinaban con el núcleo, restauraban la actividad completa del aislador y abrían marcas de cromatina sobre el promotor transgénico y el aislador. Estos datos consolidan la actividad del aislador conocido del núcleo 5' canónico con un nuevo elemento 3' 400 bp con propiedades similares al núcleo. Juntos, tienen excelentes propiedades aislantes y títulos virales. Estos datos tienen implicaciones importantes con respecto a la comprensión de la base molecular de la función del aislador y el diseño vectorial de terapia génica.

En una realización, la presente descripción proporciona un método para aumentar el título de vectores lentivirales mediante la incorporación de uno o más aisladores de cromatina de longitud reducida que contienen partes funcionales de un aislador de cromatina de longitud completa. En otra realización, las partes funcionales se derivan de un único tipo de aislador de cromatina de longitud completa. En otra realización, el aislador funcional de longitud reducida comprende partes funcionales de dos o más variedades separadas de aisladores de cromatina. En otra realización, el aislador de cromatina de longitud reducida funcional se deriva de un elemento (cHS4) de sitio 4 hipersensible de pollo. En otra realización, el aislador funcional de longitud reducida es un aislador derivado de cHS4 de 650 pares de bases o menos. En otra realización, uno o más aisladores derivados de cHS4 de longitud reducida se combinan con otras modificaciones con un vector de expresión de lentiviral SIN para aumentar el título y mejorar la estabilidad de la expresión transgénica. En otra realización, se añaden uno o más aisladores derivados de cHS4 de longitud reducida a un vector que contiene una secuencia señal (poliA) de poliadenilación heteróloga inversa de una LTR 3' viral y una secuencia USE en la delección de U3.

Enfermedad de anemia falciforme

La enfermedad de anemia falciforme (por sus siglas en inglés, SCD) afecta al gen de la β -globina y es uno de los defectos génicos más comunes, lo que resulta en la producción de una globina falciforme defectuosa (HbS, comprende

dos moléculas normales de globina $\beta^{\text{falciforme}}$ y dos moléculas de globina, denominadas como $\alpha_2\beta^{\text{S}_2}$). La HbS polimeriza tras la desoxigenación y cambia la forma de los glóbulos rojos discoides (RBCs) a formas extrañas de falciformes/gancho. Los RBCs falciformes obstruyen la microvasculatura, causando dolorosos eventos isquémicos agudos de órganos y daño crónico de órganos que acorta la vida útil de los pacientes con SCD a 45 años. Esta enfermedad afecta a más de 110,000 americanos, con 1000 recién nacidos con SCD nacidos cada año y casi 1000 bebés nacidos con esta enfermedad anualmente en África.

Las opciones terapéuticas para SCD son extremadamente limitadas e implican un trasplante de células madre hematopoyéticas (HCT) de la médula ósea. HCT está disponible solo para el 10-15% de los pacientes con donantes de hermanos normales compatibles y a menudo se asocia con efectos secundarios inmunes graves. La hemoglobina fetal (HbF, compuesta de globinas α y γ , $\alpha_2\gamma_2$) se produce durante la vida fetal y los primeros 6-9 meses de edad y tiene fuertes propiedades anti-falciformes y protege al bebé de la falciformación en el primer año de vida. De hecho, las personas con persistencia hereditaria de HbF que tienen SCD son asintomáticas. La hidroxiurea, un fármaco quimioterapéutico que aumenta la HbF, está aprobada por la FDA para mejorar los síntomas de SCD. Sin embargo, la hidroxiurea no funciona para todos los pacientes y, debido a la ingesta diaria de por vida, se asocia con un cumplimiento deficiente. Por lo tanto, se necesitan mejores opciones terapéuticas para SCD.

La corrección génica de las células madre autólogas de la médula ósea (células madre hematopoyéticas) con un vector lentivirus que codifica el gen de la γ -globina podría producir permanentemente la producción de la HbF anti-falciforme, evitando así la anemia falciforme eritrocítica. Este método tiene ventajas sobre las terapias disponibles en la actualidad, incluida su disponibilidad para todos los pacientes, particularmente aquellos que no tienen un hermano donante compatible, y el hecho de que sería un tratamiento único, que da como resultado una corrección de por vida y carente de cualquier efecto secundario inmune. Un enfoque efectivo de terapia génica revolucionará la forma en que se trata la SCD y mejorará los resultados de los pacientes con este trastorno devastador.

Determinación de parámetros críticos de la corrección de la enfermedad: anemia falciforme

Como se describe en el presente documento, la administración lentiviral de γ -globina humana bajo elementos de control reguladores de β -globina en HSC da como resultado una expresión de HbF posnatal suficiente para corregir SCA en ratones. La cantidad de HbF y HSC transducidas se redujo, utilizando acondicionamiento de intensidad reducida y multiplicidad variable de infección (MOI), para evaluar los parámetros críticos necesarios para la corrección. Una cuantificación sistemática de los índices funcionales y hematológicos de RBC, la patología de los órganos y la duración de la vida fueron críticos para determinar la cantidad mínima de HbF, células F, células HbF/F y HSC modificados genéticamente necesarios para revertir el fenotipo falciforme.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, la mejoría de la enfermedad se produjo cuando la HbF excedió el 10%, las células F constituyeron dos tercios de los RBCs circulantes, y las células HbF/F representaban un tercio de la hemoglobina total en los glóbulos rojos; y cuando aproximadamente el 20% de las HSC modificadas con sG^bG repoblaron la médula. La corrección génica se mantuvo en receptores de trasplante primario o secundario seguidos a largo plazo. El presente estudio describe un método para determinar el quimerismo mínimo de HSC para la corrección de una enfermedad hematopoyética en un modelo in vivo, lo que contribuiría al diseño de dosis de células y regímenes de acondicionamiento para lograr HSC genéticamente corregidos en ensayos clínicos en humanos. Además, este estudio aborda la dosis del gen y la dosis de células madre hematopoyéticas modificadas por el gen necesarias para la corrección de un defecto genético.

En una realización, la presente descripción proporciona un método para determinar el quimerismo mínimo de HSC para la corrección de una enfermedad hematopoyética en un modelo in vivo. En otra realización, el acondicionamiento de intensidad reducida antes del trasplante se usa como un método para variar el quimerismo de HSC. En otra realización, la proporción de HSC transducidas y copia/célula del vector varía transduciendo las células en un intervalo de MOI (30-100). En otra realización, el MOI es 20-120. En otra realización, el quimerismo mínimo determinado y la dosis génica se pueden usar para diseñar regímenes de dosis y acondicionamiento celular para lograr HSC genéticamente corregidas equivalentes en ensayos clínicos en humanos. En otra realización, el acondicionamiento de intensidad reducida se usa antes del trasplante en un entorno clínico para reducir la morbilidad relacionada con el trasplante. En otra realización, la enfermedad hematopoyética es anemia falciforme. En otra realización, la enfermedad hematopoyética es la β -talasemia.

Terapia génica para la enfermedad de células falciformes a través de la gamma globina mutante

Como se describe en el presente documento, un gen de γ -globina mutante mejorado se ha diseñado a partir de un vector lentivirus, sG^bG^M . Este vector tiene una mayor tendencia a formar HbF y mejores propiedades anti-falciformes, lo que resulta en una corrección superior de SCD en modelos de ratón SCD homocigotos estrictos. El gen diseñado para la γ -globina tiene una mayor afinidad para unirse a la α -globina sin alterar su función, mejorando así en gran medida la eficacia de la formación de HbF en los RBCs y dando como resultado un efecto anti-falciformación mucho más eficaz que corregirá el fenotipo SCD.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, el vector sG^bG^M diseñado tiene una tendencia dos veces mayor a formar HbF que el gen de γ -globina nativo del vector sG^bG y corrige fácilmente los ratones falciformes UAB

eficazmente. Ambos vectores corrigen SCD en ratones falciformes Berkeley. Por lo tanto, el vector sG^bG^M proporciona el doble de la cantidad de HbF por copia de vector en ratones falciformes en comparación con el vector sGbG. Además de proporcionar una mayor cantidad de HbF, la HbF mutante producida por el vector sG^bG^M también confiere RBCs falciformes con una vida útil mucho más larga en comparación con la HbF natural, debido a la reducción de la falciformación. Por consiguiente, este vector puede corregir eficazmente la MSC en pacientes humanos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En la medida en que se mencionen materiales específicos, es meramente para fines de ilustración y no pretende limitar la invención.

Ejemplo 1

Los elementos Cis lentivirales necesarios para el empaquetado eficaz de casetes transgénicos grandes como la β -globina

Este estudio investigó si las secuencias *cis* no codificantes de lentivirus desempeñaron un papel específico en la exportación de ARN, el empaquetamiento o la expresión de β -globina. El ciclo de vida del vector se estudió en los auto-inactivadores del lentivirus-(SIN), portadores del gen de la β -globina y la región de control de locus (BG), o ADNc de GFP. El análisis sistemático comenzó con un lentivirus SIN mínimo completamente "destripado" que portaba solo la región de empaquetado; y lentivirus SIN que contienen elementos *cis* de VIH crecientes, junto con un gamma-retrovirus-SIN. Se descubrió que (i) el gamma retrovirus SIN o un GFP destripado/mínimo lentiviral SIN que codificaba GFP generaba títulos elevados y mediaba la expresión de GFP alta. (ii) Sin embargo, el gamma-retrovirus-SIN o el lentiviral SIN destripado que codifica BG o un transgén grande de tamaño similar tenían títulos apenas detectables en comparación con el lentiviral SIN que portaba los elementos *cis*. (iii) La adición sistemática de elementos *cis* demostró que Rev/RRE era más esencial, seguido de secuenciasceptoras de empalme *gag* y *env*, para el ensamblaje/empaquetamiento eficaz de partículas de lentivirus, no para la exportación de ARNm. Sin embargo, estas secuencias *cis* de VIH eran prescindibles para transgenes más pequeños. Estos estudios identifican elementos *cis* clave de lentivirus y el papel que desempeñan en vectores que portan insertos grandes, y tienen implicaciones importantes para la terapia génica.

Ejemplo 2

Expresión de BG del SIN- γ RV destripado

Se ha postulado que los γ RV no pueden expresar con éxito la h β -globina debido a la interferencia transcripcional entre los fuertes elementos promotores/potenciadores de γ RV LTR y el potenciador interno de LCR. SRS11.SF es un SIN- γ RV que codifica el ADNc de GFP bajo el control de un promotor/potenciador interno del virus de formación de foco de bazo (SFFV). El SFFV-GFP en SRS11.SF se reemplazó con BG, un casete de expresión que se utilizó con éxito en un SIN-LV estándar para lograr la expresión terapéutica de la β -globina humana en la talasemia, para generar SRS11.BG. La razón para usar SRS.11, a pesar de la notoriedad de β -globina y RV fue: (i) contiene la región mínima de empaquetado (Ψ), carece de secuencias de *gag* y puede portar una carga útil de vector más largo, pero retiene títulos extremadamente altos; (ii) porta una eliminación U3 de 400 bp larga del LTR 3', comparable a la eliminación en SIN-LV. (iii) Los elementos LCR grandes nunca se han probado en γ RV debido a restricciones en la carga útil del vector.

Los títulos infecciosos y la expresión de los vectores SRS11.BG y SRS11.SF γ RV se compararon en la línea celular de eritroleucemia murina (MEL). La expresión de la proteína p-globina humana era casi indetectable a partir de células MEL transducidas con SRS11.BG, en contraste con la alta expresión de GFP en células transducidas con SRS.11 SF. Los títulos virales no concentrados de SRS11 BG versus SRS11.SF vector fueron $6,8 \pm 5 \times 10^3$ UI/mL versus $4 \pm 0,2 \times 10^6$ UI/mL. Las transcripciones de ARN viral (ARNv) apenas se detectaron en células 293T con el SRS11.BG mediante análisis de transferencia Northern (datos no mostrados). Por lo tanto, la producción de ARNv de BG y partículas virales a partir de γ RV, incluso aquellas optimizadas para un diseño SIN y una alta carga útil de vectores, se vio gravemente afectada.

Ejemplo 3

Expresión de transgenes grandes/pequeños a partir de LV estándar o destripado/mínimo

En contraste con el SIN- y RV usado en el presente documento, el SIN-LV "estándar" comúnmente usado retiene partes relativamente grandes de secuencias virales que representan aproximadamente el 20-25% del genoma del VIH. Estos elementos *cis* son: el LTR (634 bp para VIH LTR de tipo natural (wt) o 235 bp para SIN-LV LTR), la señal de empaquetamiento Ψ (150 bp), la parte 5' del gen *gag* (300 o 600 bp), secuencias *env* que incluyen el elemento de respuesta rev (RRE, 840 bp) y el tracto tejido/tracto de polipurina (cPPT) del gen *pol* (120 bp).

Para examinar el requisito de secuencias *cis* para GFP versus BG, el casete CMV-GFP se clonó en a) las secuencias *cis* que contienen SIN-LV "estándar" enumeradas anteriormente (sSIN-GFP), y b) un SIN-LV mínimo "destripado"

donde la secuencia *gag*, RRE y el resto de las secuencias *env* se eliminaron y solo se retuvo la región Ψ (dsSIN-GFP; Fig. 1A). Los títulos del mínimo dsSIN-GFP LV fueron solo 2 veces más bajos que los títulos del LV sSIN-GFP "estándar" (Fig. 1B; $p < 0,01$; $n = 3$). En marcado contraste con los vectores GFP, la diferencia en títulos de los vectores BG LV-SIN, sBG-6 y sBG-1 estándar análogos y destripados BG fue de 1100 veces $p < 0,01$; $n = 4$; (Fig. 1B). Claramente, las secuencias no codificantes de LV son necesarias para la producción de partículas de LV y/o para la expresión de β -globina; y estas secuencias tienen un efecto pronunciado en los títulos infecciosos de LV que codifican el gen de la β -globina, pero no en los que codifican GFP. A continuación, los vectores se construyeron con un casete transgénico de tamaño similar, CMV-FANCA-IRES-GFP (FIG) como sBG (Fig. 1A) en el SIN LV "estándar" (sFIG) o destripado (dsFIG). La misma dependencia de la FIG en las secuencias *cis del* LV: los títulos del vector dsFIG fueron tres órdenes de magnitud más bajos que los de sFIG (Fig. 1B). Por lo tanto, los elementos *cis del* LV son prescindibles para insertos pequeños, pero necesarios para títulos altos de insertos grandes.

Ejemplo 4

Construcciones del LV diseñadas para estudiar el papel de las secuencias *cis*

Para estudiar qué secuencias *cis* del LV particulares eran importantes para este efecto, y en qué etapa del ciclo de vida del vector afectaban, se clonó una serie de diez vectores SIN-LV; todos ellos con el casete BG pero con diferentes elementos *cis* no codificantes lentivirales (Fig. 2). La razón para estudiar secuencias específicas de *env* (RRE y SA) y *gag* en el contexto de BG fue: (i) El elemento RRE en el fragmento *env* en un LV "estándar" facilita el transporte de transcripciones no empalmadas/empalmadas individualmente desde el núcleo después de la unión con la proteína Rev. (ii) Los sitios de empalme *env* juegan un papel fundamental en la estabilidad del ARNv y su disponibilidad para el empaquetamiento, y la ausencia de secuencias conocidas de aceptor de empalme inversa (SA) da como resultado actividad de la secuencia represora (CRS) que actúa en *cis*, lo que dificulta la acumulación citoplasmática de ARN de VIH-1. (iii) Una parte del gen *gag* se retiene en vectores para ayudar al empaquetamiento de ARNv. Las secuencias *gag* promueven el plegamiento de la estructura secundaria de ARN de la señal de empaquetamiento, facilitan la interacción del ARNv con las proteínas Gag durante la formación de partículas y son importantes para la dimerización del ARNv. Las secuencias asignadas al sitio donante de empalme 5' y los primeros 360 bp del gen *gag* dirigen el ARNm viral sin empalmar y empalmado individualmente a compartimentos subnucleares específicos desde donde se exporta con la ayuda de Rev/RRE.

El primer vector (sBG-1) mantuvo solo la señal de empaquetamiento (que contiene el sitio donante de empalme 5') y el cPPT/tejido (Fig. 2). A partir de este vector, el RRE, el resto del fragmento *env* que contiene el SA y dos fragmentos *gag* de diferentes tamaños (360 bp y 630 bp) se clonaron secuencialmente en sBG-2, sBG-3, sBG-5 y sBG-6. Para verificar la actividad del aceptor de empalme (SA), la secuencia en el fragmento *env* fue mutada por mutagénesis específica de sitio de PCR (sBG-4). En los últimos cuatro vectores, todo el fragmento *env*, incluido el RRE, se eliminó por primera vez, dejando solo la versión larga y corta de los fragmentos *gag* (sBG-9, sBG-10); o adicionalmente añadido RRE (sBG-7, sBG-8) inversa de los fragmentos *gag* largos y cortos.

Ejemplo 5

Títulos virales con inclusión de diferentes secuencias *cis* del VIH

Los vectores sin el elemento RRE (sBG-1, sBG-9 y sBG-10) tenían un título concentrado que variaba de $5,5 \pm 2,1 \times 10^5$ UI/mL a $1,7 \pm 1,4 \times 10^6$ UI/mL, que era de 2-3 órdenes de magnitud menor que los vectores que llevan la secuencia RRE (sBG-2 a sBG-8; $p < 0,01$). De hecho, cuando solo se añadió la secuencia RRE a sBG-1 para generar sBG-2, el título aumentó en más de 100 veces ($5,5 \pm 2,1 \times 10^5$ UI/mL versus $8,7 \pm 6,5 \times 10^7$ UI/mL; $p < 0,01$; Fig. 3).

La adición del fragmento *env* que contiene el sitio SA aumentó los títulos de los vectores 3-5 veces: $2,9 \pm 0,9 \times 10^8$ UI/mL para sBG-3 versus $8,7 \pm 0,7 \times 10^7$ UI/mL para sBG-2 ($p < 0,01$). Este efecto fue específico para el SA, ya que los títulos del vector sBG-4, que contiene la secuencia *env* con un SA mutado, fueron $1,1 \pm 0,61 \times 10^8$ UI/mL, y fueron similares a los del sBG-2 que solo transporta el RRE (sBG-4 vs. sBG-3 $p < 0,01$). La adición de un fragmento largo y corto de *gag* a *env* (RRE y SA) que contiene los vectores sBG-5 y sBG-6, respectivamente, mostró un aumento adicional en los títulos en ~ 4-5 veces, con títulos de sBG-6 llegando a $6,3 \times 10^8$ UI/ml (sBG-4 frente a sBG-5 y sBG-6 $p < 0,01$). Los datos sugirieron que la parte más larga de *gag* no era necesaria para títulos altos de BG. Sin embargo, los títulos de los vectores que portan solo los fragmentos *gag* cortos/largos, sin RRE y *env* de fueron bajos (sBG-9 y sBG-10), en comparación con aquellos que también contienen RRE (sBG-7 y sBG-8; $p < 0,01$). Los títulos de sBG-7, 8, 9 y 10 variaron de $9,4 \pm 4,7 \times 10^5$ UI/ml a $1,4 \pm 0,4 \times 10^8$ UI/ml. Los títulos mejoraron más de 3 a 5 veces con la inclusión de *env* de SA. Por lo tanto, el fragmento *gag* solo, o la combinación *gag*/RRE no fue suficiente para conferir títulos óptimos a los vectores BG, lo que sugiere que las secuencias *cis del* VIH-1 actuaron cooperativamente.

Para estudiar si el fuerte efecto del RRE sobre los títulos virales dependía de Rev, el vector sBG-6 se empaquetó con y sin Rev. En estos experimentos, el sistema de empaquetamiento se cambió de 3 plásmidos a un sistema de 4 plásmidos, en donde Rev y Gag-Pol se proporcionaron a partir de diferentes plásmidos. Los títulos de sBG-6 fueron aproximadamente 400 veces más altos con Rev ($3,8 \pm 0,3 \times 10^7$ UI/mL) que sin la proteína Rev ($9,4 \times 5,8 \times 10^4$ UI/ml; $p < 0,01$), lo que demuestra la interacción de Rev con RRE fue necesario para títulos altos.

Tomados en conjunto, estos datos indican que VIH-1 Rev/RRE, *gag* y *env* de SA fueron críticos para títulos altos de

LV que transportan una carga grande como BG o FIG, aunque son prescindibles para casetes pequeños basados en GFP.

Ejemplo 6

Papel de los elementos *cis* del LV en el ciclo de vida del vector

- 5 Con el fin de evaluar el papel de los elementos *cis* del LV en la estabilidad y expresión proviral, se realizó un análisis de transferencia Southern genómico en células MEL transducidas.

10 Sorprendentemente, dadas las dificultades previas con los reordenamientos genómicos de hβ-globina que contiene y RV, solo se detectó una banda proviral del tamaño esperado en la mayoría de los LV Fig. 4A. Algunos vectores de título bajo eran indetectables al nivel de sensibilidad de una transferencia Southern. El posterior análisis de transferencia Northern en las células de empaquetamiento confirmó que los transcritos de ARNv de longitud completa esperados se generaron a partir de todo el LV (Fig. 5A), confirmando que el LV que porta el casete BG grande no requiere secuencias *cis* para una transmisión estable.

15 Para determinar si las secuencias *cis* del LV afectaban el nivel de expresión de los provirus BG integrados, las células MEL se transdujeron con los vectores sBG-1 a sBG-10 en un intervalo de multiplicidad de infección. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se comparó en grupos de células MEL con un porcentaje similar de células que expresan hβ-globina (15-20%), excepto en vectores con títulos bajos, donde solo se pudo lograr un pequeño porcentaje de transferencia génica. El MFI de la población de células MEL transducidas fue comparable entre todos los vectores (que van desde 62 a 110 unidades arbitrarias), incluido el de los vectores de bajo título (Fig. 4B). Por lo tanto, los elementos *cis* del LV no jugaron un papel importante en la regulación de la expresión de BG.

- 20 Con el fin de determinar el papel de RRE, *gag* y *env* de SA en la producción de ARNv y la exportación citoplasmática, las etapas del ciclo de vida del vector que podrían perjudicar la generación de ARNv de longitud completa en las células de empaquetamiento, su posterior exportación citoplasmática, ensamblaje y empaque en partículas de vectores fue estudiado.

25 ARN El ARN total, citoplasmático y nuclear se fraccionó a partir de células de empaquetamiento 293T transfectadas con sBG-1 a través de sBG-10. La Figura 5A muestra un análisis de transferencia Northern en el ARN total sondeado con la sonda de hβ-globina. Se determinaron correctamente las bandas de tamaño de ARNv intacto de todos los vectores, incluidos los vectores sin RRE (sBG-1, sBG-9 y sBG-10). Las transcripciones de ARNv empalmadas y no empalmadas solo estaban presentes para los vectores sBG-3, sBG-5 y sBG-6, ya que estos vectores portan el sitio *env* de SA. Por lo tanto, no se produjo un empalme aberrante apreciable en ninguno de los esqueletos del LV, lo que confirma la falta de recombinación del gen de la hβ-globina y los elementos LCR, y los resultados contrastantes informados con y RV.

30

35 Significativamente, todos los vectores con títulos muy bajos, incluidos sBG-1, sBG-9 y sBG-10 que no contienen RRE, produjeron ARNv en cantidades que eran comparables o superiores a los vectores de título más altos (sBG-5 y sBG-6) Dado que este hallazgo fue inesperado, la transferencia Northern se repitió en un experimento separado, con fraccionamiento de ARN total y citoplasmático, con resultados idénticos.

40 Rev/RRE se ha caracterizado mejor por la exportación de ARNv de longitud completa al citoplasma. Por lo tanto, la siguiente etapa fue determinar si RRE contribuyó a títulos altos a través de la exportación de ARNv. El análisis de transferencia Northern mostró cantidades similares de ARNv en el citoplasma de vectores análogos sin o con RRE (sBG-1 versus sBG-2, sBG10 versus sBG-8 y sBG-9 versus sBG-7; Fig. 5B). La relación de ARN citoplasmático a ARN total en transferencias Northern de dos experimentos separados se muestra en 6E. Las transcripciones de ARNv citoplasmático fueron solo 2 veces mayores en sBG-2, en comparación con sBG-1. Lo contrario se observó con los vectores sBG-10 y sBG-9, donde las transcripciones de ARNv citoplasmático fueron ~ 2 veces más altas que los vectores análogos sBG-8 y sBG-7, que contenían el RRE. Dado que la diferencia en títulos entre vectores con y sin RRE fue de 2-3 órdenes de magnitud, RRE probablemente jugó un papel mínimo en el aumento de la exportación nuclear de transcripciones de ARNv a través de estos vectores.

45

Ejemplo 7

Los elementos *cis* del LV, incluyendo el RRE, mejoran el empaquetamiento

50 Después se determinó el efecto de las secuencias *cis* sobre la eficacia del empaquetamiento analizando los niveles de ARNv, p24 y la transcriptasa inversa (RT) viral asociada en partículas de virus purificadas de los diez vectores procesados de manera idéntica. La Figura 6A muestra un análisis representativo de transferencia de puntos de sBG1 a través de LV de sBG-10. La cantidad de ARNv detectado es proporcional al título del vector para la mayoría de los vectores, según lo determinado por el análisis de fosfo-imager, lo que indica un bloqueo en la eficacia de empaquetamiento en vectores que carecen de secuencias *cis* (Fig. 6B-C).

55 Hubo algunas excepciones que sugirieron que las secuencias *cis* pueden tener algún efecto en las etapas posteriores a la entrada de células objetivo: el ARN en las células 293T y los títulos infecciosos de sBG-2 y sBG-4 fueron

comparables, aunque el ARNv de sBG-4 fue 4 veces mayor. Parece que el ARNv de sBG-4, incluso cuando se empaqueta más eficazmente, puede no ser estable después de la entrada de la célula objetivo debido a la ausencia de *env* de SA, que se sabe que estabiliza el ARN. sBG-6 y sBG-7 tenían la misma cantidad de ARNv pero el título de sBG-7 fue 4-5 veces menor; aquí de nuevo sBG-7 no tenía la *env* de SA. sBG-5, que contiene la región inhibidora de *gag*, tenía un ARNv más alto, pero títulos más bajos.

En general, la cantidad de ARNv de BG empaquetada en partículas virales se correlacionó con la transducción/títulos infecciosos en las células diana, a pesar de los altos niveles de ARNm producidos en las células de empaquetamiento con los 10 vectores. La actividad de p24 fue similar en todas las preparaciones de virus concentrados (Fig. 6D), lo que sugiere que las partículas virales similares (que no contienen ARNv) se formaron eficazmente con todos los vectores.

Ejemplo 8

Tamaño, carga útil y título de γ RV y LV

Los títulos del LV estándar que portan BG son bajos para comenzar, y requieren una gran concentración. Sin embargo, los títulos caen precipitadamente (en tres órdenes de magnitud) con la eliminación de los elementos *cis del VI*. Quizás estas secuencias LV protegen el ARNv largo de la degradación en las células de empaquetamiento mientras promueven el ensamblaje, mientras que el ARNv corto de GFP se empaqueta eficazmente sin tales requisitos. El título bajo del BG LV 'desstripado' no proviene del ARN antisentido que surge del promotor del gen de la β -globina insertado en la orientación inversa con respecto al transcrito de ARNv LTR 5' en células 293T. No hubo transcripción antisentido en la transferencia Northern con ninguno de los vectores. Además, las transcripciones de β -globina son específicas de eritroides y no se producen en células 293T. Además, el casete FIG que era similar en tamaño a BG, pero en sentido de orientación también tuvo el mismo efecto en títulos que BG.

Ejemplo 9

Elementos *cis* y ciclo de vida del vector

Varios resultados únicos e inesperados surgieron de este estudio: (i) en células de empaquetamiento, se produjeron grandes cantidades de transcripciones con todo BG LV en contraste con ARN apenas detectable con BG γ RV. Una posibilidad es que las secuencias mínimas del VI (regiones R, U5 y) confieran estabilidad al ARNv de BG en compartimentos subcelulares específicos. Por lo tanto, se observan grandes cantidades de ARNv en las células 293T incluso del LV desstripado, una diferencia esencial del BG γ RV. (ii) BG ARNv tenía el tamaño esperado y se exportó eficazmente al citoplasma incluso en ausencia de Rev/RRE, lo que contradice la creencia de que el éxito de los 'genes de globina' en LV es secundario a las funciones arquetípicas de RRE de prevenir el empalme y exportación de ARNv. (iv) el ARNv se empaquetó eficazmente en viriones cuando el LV desstripado codificó un pequeño transgén tal como GFP. Estos datos confirman que las secuencias *cis del LV*, además de la secuencia de empaquetamiento mínima, son prescindibles para pequeños transgenes.

Ejemplo 10

Papel de RRE en el empaquetamiento

La interacción Rev/RRE fue más crítica para el empaquetamiento y la producción de virus de título alto, mientras que la función bien establecida de Rev/RRE en la exportación del ARNv genómico y la supresión del mensaje empalmado no fue prominente en BG LV. En el virus del VIH de tipo natural, se requiere la presencia de Rev/RRE a lo largo de toda la ruta de transporte y utilización de ARNm para la estabilización, la localización subcelular correcta y la traducción eficaz de ARNm que contiene RRE. Los datos presentados aquí confirman y amplían un estudio reciente que muestra que RRE tuvo un efecto menor en los niveles de ARNv citoplasmático, pero redujo los títulos virales aproximadamente 100 veces. Además, muestra que el requisito de Rev/RRE es específico para grandes transgenes, pero prescindible para casetes de expresión pequeños. A diferencia de un informe anterior en la literatura, la presente investigación no vio un papel de RRE en la estabilización de ARNv, ya que se observaron cantidades iguales o mayores de ARNv con vectores sin RRE. El mecanismo probable es la capacidad de RRE de participar en el ensamblaje y empaquetamiento viral.

Ejemplo 11

Papel de las secuencias *env* de SA y *gag*

Se ha demostrado que la presencia de *env* de SA estabiliza el genoma viral, lo que resulta en una mayor producción de virus. La presencia de SA también puede estabilizar el ARNv a un nivel posterior a la entrada, ya que algunos vectores sin el *env* de SA, en comparación con los vectores análogos con el *env* de SA, tenían el mismo ARN-v pero tenían una transducción/título más bajo en las células diana. La secuencia *gag*, con una mutación de codón de inicio para evitar la traducción de la proteína *gag*, ayuda a la producción de LV durante el empaque viral. En este estudio se determinó que este requisito era específico para casetes transgénicos grandes. También se demostró que la eliminación de una secuencia inhibidora presente entre 414 bp y 631 bp del gen *gag* que previamente se ha demostrado que disminuye la estabilidad de los ARN que contienen *gag*, aumentó los títulos en 3,5 veces.

En conclusión, esta investigación describe las etapas en el ciclo de vida viral afectado por las secuencias *cis* no codificantes cuando LV codifica casetes transgénicos grandes; y su dispensabilidad para transgenes más pequeños como GFP. Estos resultados proporcionan una nueva visión en el diseño vectorial LV. El LV destripado/mínimo podría diseñarse para pequeños transgenes terapéuticos, que serían menos recombinogénicos y más seguros en aplicaciones de terapia génica.

Ejemplo 12

Diseño vectorial virales

LV: para clonar el vector sSIN-GFP, se modificó el LTR 3' de una cadena principal SIN-LV estándar utilizado previamente para mejorar la terminación de la transcripción: se añadió la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento β inversa del LTR 3' y una secuencia USE derivada señal de poliadenilación tardía de SV40 se añadió en la delección de U3. El dsSIN-GFP se obtuvo eliminando el fragmento ClaI-NruI del plásmido sSIN-GFP. Se clonó un sitio de clonación múltiple (MCS-ClaI-Eco47III, XhoI, SmaI, Sall, EcoRI: CCATCGATAGCGCTCTCGAGCCCCGGGGTCGACGAATTCC) en los sitios ClaI y EcoRI de sSIN. El casete de β -globina-LCR (BG) se clonó en orientación inversa en los sitios XhoI y SmaI y esta construcción original se denominó sSIN-BG. Se obtuvo sBG-0 eliminando la región entre Eco47III y NruI, dejando solo la secuencia de empaquetamiento de VIH-1 (Ψ) siguiendo el LTR 5' de sSIN-BG. El cPPT se clonó en el sitio sBG-0 ClaI (sBG-1). Los fragmentos de PCR para RRE, RRE-env, *gag* corto (360 bp), *gag* largo (630 bp) se clonaron en el sitio romo XhoI, y estos vectores se denominaron sBG-2, sBG-3, sBG-10, sBG-9, respectivamente. Secuencias de cebadores, donde F denota cebadores directos y R denota cebadores inversos:

RRE_F: ATAAACCCGGGAGCAGTGGAATA;

RRE_R: ACATGATATCGCAAATGAGTTTCC;

ENV_R: ACATGATATCATACCGTCGAGATCC;

GAG_F: ACTGCTCTCGAGCAATGGGAAAAAATTCGGT;

GAG_1R: ACTGCTCTCGAGGCAGCTTCCTCATTGATG;

GAG_2R: ACTGCTCTCGAGATCAGCGGCCGCTTGCTGT.

Se insertó una mutación de cambio de marco en la secuencia 5' de *gag* en el codón de inicio para desactivar el sitio de inicio de *gag*, usando el cebador Gag F que inserta el dinucleótido CA en el *gag* ATG. Los vectores SBG-7 y SBG-8 se obtuvieron clonando fragmentos de PCR *gag* largo y *gag* corto en el sitio XhoI de SBG-2. Se realizó una mutación puntual para interrumpir el sitio SA en la secuencia *env* usando los cebadores MutSA_F (TATCGTTTCGAACCCACCTCC) y MutSA_R (GGAGGTGGGTTTCGAAACGATA) para generar sBG-4 (la secuencia CA wt SA dentro del fragmento *Env* fue mutada en CGA). Se obtuvo sBG-5 clonando el fragmento de PCR *gag* largo en el sitio XhoI de sBG-3. El PLÁSMIDO Γ RV: SRS11.SF Γ RV FUE PROPORCIONADO AMABLEMENTE POR LOS DRS. AXEL SCHAMBACH Y CHRISTOPHER BAUM, (HANNOVER, ALEMANIA). EN EL VECTOR SRS11.BG, LA B-GLOBINA-LCR HUMANA (BG), SE CLONÓ EN ORIENTACIÓN INVERSA EN EL SITIO PstI DEL PLÁSMIDO DEL VECTOR RETROVIRAL SRS11.SF. TODOS LOS DIBUJOS ANIMADOS DE VECTORES SE REPRESENTAN EN LA FIGURA 2.

Ejemplo 13

Producción de virus

El LV se produjo por co-transfección transitoria de células 293T, como se describió previamente usando los plásmidos del vector, el empaquetado ($\Delta 8.9$) y los plásmidos de la envoltura (VSV-G); El sobrenadante que contiene el virus se recogió a las 60 horas después de la transfección y se concentró por ultracentrifugación. Todos los vectores en un experimento se empaquetaron simultáneamente y el virus se concentró 1400 veces de todos los sobrenadantes virales por ultracentrifugación a 25.000 rpm. Los títulos virales se determinaron infectando células de eritroleucemia de ratón (MEL) o células HT1080 con dilución en serie de virus concentrado, diferenciándolas y analizándolas para determinar la expresión de HbA o GFP mediante un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) como se describió anteriormente. y RV se produjeron de manera similar pero no concentrada. Todas las transfecciones y la valoración posterior se realizaron por triplicado. El empaquetamiento de los vectores, con y sin Rev, se realizó siguiendo un método similar, excepto que el plásmido de empaquetamiento $\Delta 8.9$ se reemplazó con pMDLg/pRRE y pRSV-Rev. La relación del plásmido vector: pM-DLg/pRRE: pRSV-Rev: VSV-G fue 4:4:3:1.

Ejemplo 14

Líneas celulares

La línea de células de eritroleucemia murina (MEL) y las células 293T se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Mediatech, Inc., Herndon, VA) suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10% (US Biotechnologies, Inc, Parker Ford, PENNSILVANIA). Se indujo a las células MEL a diferenciarse en DMEM

que contenía FBS al 20% y 5 mM de N, N'-hexametilen bisacetamida (Sigma), como se describió previamente en la técnica.

Ejemplo 15

Tinción de HbA y análisis FACS

5 La metodología utilizada para etiquetar la β -globina humana usando el anticuerpo anti-HbA humano fue como se describió previamente. Brevemente, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (BPS) y el sedimento se resuspendió en metanol al 100% durante 5 minutos. Las células fijadas se lavaron después con BPS, y se bloqueó la unión de anticuerpos inespecíficos (Ab) usando leche en polvo sin grasa al 5% durante 10 minutos a temperatura ambiente. 10 Posteriormente, las células se lavaron en BPS, se granularon y se permeabilizaron. Las células se dividieron en 2 tubos y se tiñeron con isotiocianato de anti-zeta globina-fluoresceína (FITC) Ab ($1 \mu\text{g}/10^6$ células) como control negativo o con anti-HbA-FITC Ab ($0,1 \mu\text{g}/10^6$ células) (Perkin Elmer, Waltham, MA) durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El Ab sin unir se eliminó mediante un lavado final con BPS antes de analizarlos en FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

Ejemplo 16

Transferencia Northern total y ARN citoplasmática

Las células 293T se cultivaron y se lavaron en BPS 72 horas después de la transfección. El aislamiento del ARN nuclear y citoplasmático se obtiene con una incubación de 7 minutos en hielo con tampón NEB (Tris-HCl 10Mm pH 7,4; NaCl 10mM, MgCl₂ 3mM; IGEPAL al 5%). Después de la centrifugación, se añadió ARN-STAT (Tel-Test, INC, Texas) al sobrenadante que contiene ARN citoplasmático, y se procedió a la extracción de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se extrajo de células 293T usando ARN-STAT. La transferencia de Northern se realizó según el protocolo estándar. La transferencia se hibridó con una sonda β -globina marcada con ³²P. Para normalizar la carga de ARN, las membranas fueron despojadas y re-sondaron con una sonda 18S marcada con ³²P. 20 Para probar la pureza de las membranas de ARN citoplasmático, se despojaron y se volvieron a probar con una sonda marcada con ³²P específica para la sonda de intrón GAPDH que no detectó transcripción intrónica en la preparación citoplasmática. 25

Ejemplo 17

Transferencia Southern genómica

El ADN genómico se realizó en ADN aislado de células MEL transducidas y se digirieron 10 μg de ADN genómico con la enzima AflII y se realizó la transferencia Southern según el protocolo estándar. La transferencia se hibridó con un fragmento HS2 de la sonda LCR de β -globina. Se extrajo ARNb de transferencia de puntos de ARNm de los mismos volúmenes de virus concentrados utilizando el Mini Kit de ARNv de QIAamp (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el virus se lisó en condiciones altamente desnaturalizantes y después se unió a una membrana a base de gel de sílice. los contaminantes se lavaron eficazmente en dos etapas de lavado y el ARNv se eluyó en 30 μl de DEPC-agua. Después de la elución, el ARNv se trató durante 20 minutos a temperatura ambiente con ADNsa I, la ADNsa I de grado de amplificación (Invitrogen, Carlsbad, CA) se inactivó incubando la muestra a 65°. El ARNv se desnaturalizó después en 3 vol de tampón de desnaturalización (65% de formamida, 8% de formaldehído, MOPS IX) durante 15 minutos a 65°. Después de la desnaturalización se añadieron 2 vol. de 20X SSC enfriados con hielo y el ARN se unió a una membrana de nylon por aspiración a través de un aparato de transferencia de puntos. La transferencia se hibridó con una sonda específica de β -globina marcada con ³²P y se expuso a una película de rayos X durante la noche. 30 35 40

Ejemplo 18

Aisladores de cromatina - generalmente

Los aisladores de cromatina separan los dominios transcripcionales activos y bloquean la propagación de la heterocromatina en el genoma. Los estudios sobre el elemento del sitio 4 hipersensible de pollo (cHS4), un aislador prototípico, han identificado motivos CTCF y USF-1/2 en los 250 bp proximales de cHS4, denominados "núcleo", que proporcionan actividad de bloqueo potenciador y reducen los efectos de posición. Sin embargo, el núcleo por sí solo no aísla eficazmente los vectores virales. El cHS4 de longitud completa tiene excelentes propiedades aislantes, pero su gran tamaño compromete severamente los títulos de los vectores. Se realizó un análisis de estructura-función de los vectores lentivirus flanqueantes de cHS4 y se analizó la expresión transgénica en la progenie clonal de células madre hematopoyéticas y se analizaron los cambios epigénicos en cHS4 y el promotor transgénico. El núcleo solo redujo la variedad clonal en la expresión. La actividad única del aislador residía en las secuencias distales de cHS4 de 400 bp, que cuando se combinaban con el núcleo, restauraban la actividad completa del aislador y abrían marcas de cromatina sobre el promotor transgénico y el aislador. Estos datos consolidan la actividad del aislador conocida del núcleo 5' canónico con un nuevo elemento 3' 400 bp con propiedades similares al núcleo. Juntos, tienen excelentes propiedades aislantes y títulos virales. Estos datos tienen implicaciones importantes con respecto a la comprensión 45 50 55

de la base molecular de la función del aislador y el diseño vectorial de terapia génica.

Ejemplo 19

Construcciones vectoriales y diseño experimental

5 Los vectores de lentivirus auto-inactivadores fueron diseñados para incorporar el "núcleo" de 5' 250 bp (sBGC), dos repeticiones en tándem del núcleo (sBG2C), 5' 400 bp (sBG400), 5' 800 bp (sBG800) o el aislador (sBG-I) 1,2 Kb de longitud completa. Todos los vectores portaban el gen y el promotor de la β -globina humana y el potenciador de la región de control de locus. Los diferentes fragmentos de aislador se clonaron en la orientación hacia adelante en la región U3 de 3' LTR, de modo que, tras la transcripción inversa, el provirus integrado en las células objetivo tiene el LTR 3' aislado copiado en el LTR 5', y flanquea la expresión de $\text{h}\beta$ -globina casete en ambos extremos. Para evaluar si los elementos fuera del núcleo de 5' 250 bp simplemente proporcionaban un andamiaje espacial, también se probaron vectores con espaciadores de ADN inerte inversa del núcleo, sBG400S y sBG800S. Todos los vectores se compararon con el control no aislado, sBG (Figura 7A).

15 Primero, las células MEL se infectaron con cada uno de los vectores lentivirus y se identificaron clones MEL integrantes individuales (Figura 7B). Todos los análisis se realizaron solo en clones MEL de copia única que portaban $\text{h}\beta$ -globina y se verificó que tenían secuencias de aislador intactas por PCR, y se sometieron a qPCR para el número de copias del vector; La expresión de $\text{h}\beta$ -globina se analizó mediante FACS: 1) el porcentaje de células que expresan $\text{h}\beta$ -globina (% de células $\text{h}\beta^+$) se usó para determinar los efectos de posición cromosómica, y 2) la variación de la expresión de la expresión de $\text{h}\beta$ -globina en células dentro de un clon, según lo determinado por el coeficiente de variación (CV), se utilizó para determinar la variedad clonal en la expresión (Figura 7C). El análisis de ChIP se realizó en las histonas sobre las regiones aislantes y el promotor del gen $\text{h}\beta$ -globina en los diferentes provirus para estudiar las modificaciones epigenéticas. Los efectos de la posición de la cromatina de estos vectores se confirmaron in vivo, en RBC de ratones con talasemia Hbbth3/+ trasplantados con HSC transducidas con vector 24 semanas después del trasplante. Después se realizaron trasplantes secundarios y se analizaron las CFU-S de un solo integrante después de los trasplantes para determinar la proteína $\text{h}\beta$ -globina y el ARNm. En ratones, el análisis hematológico y la HPLC para la proteína $\text{h}\beta$ -globina se realizaron adicionalmente para cuantificar la expresión.

Ejemplo 20

Regiones de cHS4 necesarias para proteger de los efectos de posición de la cromatina

30 Según los resultados anteriores, un porcentaje muy alto de células $\text{h}\beta^+$ estaba presente en los clones sBG-I de un solo integrante en comparación con los clones de control sBG ($P < 0,01$); el % de células $\text{h}\beta^+$ en los clones sBGC, sBG2C, sBG400 y sBG800 no fueron significativamente diferentes de los clones de control sBG (Figura 8A) Para garantizar que la presencia de cHS4 en el LTR no sesgaba la integración, y que el análisis era realizado en distintos clones, mediante LM PCR y secuenciación del sitio de integración en diez clones sBG o sBG-I MEL seleccionados al azar. Las inserciones ocurrieron cerca/en genes distintos entre clones aislados y no aislados, sin sesgo aparente. La presencia del núcleo de cHS4 (sBGC), o secuencias extendidas del aislador inverso del núcleo, hasta 800 bp, no aumentó aún más el % de células $\text{h}\beta^+$; tampoco lo hicieron las repeticiones en tándem de la secuencia central, a pesar de que esta última ha demostrado conferir un efecto de bloqueo potenciador en sistemas basados en plásmidos.

40 Otro fenómeno visto con la expresión transgénica es la variedad clonal, definida como niveles variables de expresión en células hijas con el mismo sitio de integración. Una forma cuantitativa de determinar la variedad clonal es mediante el análisis FACS de clones transducidos y el cálculo del coeficiente de variación (CV) de expresión del transgén alrededor de la expresión promedio del transgén en el clon. El CV es una medida de variabilidad sin unidades calculada como la relación entre la desviación estándar de la muestra (DE) y el promedio de la muestra. Se observó un alto CV en los clones sBG no aislados (Figura 2B). El CV se redujo significativamente en todos los vectores que contenían el núcleo de 5' 250 bp. Estos resultados se confirmaron en clones derivados de vectores que portaban espaciadores de ADN inertes inversos al núcleo: sBG400S y sBG800S, lo que demuestra que la reducción de CV era específica del núcleo del aislador, y en contraste con los datos sobre el % de células $\text{h}\beta^+$, que requirió que el aislante de longitud completa estuviera presente.

50 Fue notable que la PCR para secuencias de aisladores mostró ausencia de las secuencias de aisladores solo en provirus sBG2C, con 6 de 24 clones (25%) de clones MEL que tenían ambas copias del núcleo eliminadas de ambos LTR. No se observó delección de las secuencias aislantes en los clones de todos los demás vectores. El análisis de transferencia Southern de los grupos MEL de sBG2C confirmó la delección de una/ambas copias del núcleo en la mayoría de las células. La transcripción inversa de secuencias repetidas, que se sabe que producen eventos de recombinación en vectores retrovirales, probablemente causó una transmisión inestable del vector con secuencias centrales repetidas. Este efecto del núcleo frente al cHS4 de longitud completa se confirmó in vivo, en ratones con talasemia. Se analizaron los RBC de sangre periférica para determinar la expresión de $\text{h}\beta$ -globina 6 meses después del trasplante. El análisis FACS en los RBC de los grupos de ratones sBG, sBGC, sBG2C, sBG400 y sBG-I (los gráficos representativos que se muestran en la Figura 9A) muestran que el % de RBC $\text{h}\beta^+$ fue significativamente mayor solo en el grupo de ratones sBG-I, en comparación con sBG grupo de ratones, como los datos en las células MEL; y el CV fue significativamente menor en todos los vectores que portaban el núcleo ($P < 0,01$; Figura 9B-C).

Tomados en conjunto, estos datos indican que se requiere el cHS4 de longitud completa para proteger contra los efectos de la posición cromosómica.

Ejemplo 21

Efectos de la posición de la cromatina en la progenie clonal de HSC murino después de trasplantes secundarios

5 Los efectos de la posición de la cromatina se confirmaron a continuación en una sola copia secundaria de CFU-S. El ensayo de unidades formadoras de colonias secundarias de bazo (CFU-S) se considera el ensayo más estricto que es un 'estándar de oro' para estudiar los efectos epigénicos de los elementos aislantes de cromatina en células derivadas de células madre hematopoyéticas. Notablemente, no se observaron mediante FACS CFU-S transducidos que fueron positivos mediante PCR para secuencias específicas de vectores que no expresaban h β -globina, lo que es consistente con los resultados informados sobre la falta de silenciamiento transgénico con vectores de lentiviral SIN específicos de eritroides. El análisis FACS para (1) % de células h β + y (2) eritroblastos positivos para TER-119 no mostró diferencias en el porcentaje de células TER-119+ entre los diferentes grupos de vectores (no se muestra). Sin embargo, un porcentaje significativamente mayor de células h β + solo estaba presente en CFU-S secundario con el vector sBG-I. Nuevamente, el CV fue significativamente menor en CFU-S transducido con todos los vectores que portan el núcleo, en comparación con sBG transducido CFU-S no aislado (Figura 3D-E). El análisis de RT-PCR en tiempo real en seis CFU-S seleccionados al azar de cada grupo de ratones mostró que, en comparación con el vector sBG, la expresión de ARNm a partir del CFU-S de sBG-I fue aproximadamente 2 veces mayor. Sin embargo, la expresión de CFU-S transducida de sBGC, sBG2C y sBG400 no fue significativamente diferente de la CFU-S de sBG. Tomados en conjunto, estos datos indican que las secuencias centrales de 5' 250 bp en sBGC, sBG400, sBG400S, sBG800 y sBG800S redujeron específicamente la variedad clonal de la expresión de h β -globina. Sin embargo, se requirió el elemento cHS4 de longitud completa para mejorar la probabilidad de expresión de diferentes eventos de integración.

Ejemplo 22

25 Patrones de acetilación y metilación de histonas en la región central y la región promotora de p-globina en vectores aislados

A continuación, las modificaciones epigenéticas que acompañan a los efectos específicos observados con las diversas regiones aislantes se determinaron comparando los niveles relativos de las marcas de histona activa acH3, acH4 y H3K4me2 y las marcas de histona represiva H3K9me3 y H3K27me3 entre diferentes provirus en clones MEL. El análisis de chips se realizó en el núcleo de cHS4 en tres clones representativos que se agruparon para cada vector (los clones elegidos se muestran como círculos rellenos en la Figura 8A) mediante PCR semicuantitativa (Figura 10B-C) y PCR en tiempo real (Figura 10D-F). Los clones que llevan los integrantes del vector sBG-I mostraron un enriquecimiento de aproximadamente 6 veces las marcas de cromatina activa y disminuyeron las marcas de cromatina represiva sobre el fragmento "núcleo" de cHS4, en comparación con sBGC, sBG400 y sBG800, tres vectores que portaban el "núcleo".

35 Las modificaciones de histona se analizaron sobre el promotor de h β -globina en el vector no aislado (sBG) y todos los demás vectores, que portaban el "núcleo", para evaluar si las diferencias en los patrones de histona sobre el promotor transgénico en vectores pueden haber contribuido a la reducción de la variedad clonal. Hubo una reducción pequeña pero significativa en los patrones de cromatina represiva H3K27me3 con los provirus sBGC, sBG400 y sBG800, en comparación con el provirus sBG no aislado (Figura 10F, panel derecho). Sin embargo, con el provirus sBG-I, donde estaba presente la actividad máxima del aislante, la región promotora de la h β -globina había reducido notablemente los patrones de cromatina represiva.

45 Estos datos muestran que las secuencias "centrales" y la extensión del núcleo hasta los 5' 800 bp de cHS4 redujeron las marcas de activación sobre el promotor transgénico en pequeña medida. Sin embargo, una reducción importante en las modificaciones de histonas reprimidas sobre cHS4 y la región promotora del transgén solo se produjo cuando las secuencias distales 3' 400 bp de cHS4 estaban además presentes.

Ejemplo 23

Parámetros hematológicos en ratones con talasemia trasplantados con HSC transducidos con vectores no aislados y aislados

50 La anemia, la reticulocitosis y otros índices de RBC mejoraron incluso con el vector sBG (Figura 11A), según los informes publicados con vectores de lentivirus de h β -globina no aislados. La hemoglobina de los ratones trasplantados control fue de $7,7 \pm 0,2$ gm/dL y el grupo de ratones sBG fue de $10,4 \pm 0,7$, con 1,2 copias de vectores por célula. Cabe destacar que el grupo de ratones sBG-I tenía una hemoglobina más alta y el recuento de reticulocitos más bajo, a pesar de tener la mitad de las copias de vectores por célula en comparación con el grupo de ratones sBG (hemoglobina $11 \pm 0,2$ gm/dL; 0,6 copias de vectores por célula). Cuando se normaliza la eficacia de transducción, esto equivale a un aumento de 5,2 gm en la hemoglobina por copia de vector en ratones sBG-I sobre ratones control, en contraste con un aumento de 2,3 gm en la hemoglobina por copia de vector en los ratones sBG. Los parámetros de RBC de los ratones experimentales mostraron una mejora significativa (Figura 11A; tenga en cuenta que estos

datos no están normalizados para el número de copias de vectores). La mejora en estos índices fue mayor con los ratones sBG-I, aunque no significativamente diferente a menos que se normalice para la copia del vector.

5 El análisis mediante HPLC para la proteína h β -globina en sangre confirmó una expresión significativamente mayor de h β -globina solo en los ratones sBG-I: el $43 \pm 3\%$ de la hemoglobina total en los glóbulos rojos se obtuvo de la h β -globina (h β 2m α 2) en ratones sBG-I en comparación a $19 \pm 6\%$ en los ratones sBG, mientras que en el grupo de ratones sBGC, sBG400 y sBG2C no fue significativamente diferente del control (Figura 11B). La expresión de h β -globina humana y los parámetros hematológicos en el grupo de ratones sBG2C fueron similares a los observados en el grupo de control no aislado.

Ejemplo 24

10 Actividad del aislador en la región 3'400 de cHS4

Dado que los 5' 800 bp de cHS4 solo redujeron el CV, mientras que la actividad completa del aislador se restableció con el aislador de 1,2 Kb de longitud completa. Se generó un vector que portaba solo la región distal/3' 400 bp de los clones MEL derivados de cHS4 (sBG3'400) y los ratones se trasplantaron con células LSK transducidas con sBG3'400. Tenga en cuenta que, a diferencia de los vectores descritos anteriormente, este vector no contiene las secuencias de "núcleo" de 5'250 bp (Figura 12A). El vector sBG3'400 no tuvo efecto sobre el % de células h β + en clones MEL o el % de RBC h β + en ratones (Figura 6B, D), un efecto comparable a los clones sBG, o aquellos que portan el "núcleo" de 5' 250 bp (sBGC). Sin embargo, como todos los vectores que llevan el núcleo 5', sBG3'400 redujo significativamente el CV de la expresión de h β -globina en clones MEL y en RBC (Figura 12C, E).

20 La cantidad de proteína h β -globina en los ratones sBG3'400, determinada mediante análisis HPLC, no fue significativamente diferente de la sBG ($17,5 \pm 3\%$ versus $19,5 \pm 5,6\%$), pero fue al menos 2 veces menor que la observada en el ratón-sBG-I ($43 \pm 3\%$; $P < 0,01$) (Figura 12F). En general, la 3' 400 bp de cHS4 tuvo una actividad muy similar al núcleo de 5' 250 bp (Figura 9): redujo la variedad clonal, reflejada en un CV reducido de la expresión de h β -globina en clones MEL y en RBC, pero no tuvo efecto sobre la parte de h β -globina que expresa los glóbulos rojos. Se confirmaron los efectos "similares al núcleo" de la 3' 400 bp en una única copia secundaria de CFU-S secundaria (Figura 12G-H), con resultados similares a los del vector sBGC (Figura 9D-E). La región 3' 400 no tiene secuencias de consenso conocidas para CTCF o USF-1, y esta región no ha sido analizada previamente. Cabe señalar que ni el núcleo 5' ni la 3' 400 bp, cuando están presentes solos, fueron capaces de mejorar la probabilidad de expresión de integrantes/proteger de los efectos de posición.

Ejemplo 25

30 Actividad del aislador del "núcleo" 5' combinado con la 3' 400 bp

Cuando se combinaron el núcleo de 5' 250 bp y las secuencias de 3' 400 bp del aislador cHS4 (vector sBG650; Figura 13A), este vector se comportó de manera similar al vector sBG-I - en clones MEL, en RBCs de ratones trasplantados y en CFU-S secundaria. La proporción de células que expresan h β -globina en clones sBG650 MEL y RBC (Figura 13B-D) fue significativamente mayor en comparación con los clones sBG ($P < 0.001$), y fue similar a los clones sBG-I. Asimismo, el CV de los clones sBG650 fue comparable a los clones sBG-I (Figura 13C). La expresión de h β -globina en el RBC de ratones primarios fue comparable a la de los ratones sBG-I (Figura 13D). La cantidad de proteína h β -globina en los ratones sBG650, determinada mediante análisis HPLC, no fue significativamente diferente de los ratones sBG-I ($41 \pm 2,6\%$ versus $43 \pm 3\%$, respectivamente), pero fue al menos 2 veces mayor que eso visto en los ratones sBG ($19 \pm 6\%$; $P < 0,01$). Cinco meses después del trasplante, se realizaron trasplantes secundarios para generar CFU-S, lo que confirmó que el vector sBG650 restableció una actividad aislante similar a la observada con el vector sBG-I (Figura 13E). La configuración de cromatina sobre el núcleo en los provirus sBG650 (Figura 13F) mostró la restauración de los patrones de cromatina abiertos tanto sobre el núcleo del aislador como sobre el promotor de la β -globina, idénticos a los observados en los provirus sBG-I (Figura 10).

Ejemplo 26

45 Modificaciones epigenéticas en la región de 3'400 bp de cHS4 y su interacción con el núcleo

La configuración de cromatina de la parte distal de 3' 400 bp de cHS4 no se ha estudiado previamente. Los patrones de histonas se analizaron primero sobre la región 3' 400 bp (sBG3'400) cuando estaban presentes solos (sBG3'400), o cuando se combinaron con el núcleo 5' (en sBG650 y sBG-I) (Figura 14). Los patrones de acetilación y metilación de las histonas en la región 3'400 del provirus sBG3'400 (Figura 14B) fueron similares a los observados en la región central de 250 bp en el provirus sBGC (Figura 10). Sin embargo, en los provirus sBG650 y sBG-I, las secuencias de 3' 400 bp tuvieron marcas de acetilación aumentadas y represión reducida, lo que demuestra una vez más que la combinación de los extremos proximal y distal de cHS4 es necesaria para los patrones de cromatina abierta. Este efecto era una reminiscencia del análisis de ChIP sobre la región central 5' o la región promotora de β -globina en sBG-I (Figura 10D y F) o sBG650 (Figura 13F y G). Tomados en conjunto, el análisis génico y epigénico indicó que los extremos 5' y 3' del aislante funcionaban como dos núcleos, que interactuaban para modificaciones epigenéticas de la cromatina en el aislador y el promotor, para impartir una actividad aislante adecuada.

La región 3' 400 bp, sin embargo, no tiene motivos conocidos de CTCF o USF-1, que hayan demostrado impartir bloqueo potenciador y actividad de barrera, respectivamente, a cHS4. Es concebible; sin embargo, que CTCF y/o USF-1 tal vez puedan ser reclutados para la región 3'400. Usando anticuerpos contra USF-1 y CTCF, la cromatina se inmunoprecipitó a partir de los provirus sBGC, sBG3'400, sBG650 y sBG-I de clones MEL. El análisis de ChIP se realizó mediante PCR semicuantitativa y qPCR. Cuando se usaron cebadores en la región central para amplificar los productos ChIP, fue evidente el reclutamiento de CTCF y USF-1 en la región central 5' (Figura 14C-D), como se anticipó y se mostró anteriormente. Curiosamente, cuando se usaron cebadores de la región 3'400 para amplificar los productos ChIP, el provirus sBG3'400 mostró enriquecimiento en CTCF, aunque a niveles algo más bajos que los observados en la región central. Más notablemente, sin embargo, los provirus sBG650 y sBG-I mostraron enriquecimiento tanto USF-1 en la región 3' 400 bp, un efecto visto cuando tanto el núcleo proximal como las secuencias distales de 400 bp estaban presentes. La región 3' 400 bp, cuando estaba presente sola en sBG3'400, no se unía al USF-1 (Figura 14E-F). Estos datos indican que la región 3' 400 bp interactúa con CTCF a pesar de la falta del consenso de CCCTC, lo que puede explicar la actividad "similar al núcleo" en esta región y la interacción entre la región central 5' y la región 3' 400 de la región del aislador cHS4 (en sBG-I o sBG650) probablemente se produce a través de USF-1.

Ejemplo 27

Títulos vectoriales con el aislador cHS4 de 650 bp

El cHS4 de 1,2 Kb reduce notablemente los títulos de los vectores de lentiviral SIN, limitando la producción de virus a gran escala para ensayos en humanos. Recientemente se ha demostrado que el mecanismo de reducción de títulos se debe específicamente a la longitud del inserto en el LTR 3'. En comparación con sBG, sBG650 tenía títulos muy razonables que eran solo $2,5 \pm 0,9$ veces más bajos que sBG, en contraste con títulos de sBG-I $10,4 \pm 2$ veces más bajos ($n = 3$). Por lo tanto, este aislador optimizado puede usarse para el diseño vectorial de terapia génica más seguros que proporcionarían una expresión uniforme y, por lo tanto, más alta y serían escalables a la producción a gran escala.

Nosotros y otros hemos demostrado previamente que el aislador cHS4 de longitud completa protege los vectores virales contra los efectos de la posición cromosómica. Sin embargo, los profundos efectos perjudiciales sobre los títulos virales han impedido su utilidad. Los intentos de usar solo los 5' 250 bp de cHS4, caracterizado por ser el núcleo del aislador, han fallado en los vectores virales a pesar de la actividad significativa del núcleo en los sistemas basados en plásmidos, y la pérdida de la actividad del aislador con mutaciones en estas regiones.

Se ha demostrado que las regiones que rodean el aislador cHS4 y el promotor de la β -globina tienen marcas constitutivamente más altas de cromatina activa en la ubicación nativa. El cHS4 previene la propagación de heterocromatina al dominio de β -globina, incluso cuando los dominios de heterocromatina adyacentes tienen altas marcas represivas de histona, H3K9me3 y H3K27me3. Los clones que portaban los integrantes del vector sBG-I mostraron un enriquecimiento de las marcas de cromatina activas y una notable disminución de las marcas de cromatina represivas sobre el núcleo de cHS4 en comparación con los vectores sBGC, sBG400 y sBG800, donde no se observaron diferencias significativas en estas marcas epigenéticas.

Mecánicamente, se ha demostrado que el elemento USF-1/2 en el aislador recluta enzimas modificadoras de histonas en el núcleo e interactúa con la histona lisina metil transferasa SET7/9 y el factor asociado a la proteína de unión a p300/CREB (PCAF), aumentando así marcas de cromatina activa. Sin embargo, no se observó tal aumento en acH3, acH4 y H3K4me2 sobre el núcleo o los 3' 400 bp cuando flanquearon el transgén en los vectores sBGC, sBG400, sBG800 y sBG3'400. Este efecto requería que el vector llevara el cHS4 de longitud completa (sBG-I, Figura 10 y 14) o el vector sBG650 combinado de núcleo y 3'400 bp (Figura 13 y 14). El análisis de ChIP sobre el promotor de β -globina mostró que, en comparación con un vector no aislado, el núcleo solo redujo las marcas de cromatina represiva sobre el promotor en cierta medida (Figura 10F), lo que puede explicar la reducción en CV de los vectores que portan el núcleo. Sin embargo, el núcleo dependía de la región de 3' 400 bp y, por el contrario, la región de 3' 400 bp dependía del núcleo para el alto grado de acetilación de histonas y estaba ausente de marcas represivas mínimas en ambas regiones.

Los modelos propuestos para explicar el efecto de cHS4 sobre la cromatina circundante incluyen la protección contra el silenciamiento transgénico mediante la exclusión de proteínas de unión a metil-CpG; de hecho, se ha demostrado que cHS4 bloquea el silenciamiento por vectores retrovirales. No se observó la extinción de la expresión de β -globina a lo largo del tiempo, incluso con el vector no aislado en ratones, o los clones MEL mantenidos hasta 6 meses en cultivo (datos no mostrados) Esto puede deberse a varios elementos USF-1 en los sitios hipersensibles de LCR de β -globina, que han demostrado interactuar con los elementos de la caja E ubicados en HS2 y en el promotor del gen de la β -globina. Es concebible que esta resistencia al silenciamiento conferida por el LCR pueda anular cualquier actividad observada con el núcleo de cHS4. Estos resultados contrastan con los de Panell et al. de que los retrovirus, incluidos los derivados del VIH-1, silencian predominantemente un gen indicador de beta-globina de la región de control de locus (LCR) en ratones transgénicos. Se analizó la metilación y posteriormente se informó que había una falta de metilación y extinción de CpG en la expresión con vectores de lentiviral SIN específicos para eritroides in vivo, en receptores primarios y secundarios. Estos datos sugieren que en los vectores eritroides, que de otro modo resisten el silenciamiento mediante la metilación del promotor, el cHS4 de longitud completa pudo modificar los patrones de

histona sobre el promotor transgénico y sobre sí mismo para reducir los efectos de posición.

Curiosamente, el análisis *in silico* de la región 3' 400 bp no reveló sitios de unión a CTCF o USF1, sino sitios para múltiples factores de transcripción conocidos. Cualquiera de estos factores de transcripción, o tal vez una proteína nueva, puede ser el socio que interactúa con el CTCF y/o USF-1. CTCF regula directamente el equilibrio entre las marcas de cromatina activas y represivas mediante la unión al complejo de cohesina. Estos datos revelan que la región 3' 400 bp también puede interactuar con CTCF: aunque la co-inmunoprecipitación de 3'400 bp y CTCF del provirus sBG3'400 (Figura 14C-F) no tuvo éxito.

Curiosamente, los 3'400 bp co-inmunoprecipitaron con el anticuerpo USF-1 solo cuando las secuencias del núcleo 5' también estaban presentes, lo que sugiere que el USF-1 probablemente forma un puente entre el extremo 5' y 3' del cHS4 para reducir los efectos de posición. Sería importante determinar si los elementos dentro de 3' 400 bp reclutan acetilasas de histonas que se unen a USF-1 o complejos de cohesina y/o nucleofosfina para afectar los efectos de posición.

En última instancia, se realizó un análisis génico y epigénico sistemático de la actividad del aislador del cHS4 *in vitro* e *in vivo* y se identificó una nueva actividad "similar a un núcleo" en los 3' 400 bp. Sin embargo, el 3' 400 bp de cHS4, que no contiene sitios de consenso para USF o CTCF, se une a CTCF, mientras que USF-1 parece unir y unir el núcleo 5' y los 3' 400 bp de cHS4. Los nuevos sistemas de vectores flanqueados por la secuencia optimizada de '650 bp' de cHS4, pueden proporcionar un excelente aislamiento del transgén sin pérdida significativa en los títulos virales y tienen importantes implicaciones de seguridad y eficacia para la terapia génica.

Ejemplo 28

Materiales y métodos - vectores lentivirales

Todos los vectores se obtuvieron clonando los diferentes fragmentos de aisladores en sitios NheI/EcoRV en la región U3 de LTR 3' del plásmido lentiviral, como se describe. Este plásmido portaba el gen de la β -globina humana (h) y sus elementos reguladores (BG). Todos los fragmentos de aislador se amplificaron por PCR usando el plásmido aislante pJCl3-1 (proporcionado amablemente por el Dr. Gary Felsenfeld, NIH, MD) y se verificaron mediante secuenciación, como se describe. La clonación del vector h β -globina con y sin el aislante cHS4 de 1,2 kb se ha descrito anteriormente. El vector sBG1C se clonó insertando el producto de PCR del aislador del núcleo EcoRI/XbaI 250 bp en sBG en los sitios de restricción BamHI/EcoRI del plásmido bpS. Después se añadió una segunda copia del núcleo de 250 bp en el plásmido bpS de 1 núcleo en los sitios EcoRI/KpnI, obteniendo así el plásmido bpS de 2 núcleos. Las dos copias en tándem del núcleo de 250 bp se aislaron después digiriendo el plásmido bpS-2núcleo con KpnI/XbaI, y después se clonaron en el vector sBG, obteniendo sBG2C. Los vectores sBG400 y sBG800 se obtuvieron clonando los 2 productos de PCR en los sitios sBG NheI/EcoRV. Los vectores que contienen espaciadores de ADN se obtuvieron amplificando diferentes tamaños de ADN de fago λ usando las siguientes combinaciones de cebadores: espaciadorF1 y espaciadorR1, espaciadorF1 y espaciadorR2, amplificando el ADN λ de 150 bp, 550 bp, respectivamente. Los fragmentos de PCR digeridos con ClaI/EcoRI se unieron en sitios EcoRI/ClaI en el plásmido central bpS-1, y los fragmentos de 400 bp y 800 bp del plásmido central bpS-1 se restringieron con HincII/XbaI y XbaI/XhoI, respectivamente, y se clonaron en sitios NheI/EcoRV de sBG. El virus se produjo por cotransfección transitoria de células 293T y se tituló en células MEL.

Ejemplo 29

Materiales y métodos - líneas celulares

Las células MEL y las células 293T se mantuvieron en DMEM (Mediatech, Inc) suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (FBS; US Bio-technologies, Inc.) y se diferenciaron como se describe. Las células MEL se transdujeron para lograr menos del 5% de eficacia de transducción para cada uno de los vectores probados y clonados. Aproximadamente 400 clones, derivados de tres transducciones independientes de cada vector, se seleccionaron por PCR para el gen de la h β -globina; Se seleccionaron clones positivos para una región de aislador intacta. Los clones así identificados se sometieron a qPCR para integrar los individuales, expandidos y criopreservados. Un conjunto completo de clones fue descongelado, diferenciado y analizado simultáneamente mediante FACS.

Ejemplo 30

Materiales y métodos: transducción y trasplantes de células madre hematopoyéticas murinas

Se usaron ratones de talasemia Hbbth3/+ para trasplantes. Todos los estudios en animales se realizaron utilizando protocolos aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales. El enriquecimiento de las células madre/progenitoras hematopoyéticas de linaje-Sca-1 + c-kit + (LSK) se realizó en la suspensión de células individuales de la médula ósea mediante separación inmunomagnética y clasificación FACS (detalles en Materiales y Métodos suplementarios S1) Las células LSK se transdujeron en Stem Span (Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, BC) con sobrenadantes de vectores concentrados a una MOI de 10, dos veces a intervalos de 12 h como se describió anteriormente. Se trasplantaron 10.000 células LSK transducidas con células 2x10⁵ LK en receptores de talasemia irradiados con 10,75Gy. Ensayo de CFU-S: se diseccionaron unidades formadoras de colonias de bazo discretas

(CFU-S) el día 12 después del trasplante de células de médula ósea de ratones primarios 24 semanas después del trasplante, como se describió anteriormente.

Ejemplo 31

Materiales y métodos - Análisis para la expresión de h β -globina

5 Se realizaron recuentos sanguíneos completos en un Hemavet (Drew Scientific, Inc, Oxford, CT, EE. UU.). El recuento de reticulocitos se analizó tiñendo 1 μ l de sangre completa con 200 μ l de reactivo Retic-COUNT (BD Biosciences, CA) y se enumeró en el FACSCalibur (BD). El análisis cuantitativo de la proteína h β -globina en RBC se realizó en hemolizados de sangre mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), como se describió anteriormente, y el análisis de ARNm cuantificado mediante RT-PCR en tiempo real usando cebadores y sondas validados específicos para h β -globina (ABI Biosystems) usando murina α -globina para la normalización. El análisis FACS después de la tinción intracelular para h β -globina se realizó como se describió anteriormente.

Ejemplo 32

Materiales y métodos: inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

15 El análisis de chips se realizó en clones MEL como se describe con modificaciones menores. Brevemente, las muestras de ADN de la entrada y la fracción de cromatina unida a anticuerpos se analizaron mediante qPCR usando SYBR green (Applied Biosystems) usando conjuntos de cebadores por triplicado, y los datos se analizaron como se describió previamente. La relación de enriquecimiento se determinó calculando la relación de ADN-ChIP a entrada de ADN y datos de modificación de histona normalizados para el control "sin anticuerpos" (IgG) y los cebadores correspondientes a la región 5' de neclina y la región promotora, como controles para la cromatina reprimida, para normalizar la eficacia de la inmunoprecipitación. Todas las partes de ADN-CHIP a entrada de ADN se calcularon como: 2 [Ct (Entrada) - Ct (ChIP)] dividido por [tasa de dilución (ChIP)/tasa de dilución (Entrada)]. Los valores de Ct de todos los productos de PCR fueron determinados por el software SDS 1.2 (Applied Biosystems). La media y los valores de SEM se determinaron para la diferencia de veces, y las pruebas t pareadas de dos colas para determinar la significación estadística (p <0,05).

25 Ejemplo 33

Materiales y análisis de sitio de métodos-integración

La reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligadura (LM) se realizó según lo descrito por Modlich et al para mapear los sitios de integración usando cebadores y condiciones descritas (Arumugam, Mol Ther 2009, en cita de prensa).

30 Ejemplo 34

Materiales y Métodos-Análisis Estadístico

Los vectores se compararon con el vector sBG de la prueba t "de Student (sin emparejar y con dos colas). ANOVA (prueba de comparación múltiple de Dunnett) también se realizó entre grupos para comparaciones múltiples. Los datos se expresaron como media \pm SEM. P <0,05 se consideró significativo.

35 Ejemplo 35

Los lentivirus auto-inactivadores flanqueados por el elemento de aislador (cHS4) hipersensible de sitio-4 de pollo de 1,2Kb proporcionan una expresión consistente y mejorada de transgenes, pero tienen títulos significativamente más bajos

40 Los lentivirus auto-inactivadores flanqueados por el elemento del aislador (cHS4) hipersensible del sitio 4 de pollo de 1,2Kb proporcionan una expresión de transgenes mejorada y consistente, pero tienen títulos significativamente más bajos. El alargamiento del casete transgénico de lentivirus en 1,2Kb adicionales mediante un casete interno no causó ninguna reducción adicional en los títulos. Sin embargo, cuando se colocaron secuencias de cHS4 o espaciadores de ADN inerte de tamaño creciente en el LTR 3', los títulos infecciosos disminuyeron proporcionalmente a la longitud del inserto. La etapa del ciclo de vida del vector afectada por los vectores que portaban el inserto LTR 3' de cHS4 grande se comparó con un vector de control: no hubo aumento en la transcripción de lectura completa con la inserción de cHS4 de 1,2Kb en el LTR 3'. Se produjo una cantidad igual de ARNm viral de longitud completa en células de empaquetamiento y el ensamblaje/empaquetamiento viral no se vio afectado, lo que resultó en cantidades comparables de partículas virales intactas producidas por cualquiera de los vectores. Sin embargo, los lentivirus que portaban cHS4 en el LTR 3' se procesaron ineficazmente después de la entrada en la célula objetivo, con una transcripción inversa reducida y una eficacia de integración, y por lo tanto títulos de transducción más bajos. Por lo tanto, los vectores con grandes inserciones en el LTR 3' se transcriben y empaquetan eficazmente, pero el inserto LTR dificulta el procesamiento del ARN viral y la transducción de las células diana. Estos estudios tienen implicaciones importantes en el diseño vectorial integradores.

Ejemplo 36

El aumento de la longitud del genoma del vector en 1,2Kb no afecta los títulos virales

Un objetivo del estudio fue determinar si la reducción de títulos por cHS4 era secundaria a un alargamiento adicional de los genomas virales en el vector lentiviral h β -LCR (BG) largo por otra parte. Se sabe que los genomas de ARN viral largos se empaquetan menos eficazmente en la integración de vectores. La replicación de gamma retrovirus competentes elimina las secuencias añadidas y se recombina para volver a su tamaño viral original. En los vectores de gamma retrovirus que exceden el tamaño natural del virus, la reducción en los títulos ocurre en múltiples etapas del ciclo de vida viral: generación de genoma completo, encapsidación/liberación viral y eventos de recombinación post-entrada. En particular, los lentivirus de BG contienen insertos transgénicos de ~ 7 Kb y, por lo tanto, no producen genomas de ARN viral mayores que el tamaño natural/capacidad de empaquetamiento del virus VIH-1 de tipo natural. Sin embargo, en los vectores de lentivirus, se ha demostrado que la disminución de los títulos virales de los insertos transgénicos de 6 Kb o más se debe a la reducción de la eficacia del empaquetamiento.

Los vectores no aislados BG y BGM se compararon recientemente con los vectores aislados análogos BG-I y BGM-I para efectos de posición. El vector de lentivirus BG lleva el hp y el LCR, mientras que un vector similar BGM lleva adicionalmente un inserto de ADNc de metilguanina metil transferasa (P140K) dirigido por el promotor PGK (PGK-MGMT) inversa del hp-LCR. El casete PGK-MGMT tiene un tamaño de 1,2Kb. Los vectores BG-I y BGM-I llevan además el aislador cHS4 de 1,2Kb en el LTR 3'. El virus se produjo y procesó de manera idéntica a partir de los cuatro vectores y se determinaron los títulos infecciosos, como se describió previamente. Los títulos del vector BG concentrado fueron $2 \pm 0,5 \times 10^8$ UI/mL, mientras que el de BGM, que transportaba un casete interno adicional de 1,2Kb fue ligeramente mayor a $5 \pm 0,8 \times 10^8$ UI/mL (n = 4). Por el contrario, la adición de cHS4 de 1,2Kb en el LTR 3' al vector BG, denominado BG-I, dio como resultado una reducción en los títulos de casi 6 veces a $3,8 \pm 0,8 \times 10^7$ UI/mL. Una adición adicional de un casete interno PGK-MGMT de 1,2Kb al vector BG-I, denominado BGM-I, no redujo más los títulos (Fig. 20B). Estos datos indican que la inserción de cHS4 en el LTR, y no el tamaño general del genoma viral, redujo los títulos virales. Ramezani et al observaron una reducción de 3 veces en los títulos de lentivirus cuando se insertó el cHS4 de 1,2Kb en vectores de lentivirus que codifican casetes de expresión transgénica relativamente pequeños (2Kb de tamaño o menos). Los datos actuales son consistentes con sus resultados, aunque indican una reducción de 6-10 veces en los títulos con la adición de cHS4. También se observó en el presente estudio que la reducción en los títulos mediante la inserción de elementos aislantes en el LTR se produjo por un mecanismo distinto que no dependía del aumento del tamaño del genoma viral.

Ejemplo 37

El tamaño del inserto en el LTR 3' es responsable de la reducción de títulos

Aunque los vectores LV utilizados no excedieron el tamaño natural del virus VIH-1, el tamaño del inserto de cHS4 (1,2Kb) excedió el tamaño natural de la LTR de tipo natural (tenga en cuenta que la LTR wt tiene un potenciador de U3 de 400 bp adicional, que se elimina del LTR 3' auto-inactivador). Se realizó una experimentación para determinar si la disminución de los títulos virales se debió al alargamiento del SIN LTR más allá de su capacidad natural (400 bp), o si los títulos fueron más bajos debido a secuencias específicas en el aislador, lo que podría afectar el plegamiento/unión del ARN viral proteínas celulares y por lo tanto limitan el empaquetado. Se construyeron series de vectores de p-globina en una cadena principal de lentivirus auto-inactivador, sSIN, que portaba fragmentos de cHS4 de diferente longitud en el LTR 3' (Fig. 15a): los primeros 250 bp del aislador, también llamado núcleo, un fragmento de cHS4 de 400 bp, que coincide con el tamaño de la delección del promotor/potenciador U3 en el 3' SIN LTR, y un fragmento de cHS4 de 800 bp, para generar vectores sBG^C, sBG⁴⁰⁰, sBG⁸⁰⁰, respectivamente. Estos vectores se compararon con un vector análogo "sin aislar", sBG, y un vector que porta el aislante de 1,2Kb de longitud completa, sBG-I. Además, se clonó un vector con dos copias del núcleo como repeticiones en tándem (250bp \times 2), sBG^{2C}. Se ha demostrado que el núcleo de cHS4 tiene un 50% de actividad de bloqueo potenciador del aislador de longitud completa (1,2Kb); Se ha demostrado que el efecto del núcleo depende del número de copias, y se ha informado que las repeticiones en tándem del núcleo de cHS4 tienen la misma capacidad de aislamiento que el cHS4 de 1,2Kb de longitud completa.

El virus se generó a partir de plásmidos sBG, sBG^C, sBG⁴⁰⁰, sBG^{2C}, sBG⁸⁰⁰, sBG-I mediante transfecciones transitorias concurrentes y concentración, y se tituló mediante citometría de flujo de células de eritroleucemia (MEL) de ratón infectadas con diluciones en serie de los virus, como se describe. Las células MEL apoyan la producción de globina de tipo adulto. Cada experimento fue replicado cuatro veces.

Se determinó que a medida que aumentaba el tamaño del inserto de cHS4 en el LTR 3', disminuían los títulos virales (Fig. 15b). Hubo una reducción leve, pero estadísticamente significativa, en títulos con insertos de 250 bp y 400 bp. Sin embargo, los títulos cayeron bruscamente a partir de entonces, proporcionalmente a la longitud del fragmento de aislador (Fig. 15b). Los títulos del vector con un aislador cHS4 de 1,2Kb de longitud completa, sBG-I fueron un orden de magnitud menor que el vector de control no aislado, sBG. Es de destacar que el vector sBG^{2C}, con una repetición en tándem de dos secuencias centrales de cHS4 (inserto de 500 bp) tenía títulos similares a sBG⁸⁰⁰.

Para garantizar que la reducción en los títulos no se debiera a secuencias específicas de cHS4 sino a un efecto del

tamaño del inserto LTR, se construyeron tres vectores adicionales, sBG^{400-S}, sBG^{800-S} y sBG^{1200-S}. Estos vectores eran análogos a sBG⁴⁰⁰, sBG⁸⁰⁰ y sBG-I, excepto que contenían elementos espaciadores del ADN del fago λ inversa del núcleo de cHS4 para generar insertos 3' LTR de 400 bp, 800 bp y 1,2 Kb, respectivamente (Fig. 15a) Las secuencias centrales de cHS4 se mantuvieron ya que la reducción en los títulos fue mínima (y no se observó en los experimentos iniciales) con el núcleo; y era importante determinar si las secuencias adicionales inversa del núcleo son necesarias para una actividad óptima del aislador. Los títulos de los vectores que contenían espaciadores de ADN eran idénticos a los que contenían fragmentos de cHS4 de tamaño similar, y disminuyeron al aumentar el tamaño del fragmento en el LTR 3' (Fig. 15d). Estos datos muestran que el alargamiento de los 3' LTR disminuyó los títulos y este efecto no fue de secuencias específicas en cHS4. Se ha informado que la RT del VIH-1 no es una polimerasa fuertemente procesiva; se disocia de su plantilla con frecuencia y el ADN viral se sintetiza en segmentos relativamente cortos. Por lo tanto, es probable que a medida que aumenta el tamaño del inserto en el U3 LTR, haya una procesividad reducida a través del 3' LTR.

Ejemplo 38

La recombinación ocurre con elementos repetidos en el LTR 3'

Para detectar si se produjeron eventos de recombinación en las LTR a partir de la inserción de 2 copias del núcleo o fragmentos de diferentes tamaños en la LTR, ~ 12-20 clones de células MEL transducidos con toda la serie de vectores aislados (sBGC, sBG⁴⁰⁰, sBG^{2C}, se generaron sBG⁸⁰⁰ y sBG-I). Todos los clones que tenían una única copia de provirus integrado se identificaron usando qPCR, como se describió anteriormente. El núcleo de 250 bp del ADN genómico de cada clon se amplificó después, por una PCR estándar. Las secuencias del núcleo aislante podrían amplificarse a partir de clones derivados de todos los vectores excepto los derivados de células transducidas con sBG^{2C}. En los clones MEL sBG^{2C}, el núcleo del aislador era indetectable en 6 de 24 (25%) clones de copia única por PCR, lo que sugiere la delección de ambas repeticiones en tándem de secuencias centrales de cHS4 en la LTR 5' y 3' del provirus (Fig. 20D) Para analizar más a fondo la frecuencia de provirus recombinados, se realizó un análisis de transferencia Southern genómico en grupos de células MEL transducidas con sBG^{2C}. El ADN genómico de las poblaciones de células sBG^{2C} y sBG-I MEL se restringió con una enzima que cortaba dentro de las LTR. La figura 15E muestra las longitudes esperadas del provirus con el vector sBG^{2C} y el vector sBG-I, usados como control. Mientras que se observó una banda proviral única en las células MEL transducidas con sBG-I, el provirus sBG^{2C} en las células MEL mostró la pérdida de una o ambas copias de las secuencias centrales de cHS4. De hecho, las bandas provirales que contienen dos copias intactas del núcleo no se detectaron al nivel de sensibilidad del análisis de transferencia Southern. Estos datos muestran que las repeticiones en tándem en sBG^{2C} se recombinan a alta frecuencia. El vector sBG^{2C}, por lo tanto, tenía títulos virales más bajos de eventos de recombinación durante la transcripción inversa, en lugar del tamaño del inserto LTR. Estos resultados no fueron inesperados, ya que se ha demostrado que los elementos repetidos dentro de los vectores de gamma retrovirus y lentivirus se recombinan con frecuencia.

Ejemplo 39

Etapas en el ciclo de vida del vector afectado por insertos grandes en el LTR 3'

Se ha demostrado que los genomas virales grandes en los vectores de ARN están limitados a nivel de empaquetamiento de ARN. En el presente estudio, no hubo ningún efecto sobre los títulos al aumentar la carga útil del virus en 1,2Kb, pero los títulos disminuyeron al aumentar la longitud del inserto en el LTR. A continuación, se exploró el mecanismo por el cual esto afectaba a los títulos virales. Se estudiaron las siguientes etapas en el ciclo de vida viral: 1) características del ARN viral producido en las células de empaquetamiento, 2) producción de partículas virales, 3) etapas posteriores a la entrada: transcripción inversa, translocación nuclear, integración e integridad proviral. Para todos estos estudios, el vector con el inserto más grande, sBG-I, se comparó con el vector sin el aislador, sBG.

Ejemplo 40

La inserción de cHS4 en el LTR 3' no altera la cantidad o la calidad del ARN viral en las células de empaquetamiento

El análisis de transferencia Northern se realizó en ARN derivado de las células de empaquetamiento 293T después de la transfección transitoria con plásmidos sBG, sBG-I, junto con plásmidos de empaquetamiento (D8.9 y VSV-G). La transferencia se sondeó con fragmento de HP. La figura 16 muestra transcripciones de ARN viral de intensidad similar de las longitudes esperadas de los vectores sBG y sBG-I. La sonda no sondeó específicamente el ARN 28S y 18S. Sin embargo, no hubo bandas adicionales aparte del ARN viral de longitud completa de la longitud esperada, lo que sugiere que no se produjo recombinación o empalme aberrante con la inserción del aislante. Por lo tanto, el ARN viral se produjo eficazmente en las células de empaquetamiento, independientemente de la presencia de un inserto en el LTR.

Ejemplo 41

La inserción de cHS4 en el LTR 3' no aumenta la transcripción de lectura

Se realizó una experimentación para determinar si el inserto de cHS4 inverso de la señal de poliadenilación viral en el LTR podría perjudicar la terminación de la transcripción del ARN viral. Se ha demostrado que las transcripciones leídas

están excluidas de la encapsidación y pueden disminuir los títulos virales. Aunque la transferencia Northern en la Fig. 16 mostró el tamaño esperado de la banda de ARN viral y no hay transcripciones extrañas, se ha demostrado que la lectura transcripcional es mucho menor en los vectores de lentivirus, en comparación con los vectores de gamma retrovirus, que pueden no ser fácilmente detectable a través de una transferencia de Northern. Por lo tanto, se utilizó un ensayo basado en enzimas sensibles para estudiar la transcripción de lectura completa.

Las construcciones de plásmidos se clonaron, en las que el LTR de VIH-1 de tipo natural, el LTR 3' de VIH-1 SIN con o sin el aislador (de los vectores sBG-I o sBG, respectivamente) se colocaron inversa al promotor EF1- α . Se colocó un casete IRES- cre sin promotor inverso de los LTRs, de modo que la expresión cre solo se produciría a partir de la lectura transcripcional del LTR. Un plásmido EF1a-IRES-cre sirvió como control positivo. Se transfectaron cantidades iguales de estos plásmidos en la línea celular indicadora, TE26, que expresa la β -galactosidasa proporcional a la expresión de cre. Un plásmido GFP se co-transfectó con las construcciones de plásmido de lectura para normalizar la actividad de β -galactosidasa para la eficacia de la transfección. Un plásmido que portaba el receptor del factor de crecimiento del nervio de rata truncado sirvió como control negativo. Se generó una curva estándar que mostró una correlación lineal de la cantidad del plásmido IRES-cre de control positivo transfectado en células y la actividad de β -galactosidasa medida por espectrofotómetro. No se observó un aumento significativo en la actividad de β -galactosidasa de las construcciones transfectadas que contienen el LTR lentiviral SIN aislado, en comparación con los que portal el LTR SIN el aislador cHS4. Los resultados del ensayo de β -galactosidasa fueron idénticos cuando se confirmaron por tinción con Lac-Z de células TE26 en placas en cubreobjetos. Estos resultados mostraron que la inserción del elemento cHS4 inverso de la señal de poliadenilación viral no aumentó la transcripción de lectura desde el LTR.

Ejemplo 42

La producción de partículas virales que contienen genomas virales no se ve afectada por cHS4

Para determinar si el ARN viral se encapsidaba eficazmente en viriones, se midieron los niveles de p24, la actividad de la transcriptasa inversa (RT) asociada al virus y los niveles de ARN viral (Figs. 17a-c). El virus se generó de manera idéntica simultáneamente con los dos vectores, y se concentró de manera similar en tres experimentos separados. Para garantizar la pureza de la preparación viral y la falta de contaminación de proteínas o plásmidos, el virus se sedimentó en un cojín de sacarosa y se sometió a digestión con ADNse para estos experimentos. La falta de contaminación del plásmido fue confirmada por un qPCR para el gen de resistencia a la ampicilina, presente en la cadena principal del plásmido. Los mismos volúmenes de preparación de virus se sometieron después a ELISA p24 y ensayos de RT asociados a virus; y el ARN viral se extrajo para un análisis de transferencia de puntos. La Figura 17a muestra que no hubo diferencia en la cantidad de RT asociada a virus entre los dos vectores. Los niveles de p24 en las preparaciones de virus sBG y sBG-I también fueron similares (Fig. 17b). Para garantizar que los viriones de sBG-I contenían genomas virales y no eran virus vacíos como partículas; el virus se sometió a análisis de transferencia de puntos de ARN. Las figs. 17c-d muestra uno de los dos experimentos representativos. El ARN viral de sBG y sBG-I se cargó por duplicado en 4 diluciones diferentes de p24 (Fig. 17c); y la intensidad de los puntos cuantificados por fosfoimager (Fig. 17d). Hubo una cantidad similar de ARNm viral encapsidado de cualquier vector. Estos datos sugieren que la inserción de un fragmento de 1,2Kb en el LTR no afectó la eficacia de empaquetamiento del ARNm viral o la producción de partículas virales.

Los resultados actuales con insertos grandes en el LTR contrastan con los de Sutton y sus colegas, donde los vectores de lentivirus con casetes transgénicos internos alargados se empaquetan de ineficazmente en viriones. Cantidades iguales de partículas de virus producidas a partir de los vectores sBG y sBG-I, pero títulos significativamente más bajos infecciosos/de transducción sugieren un bloqueo posterior a la entrada de grandes virus portadores de insertos LTR, lo que resulta en unidades menos integradas.

Ejemplo 43

Grandes inserciones de LTR afectan la transcripción inversa y la integración del ADNc viral

Se investigaron las etapas posteriores a la entrada; incluyendo transcripción inversa, translocación nuclear, integración e integridad proviral. Transcripción inversa: las etapas de la transcripción inversa, la ubicación de los cebadores y las sondas qPCR y los productos de ADN viral se resumen en la Figura 18a. La transcripción inversa se inicia desde el sitio de unión del cebador cerca del extremo 5' del ARN genómico, y la síntesis de la cadena negativa procede al extremo 5' del genoma (ADN de parada fuerte de la cadena negativa (-ADNsss)). El -ADNsss recién formado se une a la región 3'R del genoma (transferencia de la primera cadena), se reanuda la síntesis de ADN de cadena negativa, acompañada por la digestión con ARNsa H del molde de ARN viral. Se ha demostrado que la estructura secundaria del ARN viral en el extremo 3' es un determinante crítico para la transferencia de -ADNsss, para que el proceso de transcripción inversa sea eficaz. Por lo tanto, es probable que la presencia del aislador/inserto en la región U3 de la LTR 3' altere la estructura secundaria de la región involucrada en este proceso complejo, resultando en una disminución general de la eficacia de la transcripción inversa.

Para evaluar la eficacia de la transcripción inversa, las células MEL se infectaron con cantidades iguales de partículas virales sBG y sBG-I, en base a los niveles de p24, y las células recolectadas en diferentes momentos después de la

infección. La ausencia de contaminación por plásmidos se confirmó mediante un qPCR para el gen de resistencia a la ampicilina presente en la cadena principal del plásmido (datos no mostrados). La cinética de la transcripción inversa temprana (producción de ADN_{ss}) se estudió utilizando cebadores y una sonda que abarca la región R/U5 (Fig. 18b). Como se esperaba, no se detectaron diferencias en la cinética entre los dos virus, ya que los extremos 5' de sBG o sBG-I viral ARN eran idénticos. Sin embargo, los datos validaron que qPCR determinó con precisión la transcripción inversa viral.

Sin embargo, es concebible que cuando RT cambia las plantillas (menos salto de cadena) para transcribir inversamente la LTR 3', la alteración de la estructura secundaria por la presencia de un inserto en la región U3 reduciría los productos de transcripción inversa. Se realizaron PCR cuantitativas que amplificaron las regiones U3/R y Ψ para cuantificar la cantidad de ADN_c viral transcrito inverso intermedio y tardío en células infectadas con vectores sBG y sBG-I, respectivamente (Figs. 18c-d). Se descubrió que la eficacia de RT poco después de la transferencia de la primera cadena se vio afectada. En particular, los cebadores U3/R amplificaron el ADN viral que se transcribió inversamente antes de las secuencias del aislante, lo que sugiere que la inserción en el LTR 3' afectó la transcripción inversa al alterar o "envenenar" el LTR 3'. De hecho, la ineficacia en la formación de productos RT intermedios fue similar a la observada con los productos RT tardíos. En ambos análisis, el pico de síntesis de ADN_c viral se produjo a las 12 h para el vector sBG no aislado y después disminuyó gradualmente, según la integración del ADN_c viral y la cinética de transcripción inversa previamente informada. La cantidad de ADN viral del vector aislado sBG-I fue menor después de la entrada en comparación con sBG en aproximadamente 2 veces en todos los puntos de tiempo, tan pronto como 6 horas después de la entrada de células objetivo. Estos datos sugieren fuertemente que la transcripción inversa después del salto de cadena negativa fue limitante en el vector sBG-I.

Translocación nuclear: después de que el ADN viral se sintetiza en el citoplasma, se transloca al núcleo de las células infectadas, donde se puede encontrar como ADN lineal o ADN circular (círculos 1-LTR y 2-LTR) (Fig. 18a). La forma lineal se circulariza en los LTR y es el precursor directo del proceso de integración; Los círculos 1-LTR y 2-LTR, en cambio, son productos abortivos de recombinación homóloga y unión de extremos de ADN no homólogos, respectivamente. Sin embargo, los círculos 1LTR y 2LTR están localizados específicamente en el núcleo y se usan como un marcador para la translocación nuclear. La presencia de un inserto en el LTR de los lentivirus puede interferir posiblemente con la formación del complejo de preintegración (PIC) y la translocación nuclear del ADN viral puede disminuir los títulos de transducción. De hecho, se ha demostrado que los complejos PIC se unen a LTR del VIH en el citoplasma, y son responsables del transporte al núcleo y de la integración del ADN_c en el genoma de las células infectadas.

Para detectar la translocación nuclear, se analizó la cantidad de círculos 2-LTR en ambos vectores usando un qPCR en el ADN de células MEL infectadas en diferentes puntos de tiempo en células infectadas con sBG versus sBG-I. Como se muestra en la Figura 19a, las cantidades de círculos 2-LTR no fueron significativamente diferentes entre los dos vectores en los puntos de tiempo tempranos. Sin embargo, a las 48 h después de la infección, el pico en el que normalmente se detectan los círculos 2-LTR, los círculos 2-LTR fueron 6,7 veces más altos en las células infectadas con sBG, pero apenas estaban en el límite de detección en las células infectadas con sBG-I. Los puntos de tiempo posteriores (72 y 96 horas) también se analizaron, pero no se determinó ningún retraso en la cinética de la formación del círculo 2LTR en los vectores aislados. De hecho, los círculos 2-LTR apenas eran detectables mediante qPCR en las células infectadas con sBG-I después de 24 horas. Estos datos sugirieron que la translocación nuclear probablemente se redujo debido a la presencia del inserto U3 largo.

Integración: Sin embargo, también es concebible que dos copias de insertos U3 grandes proporcionen una plantilla para la recombinación homóloga, y la tasa de recombinación homóloga entre los dos LTR antes de la integración aumenta, lo que resulta en más círculos 1-LTR y círculos 2-LTR reducidos (como se propone en la caricatura de la Figura 20). Esto disminuiría la cantidad de plantilla disponible para la integración. Debido a la naturaleza del ADN_c viral transcrito inversamente con un vector aislado y no aislado, los círculos 1LTR no pueden cuantificarse mediante una técnica basada en PCR. Por lo tanto, se realizó un análisis de transferencia Southern para detectar ADN_c viral lineal, círculos 1-LTR y 2-LTR a las 72 horas después de la infección con cantidades iguales de sBG y sBG-I (cuantificado usando niveles de p24) (Figura 19b). El análisis de transferencia Southern mostró que (i) la forma lineal de ADN_c viral transcrito inversamente, la forma que se integra, era indetectable en el carril sBG-I a la sensibilidad del análisis de transferencia Southern, mientras que era fácilmente detectable en el carril sBG. (ii) Los círculos 2-LTR también fueron indetectables en el análisis Southern en el carril sBG-I, pero detectables en el carril sBG, corroborando los datos de qPCR en los círculos 2-LTR. (iii) Sin embargo, una gran cantidad de círculos 1-LTR estaban presentes en el carril sBG-I, similar en cantidad a los observados en el carril sBG. Las relaciones relativas de los círculos lineales 1-y 2-LTR en los carriles sBG versus sBG-I sugirieron que hubo una mayor recombinación homóloga del ADN viral de sBG-I. De hecho, estos datos indicaron que la translocación nuclear no se vio afectada en gran medida por el inserto U3. Pero después de que el ADN_c transcrito inverso entró al núcleo, se formaron círculos de 1-LTR aumentados, que representan productos de integración recombinante abortiva debido al gran inserto de LTR y, por lo tanto, se redujo la integración.

Es concebible que la maquinaria de integración también se vea directamente afectada por la presencia de secuencias extrañas en el LTR. Por lo tanto, los virus sBG y sBG-I se empaquetaron usando un plásmido de empaquetamiento defectuoso con integrasa, de modo que el efecto del aislador sobre la transcripción inversa, la localización nuclear y la formación del círculo 1LTR podría estudiarse independientemente de la integración. Se realizó el mismo análisis

que con los virus que contienen integrasa activa: una q-PCR para estudiar el producto de transcripción inversa tardía (usando cebadores psi), círculos 2LTR y un análisis de transferencia Southern genómico para determinar los círculos 1LTR y otras formas de ADNc viral. Los resultados fueron idénticos a los observados con sBG y sBG-I empaquetados con integrasa activa (mostrados en la Figura 19b): se observó la misma reducción en productos de RT tardía y círculos 2LTR mediante qPCR, pero aumentó los círculos 1LTR mediante análisis genómico Southern (datos no mostrado). Por lo tanto, las secuencias insertadas en el LTR lentiviral interfirieron principalmente con el proceso de transcripción inversa y aumentaron la frecuencia de recombinación homóloga mediante un mecanismo independiente de la maquinaria de integrasa.

Finalmente, se analizaron los provirus sBG y sBG-I integrados para determinar la estabilidad de la transmisión y la eficacia de la integración. El análisis de transferencia Southern en la Fig. 19b muestra el ADN integrado como un frotis, que es de mayor intensidad en el sBG que el carril sBG-I. Para confirmar y cuantificar la integración, las células MEL se transdujeron con la misma cantidad de niveles de p24 del virus sBG o sBG-I, se cultivaron durante 21 días y se realizó un análisis qPCR y transferencia Southern para comparar la eficacia y estabilidad de la integración proviral (Fig. 19c). Hubo 6,2 copias provirales por célula en la población de células sBG MEL mediante qPCR, mientras que solo se detectaron 0,8 copias provirales en las células sBG-I MEL, una diferencia de 7,8 veces que es consistente con las diferencias observadas en los títulos de transducción entre los dos vectores. Después, el ADN se restringió con Afl-II, una enzima que corta dentro de las LTR (Fig. 19c, panel izquierdo). Según los títulos de transducción y qPCR, la cantidad de provirus sBG-I integrado fue 8 veces menor que la sBG, como lo indica la cuantificación fosfoimager de las bandas de transferencia Southern (Fig. 19c). El vector sBG-I no se recombinó, como se muestra por la banda proviral única del tamaño esperado. A continuación, el aislador de longitud completa se detectó mediante PCR en todos los clones de copia única de células MEL transducidas con sBG-I (Fig. 20D). Por lo tanto, el ADNc lineal de sBG-I, aunque formado ineficazmente, se integró como un provirus intacto.

La integración viral reducida global se debió principalmente a una combinación de transcripción inversa ineficaz y una recombinación homóloga aumentada que dificulta la disponibilidad de ADN proviral para la integración. Dado que los aisladores son importantes para generar vectores virales que serían seguros y proporcionarían una expresión predecible constante, es importante encontrar una solución al problema de los títulos virales bajos con virus aislados. Una forma de superar el problema sería flanquear el casete de expresión interno con cHS4 en cada extremo, ya que un alargamiento adicional del casete interno no disminuyó los títulos. Sin embargo, este enfoque no se intentó porque se sabe que los elementos repetidos dentro de los retrovirus resultan en recombinación. Dado que se sabe que el VIH RT tiene baja procesividad y se disocia con frecuencia de su plantilla, se hizo un intento para aumentar la cantidad de RT administrada por partícula de vector, para evaluar si eso mejoraría la transcripción inversa de grandes insertos de LTR. RT se empaquetó en los viriones como proteína de fusión vpr-RT. No se observó un aumento significativo en los títulos al proporcionar más RT en el virión. La siguiente etapa fue un intento de aumentar la integrasa (IN) por virión usando la misma estrategia, y la proteína de fusión RT-IN-vpr empaquetada en el virión. Hubo un ligero aumento en los títulos que proporcionaron RT-IN en la partícula viral, pero la diferencia no fue significativa.

A continuación, se realizó un análisis detallado de la función de la estructura del aislador cHS4 de 1,2Kb y se determinaron secuencias definidas de 650 bp como las secuencias mínimas necesarias para un efecto de aislamiento completo. Los títulos de sBG⁶⁵⁰ fueron $3,6 \times 10^8$ UI/mL, en comparación con un título de $8,2 \times 10^8$ UI/mL y $9,8 \times 10^7$ UI/mL de los vectores sBG y sBG-I (Fig. 20C). Los vectores con el inserto de 650 bp tenían títulos virales muy razonables (títulos 2,2 veces menores que el vector sBG no aislado, en comparación con títulos menores de 9-10 veces de sBG-I) sin pérdida de actividad del aislador.

Finalmente, se determinó que los títulos de baja transducción no se debían a un aumento en el tamaño del provirus, sino a un aumento en la longitud del LTR 3'. La cantidad y calidad de los genomas de ARN viral producidos no se vieron afectados y la encapsidación/empaquetamiento de ARN viral fue comparable en vectores con y sin un inserto LTR de 1,2Kb. Los títulos virales reducidos se produjeron a partir de las etapas posteriores a la entrada, por la transcripción inversa ineficaz, el aumento de la recombinación homóloga en las LTR del ADN viral, haciendo que haya menos ADN viral disponible para la integración. Se realizaron mejoras en el diseño vectorial al incluir insertos de aislador más pequeños que contenían elementos esenciales necesarios para una actividad óptima del aislador.

Los estudios actuales tienen implicaciones importantes para el diseño futuro de vectores con insertos dentro de LTR 3', dada la utilidad de elementos aislantes de cromatina, vectores LTR específicos de linaje personalizados o vectores de doble copia.

Ejemplo 44

Construcciones vectoriales

La clonación de los vectores BG, BGM, BG-I y BGM-I se ha descrito previamente. Todos los demás vectores se clonaron en la cadena principal sSIN (detalles proporcionados en Urbinati F, Xia P y Malik P, manuscrito en revisión). Todos los vectores se obtuvieron clonando los diferentes fragmentos de aislador en un único sitio Nhe I/EcoR V se insertó en la región U3 LTR 3' del plásmido vector sSIN LV, que portaba el gen de la beta-globina humana y el sitio hipersensible 2, 3 y 4 fragmentos, como se describió previamente. Los fragmentos de aislador se amplificaron por PCR usando el plásmido aislante pJCI3-1 como plantilla. Todos los amplicones se secuenciaron después de la PCR

- y después de la inserción en el LTR 3'. La clonación del vector beta-globina no aislado y uno que porta el aislador cHS4 de 1,2Kb de longitud completa se ha descrito previamente. Brevemente, el fragmento de aislador de 1,2Kb se obtuvo al digerir el plásmido pJCl3-1 con Xba I y se clonó en el sitio de restricción Nhe I/EcoR V de sBG. Se clonó sBG^C insertando en el vector sBG el fragmento EcoR I/Xba I que contenía el núcleo de 250 bp del núcleo del plásmido bpS 1. Este último se obtuvo clonando el producto de PCR aislador de núcleo de 250 bp (usando cebadores Núcleo IF y Núcleo 1R, como se describe en el presente documento) en sitios de restricción BamH I/EcoR I de un plásmido bpS. Después se añadió una segunda copia del núcleo de 250 bp en el plásmido central bpS 1, clonando en los sitios EcoR I/Kpn I el producto de PCR (Núcleo 2F y Núcleo 2R), obteniendo el plásmido central bpS 2. Después se aislaron 2 copias en tándem del núcleo de 250 bp para digerir el último plásmido con Kpn I/Xba I, y después se clonaron en el vector sBG, obteniendo sBG^{2C}. Los vectores sBG⁴⁰⁰ y sBG⁸⁰⁰ se obtuvieron clonando los 2 productos de PCR (usando cebadores InsF e Ins400R y cebadores InsF e Ins800R, respectivamente) en los sitios sBG Nhe I/EcoR V. El vector sBG650 se obtuvo clonando el fragmento 3' 400 del aislador en sitios EcoRV/BspEI del vector sBG^{1C}. El fragmento 3' 400 se amplificó por PCR a partir del plásmido pJCl3-1 usando los siguientes cebadores: 3' 400 R (BspEI) y 3' 400 F (EcoRV).
- Los vectores que contienen los espaciadores de ADN λ se obtuvieron amplificando ADN de fago λ de diferente tamaño usando las siguientes combinaciones de cebadores: espaciadorF1 y espaciadorR1, espaciadorF1 y espaciadorR2 y espaciadorF1 y espaciadorR3 amplificando fragmentos de ADN λ de 150 bp, 550 bp y 950 bp, respectivamente. Los tres fragmentos de PCR se digirieron con enzimas de restricción Cla I y EcoR I y se unieron en sitios EcoR I/Cla I en el plásmido central bpS-1, los fragmentos de 400 bp, 800 bp y 1200 bp se digirieron del plásmido central bpS-1 con HincII y XbaI para el fragmento de 400 bp, y con Xba I y Xho I para los dos fragmentos restantes, y clonado en los sitios de restricción EcoR V/Nhe I en el vector sBG. Todos los vectores clonados fueron confirmados por secuenciación. La lista de todos los cebadores está disponible en (Fig. 20E).

Ejemplo 45

Líneas celulares

- La línea de células de eritroleucemia murina (MEL) y las células 293T se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Mediatech, Inc) suplementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10% (US Biotechnologies, Inc.). Se indujo a las células MEL a diferenciarse en DMEM que contenía 20% de FBS y 5 mM de N,N'-hexametilen bisacetamida (Sigma), como se describió previamente. Para derivar clones integrales individuales, las células MEL transducidas se clonaron y los clones se seleccionaron por secuencias de β -globina mediante PCR para identificar los clones transducidos. Los clones de copia única se identificaron mediante qPCR para los γ -secuencias lentivirales, y se realizó una PCR para las secuencias centrales de cHS4 en los clones integrantes individuales para confirmar la presencia de secuencias del aislador en el provirus.

Ejemplo 46

Tinción de HbA y análisis FACS

- La tinción usando el anticuerpo anti-HbA humano fue como se describió previamente. Brevemente, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (BPS) y el sedimento se resuspendió en metanol al 100% durante 5 minutos. Las células fijadas se lavaron después con BPS, y se bloqueó la unión de anticuerpos inespecíficos (Ab) usando leche en polvo sin grasa al 5% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron en BPS, se granularon y se permeabilizaron. Las células se dividieron en 2 tubos y se tñieron con isotiocianato de globina-fluoresceína anti-Zeta (FITC) (1 μ g/10⁶ células) como control negativo o anti-HbA-FITC (0,1 μ g/10⁶ células) (Perkin Elmer) durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El Ab sin unir se eliminó mediante un lavado final con BPS antes de analizarlos en FACS Calibur (Becton Dickinson).

Ejemplo 47

Producción de virus

- El virus se produjo por cotransfección transitoria de células 293T, como se describió previamente, usando los plásmidos del vector, el empaquetado (Δ 8.9 o Δ 8.2 para la integrasa activa o inactiva, respectivamente) y los plásmidos de la envoltura VSV-G; el sobrenadante que contenía virus se recogió a las 60 horas después de la transfección y se concentró por ultracentrifugación. Todos los vectores en un experimento fueron empaquetados simultáneamente. El virus se trató con ADNsa y/o DpnI para eliminar la contaminación del ADN plasmídico y se colocó en capas sobre un colchón de sacarosa al 20% para obtener partículas virales purificadas para experimentos específicos sobre el ciclo de vida del vector indicado en los resultados. El virus se concentró 1400 veces de todos los sobrenadantes virales después de la ultracentrifugación a 25.000 rpm durante 90 minutos. Los títulos virales se determinaron infectando células de eritroleucemia de ratón (MEL) con diluciones en serie de virus concentrado, diferenciando y analizando la expresión de HbA mediante un escáner clasificador de células activado por fluorescencia (FACS).

Ejemplo 48

Transferencia Northern

El ARN total se extrajo de células 293T usando ARN-STAT (Tel-Test, INC, Texas), 72 horas después de la transfección. La transferencia de Northern se realizó según el protocolo estándar. La transferencia se hibridó con una sonda de β -globina marcada con 32 -P.

Ejemplo 49

Transferencia de puntos de ARN

El ARN viral se extrajo de los mismos volúmenes de virus concentrados utilizando el Mini Kit de ARN Viral QIAamp (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el virus se lisó en condiciones altamente desnaturizantes y después se unió a una membrana a base de gel de sílice. Dos etapas de lavado lavaron eficazmente los contaminantes y el v-ARN se eluyó en 30 μ l de DEPC-H₂O. Después de la elución, el ARN viral se trató durante 20 min. a temperatura ambiente con amplificación de ADNsa I (Invitrogen). La ADNsa se inactivó incubando la muestra a 65°. El ARN viral se desnaturalizó después en 3 volúmenes de tampón de desnaturalización (65% de formamida, 8% de formaldehído, MOPS IX) durante 15 minutos a 65°. Después de la desnaturalización, se añadieron 2 volúmenes de 20XSSC helado y el ARN se unió a una membrana de nylon por aspiración a través de un aparato de transferencia de puntos. La transferencia se hibridó con una sonda específica de β -globina marcada con 32 -P y se expuso una película durante la noche. La cuantificación de los puntos se realizó con un fosfoimager (Biorad, Hercules, CA).

Ejemplo 50

Ensayo de transcriptasa inversa

El virus concentrado (1 μ L) y las diluciones en serie (1:10, 1:100, 1:1000) se lisaron y procesaron siguiendo el "ensayo de transcriptasa inversa (RT), protocolo (Roche) del Kit colorimétrico". Brevemente, las partículas virales concentradas se lisaron con tampón de lisis y se transcribió inversamente el ARN viral usando digoxigenina y nucleótidos marcados con biotina. La detección y cuantificación del ADN sintetizado como parámetro de actividad de RT siguió un protocolo ELISA en sándwich: el ADN marcado con biotina se unió a la superficie de los módulos de microplaca que fueron recubiertos previamente con estreptavidina. En la siguiente etapa, un anticuerpo contra digoxigenina, conjugado con peroxidasa (anti-DIG-POD), se unió al ADN marcado con digoxigenina. En la etapa final, se añadió el sustrato de peroxidasa ABTS, que dio como resultado un producto de reacción coloreado que se cuantificó usando un lector ELISA a una longitud de onda de 405 nm. La cantidad de producto coloreado se correlacionó directamente con el nivel de actividad de RT en la muestra.

Ejemplo 51

Ensayo P24

La concentración de antígeno P24 se determinó mediante el kit EIA de antígeno p24 VIH-1 (Beckman Coulter). Brevemente, el virus diluido en serie se lisó y se incubó en micropocillos recubiertos con antígeno p24, y se lavó siguiendo el protocolo del fabricante. La absorbancia del color se midió usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. El ensayo de p24 se realizó por duplicado.

Ejemplo 52

Transferencia Southern

Para analizar la integridad del provirus, infectamos las células MEL, las expandimos durante 21 días y extrajimos el ADN con el Mini kit de Qiagen Sangre y Cultivo celular de ADN (Qiagen). Se digirieron 10 μ g de ADN con Afl II, una enzima que corta las LTR. Para determinar la presencia de ADN lineal viral, se extrajo ADN genómico 72 h después de la infección de las células MEL y se restringió con Stu I, una enzima que corta dos veces dentro del provirus. El ADN se separó en un gel de agarosa al 0,8%, se transfirió a una membrana de nylon y se sondeó durante la noche con un fragmento de β -globina.

Ejemplo 53

PCR en tiempo real para productos RT y círculo 2LTR

Se usó la misma cantidad de p24 para transducir células MEL con vectores sBG y sBG-I, en medios DMEM, en presencia de 8 μ g/ml de polibreno. Las células se cosecharon en diferentes puntos de tiempo (0,5 h, 3 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h) y se extrajo el ADN usando el Mini kit de Qiagen Sangre y Cultivo celular de ADN (Qiagen). El ADN genómico (50 ng) de una copia única del clon MEL (confirmado por Southern para un solo integrante) se diluyó con ADN no transducido para generar estándares de número de copias (1-0,016 copias/célula). Los cebadores y la sonda para el producto RT se diseñaron utilizando el software Primer Express de Applied Biosystems, Foster City, CA. Los

cebadores y la secuencia de la sonda para los primeros productos de RT (R/U5) ensayo qPCR son: cebador directo 5'-GAACCCACTGCTTAAGCCTCAA-3', cebador inverso: 5'-ACAGACGGGCACACAC- TACTTG-3'. La reacción se realizó con la sonda TaqMan MGB: 5' «-AAAGCTTGCCTTGAGTGC-3». Los cebadores y la secuencia de la sonda para productos RT intermedios (U3/R) ensayo qPCR son: cebador directo 5'-CCCAGGCTCAGATCT- GGTCTAA-3', cebador inverso: 5'-TGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTT-3'. La reacción se llevó a cabo con la sonda TaqMan MGB: 5' «-AGACCCAGTACAAGCAAAAAGCAGACCGG-3». Para el ensayo tardío del producto RT (ψ), los cebadores se diseñaron para reconocer la región Ψ del provirus: cebador directo: 5'-ACCTGAAAGCGAAAGGCAAAC-3', cebador inverso: 5'-AGAAGGAGAGAGATGGGTGCG-3'. La reacción se llevó a cabo con TaqMan Probe: 5'-AGCTCTCTC-GACGCAGGACTCGGC-3' con colorante TAMRA como inactivador. La normalización para la carga se llevó a cabo utilizando controles del gen apoB de ratón. Las condiciones de ciclismo fueron 2 minutos a 50 °C y 10 minutos a 95 °C, después 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los cebadores y la sonda para el círculo 2LTR fueron como se describió anteriormente. La mezcla de PCR se termocicló según el protocolo del termociclador para placas de 96 pocillos en la unidad base del sistema de PCR en tiempo real 7900HT de Applied Biosystems.

15 Ejemplo 54

Generalmente

La anemia de células falciformes (SCA) resulta de una mutación puntual en el gen de la globina (β^S), lo que resulta en hemoglobina falciforme (HbS). La HbS se polimeriza tras la desoxigenación, lo que produce RBCs en forma de hoz que ocluyen la microvasculatura. Los pacientes con SCA tienen oclusiones vasculares agudas intermitentes y daño orgánico acumulativo, lo que reduce la vida útil de 42 a 58,5 años. Además de la hoz, existe una hemólisis excesiva y un estado de inflamación crónica. Los pacientes con SCA representan aproximadamente 75.000 hospitalizaciones por año, lo que resulta en un gasto anual estimado de \$ 1,2 mil millones de dólares solo en los Estados Unidos. A nivel mundial, SCA es el segundo después de la talasemia en la incidencia de trastornos monogénicos, con más de 200.000 niños nacidos anualmente en África.

25 Las terapias actuales incluyen atención de apoyo para la anemia falciforme episódica, transfusiones crónicas con quelación de hierro e hidroxiurea para inducir la hemoglobina fetal (HbF). Estas terapias afectan la morbilidad de la enfermedad, pero su efectividad es variable y depende del cumplimiento de un régimen de tratamiento indefinido. Un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) alogénicas compatible es curativo, pero está restringido por la disponibilidad de donantes 5 relacionados compatibles y tiene posibles complicaciones graves. Un meta-análisis de 30 187 trasplantes de SCA muestra un 6% a 7% de mortalidad por peritrasplante relacionada con el acondicionamiento, un 7% a 10% de rechazo agudo y un 13% a 20% de enfermedad crónica de injerto contra huésped (EICH) en receptores.

35 La terapia génica de HSC autólogas seguida de trasplante podría resultar en una cura única, evitar consecuencias inmunológicas adversas y no estar limitada por la disponibilidad de donantes; También puede no requerir regímenes de acondicionamiento mieloablativo y, por lo tanto, tener menor toxicidad. Se desconoce la cantidad de HbF/globina anti-falciforme requerida para corregir SCA a través de un transgén.

40 La expresión de HbF postnatalmente puede ser terapéutica, como lo demuestra el efecto protector de HbF en los RBCs falciformes neonatales y en pacientes con persistencia hereditaria de HbF y SCA. Se desconoce la proporción de HSC genéticamente corregidas, la cantidad de HbF expresada exógenamente y la proporción de células F que corregirán la fisiopatología. Se ha demostrado la corrección completa de la talasemia humana mayor in vitro y en ratones xenoinjertados in vivo, con un vector lentivirus que lleva el gen de la β -globina y los elementos de la región de control del locus (LCR). En este informe, este vector de lentivirus de β -globina se modificó para codificar exones de γ -globina y se transdujeron HSCs falciformes murina. La corrección funcional se caracterizó primero, con una 45 cuantificación cuidadosa y detallada de la anemia falciforme, la vida media y la capacidad de deformación de los RBC, con trasplantes de falciformes a normales y una alta producción de HbF para definir los parámetros de corrección. Después, usando acondicionamiento de intensidad reducida y variando el porcentaje de HSC transducidas, los trasplantes se realizaron en ratones falciformes con daño orgánico significativo y demostraron las partes de (1) HSC genéticamente corregidos, (2) HbF y (3) células F, y (4) porcentaje de células HbF/F requerido para la corrección de los RBC falciformes y la mejora del daño orgánico en SCA.

50 Ejemplo 55

Vector

55 Se ha demostrado que un gen híbrido de β - γ -globina que porta el vector lentiviral, I8H β/γ W, 11 expresa ARNm de γ -globina alta en las células eritroides que expresan globinas "adultas". Todas las secuencias de codificación de β -globina se cambiaron a γ -globina usando mutagénesis dirigida al sitio y el gen híbrido de γ - β -globina, y los elementos LCR se clonaron en orientación inversa a la unidad de transcripción viral para generar el vector lentiviral sGbG. El virus se hizo con cotransfección de células 293T.

Ejemplo 56

Enriquecimiento de HSC murino

Se recolectó médula ósea de ratones falciformes BERK de 6 a 20 semanas de edad y se agotó el linaje con anticuerpos biotinilados CD5, CD8, B220, Mac-1, CD11b, Gr-1 y TER-119 y gránulos magnéticos. Las células libres de gránulos se tiñeron con anticuerpos contra Sca-1, *c-kit*. Las células que eran 7-AAD⁻, Linaje⁻, *c-kit*⁺ después Sca-1⁺ (células LSK) se clasificaron en FACS-Vantage (BDBiosciences). Todos los experimentos con ratones falciformes transgénicos Berkeley y ratones C57/BL6 se realizaron según los protocolos aprobados por el Centro Médico del Hospital Infantil de Cincinnati.

Ejemplo 57

10 Transferencia génica y trasplante de médula ósea

Los trasplantes mieloablativos se realizaron a partir de ratones BERK3C57BI/6 debido a la facilidad del trasplante y la disponibilidad inmediata de los receptores normales (9,5 ^{+/-} 0,6 semanas de edad) después de la radiación de 11,75 Gy. Los experimentos de control de radiación mostraron que los ratones BERK que recibieron radiación de 8 a 9 Gy sobrevivieron sin recibir células LSK; y la dosis letal fue menor que en ratones C57BI/6. Los ratones BERK que recibieron más de 10,5 Gy murieron cuando no se administraron células LSK; los que recibieron rescate de LSK sobrevivieron a largo plazo. Los ratones BERK son difíciles de reproducir en grandes cantidades en un momento dado, por lo tanto, 2 ratones/nivel de dosis de radiación determinarían la dosis subletal. Todos los receptores de BERK (12,9 ^{+/-} 0,4 semanas de edad) recibieron 3 transfusiones de RBC de peritrasplante (días 1-7). La patología de los órganos en receptores BERK 1 año después del trasplante se comparó con ratones BERK de 12 semanas de edad que no se sometieron a un trasplante. La radiación fue mayor que la dosis clásica de radiación de intensidad reducida de 4 Gy para permitir un alto grado de quimerismo HSC del donante. Se usó un intervalo de MOI para variar la proporción de HSC de donantes transducidos en el injerto. Las células LSK se estimularon previamente durante la noche y se transdujeron dos veces a un MOI de 30 para los trasplantes BERK3C57BL/6 y MOI de 30 a 100 para los trasplantes BERK→BERK durante 22 a 24 horas; 10.000 a 24.000 células LSK y células LK no transducidas se cotrasplantaron en ratones receptores C57BL/6 o BERK.

Ejemplo 58

Análisis de número de copia

El análisis del número de copias se realizó en el ADN genómico mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando cebadores y sondas descritos anteriormente.

30 Ejemplo 59

Análisis hematológico

El análisis hematológico se obtuvo en Hemavet 950FS (Drew Scientific) bajo la configuración de ratón. El análisis de reticulocitos se realizó de la siguiente manera: se mezclaron 0,1 µl de sangre y 200 µl de reactivo BD Retic-COUNT (Becton Dickinson), se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se analizaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Ejemplo 60

Análisis de hemoglobina

La electroforesis de hemoglobina se realizó en placas de acetato de celulosa, como se describió anteriormente. La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de intercambio iónico se realizó con una máquina Alliance 2690 HPLC (Waters) usando una columna PolyCATA (artículo no. 3.54CT0510; Poly LC Inc).

Ejemplo 61

Análisis funcional de glóbulos rojos

Las células falciformes irreversibles (ISCs) se enumeraron anotando 500 glóbulos rojos en campos consecutivos. La desoxigenación gradual se realizó mediante tonometría. La capacidad de deformación de los glóbulos rojos se determinó usando un analizador de células rotacionales ópticas asistido por láser (LORCA; RR Mechatronics).

Ejemplo 62

Vida media de los RBC

Los ratones fueron inyectados con 3 mg de biotina Sulfo-NHS (Sigma) en 300 µL de BPS como 2 inyecciones separadas con 1 hora de diferencia; se extrajeron de 2 a 5 µL de sangre en tiempos de serie, y se tiñeron con estreptavidina conjugada con APC-Cy7.

Ejemplo 63

Histología

Se recogieron bazo, hígado, huesos, cerebro y riñón y se colocaron en 5 ml de formalina al 10%. Los bloques de parafina se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

5 Ejemplo 64

HbF alta después de terapia génica y trasplante mieloablatoivo corrige SCA

El vector sG^bG transporta exones de γ -globina y regiones no codificantes y reguladoras de β -globina. Sobre la base de un vector sBG previamente estudiado, que expresa altos niveles de β -globina humana, se trasplantaron células LSK transducidas con 13 sG^bG de ratones falciformes Berkeley (BERK) en ratones C57Bl/6J normales irradiados letalmente (mieloablados) (denominados ratones sG^bG). Las transducciones simuladas en células LSK de BERK del mismo grupo de médula ósea seguido de trasplante dieron como resultado ratones con SCA. La mayoría de los RBCs en ratones sG^bG expresaron HbF. Solo los ratones sG^bG con RBCs donantes al 100% (HbS⁺), sin evidencia de hemoglobina murina receptora residual mediante electroforesis y HPLC, se analizaron para análisis hematológicos, funcionales y patológicos. Los ratones sG^bG con una pequeña parte de RBCs murinos receptores se usaron solo para evaluar la copia de HbF/vector y la frecuencia de HSC transducidas. El porcentaje de HbF (HbF/HbS+HbF) en sangre, cuantificado mediante FACS, fue aproximadamente del 40% en ratones primarios seguidos durante 6 meses y en receptores secundarios seguidos durante 7,5 meses (Figura 21A). Dos tercios de los RBCs eran células F; su proporción también fue estable en receptores primarios y secundarios (Figura 21B). La proporción de células F y copias de vectores se correlacionó con HbF (Figura 21C-D). Tomados en conjunto, estos datos muestran una expresión significativa de HbF del vector sG^bG en la mayoría de los RBC con expresión estable a largo plazo.

Ejemplo 65

Los altos niveles de HbF dan como resultado una corrección hematológica sostenida

La Figura 21E muestra la mejora de los parámetros hematológicos en ratones sG^bG. La proporción de reticulocitos disminuyó de aproximadamente 50% en ratones control a aproximadamente 15% en ratones sG^bG ($P < .005$; Figura 22A). Hubo corrección de la anemia a las 12 semanas, que persistió durante todo el período posterior al trasplante (Figura 22B-C).

Los recuentos altos de glóbulos blancos (WBC) en humanos con ratones SCA y BERK reflejan la inflamación basal en esta enfermedad. El WBC volvió a los niveles normales en ratones sG^bG (Figura 22D; Figura 21E).

En particular, los recuentos de leucocitos fueron más bajos en los ratones control en comparación con los ratones BERK que no se sometieron a un trasplante, probablemente porque en el primero, las HSC falciformes se trasplantaron a un fondo C57/BL6 "no inflamado" normal. De hecho, 6 semanas después del trasplante, los recuentos de leucocitos en el grupo de ratones control fueron casi normales, después aumentaron gradualmente a niveles altos observados en SCA (Figura 22D). En general, los parámetros hematológicos mostraron una marcada mejoría a niveles casi normales, y la mejora fue estable durante un período prolongado período en ratones sG^bG primarios y secundarios. El grado de corrección se correlacionó con la proporción de células F (Figura 22E-H) y HbF (datos no mostrados). Los altos niveles de HbF mejoran los parámetros funcionales de los RBCs en ratones falciformes. (1) Falciformación: las células falciformes irreversibles (ISCs) se redujeron significativamente a 2,3% más o menos 0,7% en ratones sG^bG, en comparación con el 12% más o menos 0,8% en controles BERK y 10,2% más o menos 0,3% en ratones control (Figura 23A-B). La desoxigenación de la sangre de un ratón sG^bG representativo muestra una reducción drástica de la falciformación (Figura 23C). Una cuantificación sistemática mostró una marcada disminución en la parte de RBCs falciformes en ratones sG^bG con hipoxia creciente (Figura 23D). (2) Capacidad de deformación de la membrana de los RBCs: los RBC normales se deforman fácilmente a bajo esfuerzo de cizalla (3 Pascales [Pa]), representativo del esfuerzo de cizalla en vasos pequeños. Los RBCs falciformes tienen membranas relativamente rígidas con una capacidad de deformación notablemente reducida incluso con un alto esfuerzo de cizalla (28 Pa; representativo del esfuerzo de cizalla en vasos grandes). Hubo una capacidad de deformación notablemente mejorada de los glóbulos rojos de los ratones sG^bG, aunque no alcanzó niveles normales (Figura 23E). Esto puede reflejar la parte de RBCs falciformes circulantes que no contenían HbF. (3) Supervivencia de RBC: la supervivencia de los RBCs falciformes humanos es un orden de magnitud menor que los RBCs normales. Se midió el tiempo hasta la reducción del 50% (vida media) en los ratones falciformes sG^bG y control/BERK. La supervivencia general de los RBCs de sG^bG mejoró notablemente, con una reducción del tiempo de los RBCs glóbulos rojos de los ratones sG^bG en comparación con los ratones BERK o control (Figura 23F). (4) Hemólisis de RBC: la hemólisis de los RBC detectada midiendo la lactato deshidrogenasa (LDH) en sangre se redujo de 2706 más o menos 148 mg/dL en ratones control a 1286 más o menos 345 mg/ml en ratones sG^bG ($n=5$; $P < .004$).

Ejemplo 66

Los altos niveles de HbF previenen el daño crónico de órganos asociado con SCA

La médula ósea, el bazo, el hígado y los riñones a las 24 semanas mostraron una prevención completa de la patología orgánica. Hubo una reducción de la hiperplasia eritroide en la médula ósea y el bazo, disminución del tamaño del bazo y la preservación de la arquitectura folicular esplénica, en comparación con la arquitectura folicular obliterada de la hiperplasia eritroide severa en ratones control. La atrofia tubular focal y el infarto glomerular segmentario observados en ratones control estaban ausentes en los riñones de ratones sG^bG. Los infartos y la hematopoyesis extramedular observados en hígados de ratones control estaban ausentes en hígados de ratones sG^bG (la Fig. 23G resume los datos en todos los grupos de ratones). En general, excepto por una hiperplasia eritroide leve, no se observó patología orgánica en los ratones sG^bG.

Ejemplo 67

La alta expresión de HbF mejora la supervivencia de los ratones falciformes.

La vida útil de los ratones falciformes BERK se reduce significativamente, como en humanos con SCA antes del tratamiento moderno. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostraron una supervivencia del 100% de los ratones sG^bG a las 24 semanas, en contraste con la supervivencia del 20% en ratones control (n=14, *P* <,001).

Ejemplo 68

Parámetros mínimos requeridos de corrección de SCA

El acondicionamiento mieloablativo permite la repoblación no competitiva de HSC de donantes con corrección génica, lo que da como resultado un alto injerto de HSC modificado por un transgén y una expresión transgénica. Se planteó la hipótesis de que los altos niveles de expresión de γ -globina logrados por el acondicionamiento mieloablativo pueden no ser necesarios para la corrección y, de ser así, reducirían la morbilidad relacionada con el trasplante.

El trasplante de intensidad reducida se logró trasplantando células LSK DE BERK modificadas por genes en ratones BERK irradiados de forma letal, pero con dosis de radiación significativamente altas. La proporción de HSC transducidas y copia/célula de vector en el injerto se varió transduciendo células LSK con un intervalo de MOI (30-100). Como la vida media de los RBCs de BERK era de 1,5 a 2 días (Figura 24G-H), los ratones se transfundieron en el período de peritrasplante y se analizaron después de 12 semanas. Se llevaron a cabo tres experimentos en serie con ratones seguidos durante 1 año. Los ratones sG^bG se analizaron separándolos en 3 grupos según el porcentaje de HbF a las 18 semanas: HbF = 0% (control, n=4), HbF inferior al 10% (denominado sG^bG<10; n=17) y HbF de 10% o más (denominado sG^bG≥10; n=9); (Figura 24A). Se seleccionó el punto de corte al 10% de HbF, ya que parecía ser un nivel umbral de HbF que reflejaba la corrección de la enfermedad: los ratones sG^bG 10 mostraron una mayor mortalidad y una corrección hematológica inconsistente, en comparación con sG^bG≥10 que se describe en el párrafo siguiente. Los números de ratones en los grupos cambiaron con el tiempo principalmente debido al aumento de la mortalidad relacionada con SCA en ratones sin/bajo HbF. El grupo de ratones sG^bG>10 tenía 16% (± 1,2%), 17% (± 1,8%) y 21% (± 2,3%) HbF, mientras que el grupo de ratones sG^bG<10 tenía 5% (± 1,4%), 4% (± 0,6%) y 4% (± 0,5%) de HbF a las 12, 18 y 24 semanas, respectivamente, que fue estable hasta 1 año (Figura 24B). La repoblación de células F fue significativamente mayor en ratones sG^bG≥10 (65%±14%) en comparación con los ratones sG^bG<10 (30%±9,4%); (Figura 24C). Los ratones sG^bG≥10 tenían 2 a 2,5 copias de vectores/célula, mientras que los ratones sG^bG<10 tenían 1,4 copias/célula (Figura 24D).

Ejemplo 69

La mejora hematológica se produjo con trasplantes de intensidad reducida

Los parámetros hematológicos se estabilizaron a las 18 semanas, debido a los glóbulos rojos transfundidos persistentes en el período inicial de postrasplante. Hubo una mejora significativa en los parámetros hematológicos en el grupo de ratones sG^bG≥10 (Figura 23G), en contraste con una mejora pequeña e inconsistente en los ratones sG^bG<10.

Ejemplo 70

La mejora en la función de los glóbulos rojos ocurre con trasplantes de intensidad reducida

Falciformación: Hubo una reducción muy significativa en ISC's en ratones sG^bG≥10 (*P* <,005) y una pequeña pero significativa reducción en ISC's en ratones sG^bG<10 en comparación con los controles control/BERK (*P* <,05, Figura 24E). Los RBCs de los ratones sG^bG>10 mostraron una reducción de la falciformación cuando se exponen a hipoxia graduada, en comparación con los RBCs de los ratones sG^bG<10 o control/BERK (n=20, *P* <,01; Figura 24F). En contraste, no hubo diferencias significativas en la falciformación entre los ratones sG^bG<10 y los control/BERK. (2) Capacidad de deformación de la membrana RBC: Sorprendentemente, a pesar de un grado similar de falciformación con hipoxia en los RBCs de los ratones sG^bG<10 y los ratones control/BERK, hubo una ligera mejora en la capacidad de deformación de los RBC en los ratones sG^bG<10. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente

significativas de los ratones control/BERK debido a la alta variación (Figura 24G). En contraste, hubo una mejora significativa consistente en la capacidad de deformación de los glóbulos rojos en ratones $sG^bG \geq 10$ ($P < .001$, Figura 24H). El patrón de capacidad de deformación sugirió un mejor flujo de glóbulos rojos a través de grandes vasos y microvasos. (3) Supervivencia de RBC: la semivida de los ratones BERK fue de 1,5 días. Los RBCs de los ratones sG^bG con 1%, 3% y 7% de HbF tuvieron una vida media ligeramente mayor (2 días). Dos ratones sG^bG con 18% de HbF mostraron una vida media de RBC de 6 días, un aumento de 4 veces, similar al observado en ratones que portaban 40% de HbF en el modelo de trasplante mieloablativo.

Tomados en conjunto, el vector sG^bG resultó en una corrección hematológica y funcional significativa y consistente de SCA, cuando la producción de HbF excedió el 10% de la hemoglobina total. En particular, la mejora en el fenotipo fue comparable con la lograda con el acondicionamiento mieloablativo.

Ejemplo 71

Mejora notable en la patología de los órganos cuando las concentraciones de HbF superan el 10%

Una característica única de este modelo de trasplante BERK→BERK fue la presencia de una importante patología falciforme en los receptores en el momento del trasplante (determinado usando controles BERK de edad comparable a los ratones receptores cuando se sometieron al trasplante). Por lo tanto, se podría evaluar el potencial de reversión de la patología de los órganos después de la terapia génica. La patología de los órganos en los ratones supervivientes aproximadamente 50 semanas después del trasplante se comparó con los ratones BERK de 3 meses que no se sometieron a un trasplante (Figura 25A; Figura 25C). El grupo de ratones $sG^bG < 10$ mostró una ligera mejoría en la patología de los órganos: hubo una ligera reducción en el peso del bazo (717 ± 162 mg en $sG^bG < 10$ frente a 870 ± 71 mg en ratones BERK/control; P valor, NS) La médula ósea y el bazo mostraron hiperplasia eritroide moderada a severa; los hígados tenían infartos y hematopoyesis extramedular; y los riñones mostraron ocasionales lesiones segmentarias focales, atrofia tubular focal y congestión vascular (Fig. 25D). En contraste, se observó una reversión dramática de la patología de los órganos en ratones $sG^bG \geq 10$: hubo una reducción del 50% en el peso del bazo a 363 más o menos 85 mg, preservación de los folículos esplénicos e hiperplasia eritroide leve en la médula ósea y el bazo. Sorprendentemente, no se detectaron infartos de hígado ni patología renal, excepto en un ratón con un solo foco de atrofia tubular focal. En general, los ratones $sG^bG \geq 10$ mostraron corrección de la patología de los órganos. La falta de patología de los órganos en ratones sG^bG a los 15 meses de edad en comparación con los controles BERK de 3 meses de edad demuestra que la terapia génica con el vector sG^bG en un entorno de trasplante de intensidad reducida previene cualquier daño de los órganos adicional, y la existencia del daño a los órganos al momento del trasplante probablemente se revierte de la regeneración.

Ejemplo 72

Supervivencia

Hubo una mejora significativa en la supervivencia general en los ratones $sG^bG \geq 10$ en comparación con los ratones $sG^bG < 10$ o control (Figura 25B; $P < .05$). De hecho, a las 24 semanas, la supervivencia de los ratones $sG^bG \geq 10$ fue comparable con la supervivencia en ratones con aproximadamente 40% de HbF en el modelo de trasplante mieloablativo que se siguió durante 24 semanas. Hubo alguna mejora en la supervivencia temprana en ratones $sG^bG < 10$ en comparación con ratones control ($P < .05$). Sin embargo, en 1 año, no hubo diferencia en la supervivencia de los ratones $sG^bG < 10$ sobre los ratones control.

Ejemplo 73

Las células F y las células HbF/F son críticas para mejorar la supervivencia de los RBC y la corrección de SCA

Usando el marcado de la superficie de biotina y la tinción intracelular de HbF, se estudió la supervivencia de las células F y las células no F en el mismo animal, lo que permitió la cuantificación de las células HbF/F necesarias para mejorar la supervivencia de los RBC falciformes y la capacidad de deformación. Las células F mostraron una supervivencia prolongada selectiva, como se anticipó (Figura 26A). El promedio de células 20 HbF/F en ratones sG^bG en el modelo BERK3C57Bl/6 fue del 64% (en estos ratones, HbF fue del $41\% \pm 5\%$, las células F fueron del $64\% \pm 6\%$). En el modelo de trasplante de intensidad reducida, los ratones $sG^bG 10$ tenían un 32% de células HbF/F (en estos ratones, la HbF era del $21\% \pm 2\%$, las células F eran del $65\% \pm 14\%$) y los ratones $sG^bG < 10$ tenían 13% de células HbF/F (HbF, $4\% \pm 0,1\%$; células F, $30\% \pm 9,4\%$). Tenga en cuenta que los ratones sG^bG en el modelo mieloablativo y los ratones $sG^bG \geq 10$ tuvieron una repoblación de células F similar ($64\% - 65\%$), lo que sugiere que el 32% de células HbF/F fue suficiente para corregir el fenotipo falciforme. Sin embargo, los ratones $sG^bG < 10$ con 13% de células HbF/F y 30% de células F tuvieron una mejora inconsistente e insignificante del fenotipo de la enfermedad.

Por lo tanto, se determinó la vida media de las células F en ratones, agrupadas por el porcentaje de células HbF/F. Los ratones sG^bG con células bajas (16%; n=2), intermedias (33%; n=4) y muy altas (89%; n=2) HbF/F fueron inyectadas con biotina y después se tomaron muestras de sangre periódicamente. Se determinó que los ratones con células bajas de HbF/F no mejoraron la vida media de los glóbulos rojos con respecto a los controles BERK (Figura 26B), aquellos con 33% de células HbF/F tuvieron una mejora de 3 a 4 veces en la vida media, y los ratones con cantidades muy altas de células HbF/F mostraron una supervivencia de glóbulos rojos similar a la de los ratones

normales. Estos datos demuestran que si un tercio de la hemoglobina dentro de un RBC falciforme es HbF, hay una mejora significativa en la supervivencia de los RBC. Los ratones con estos niveles de células HbF/F mostraron aproximadamente 65% de células F, más del 10% de HbF.

5 Para confirmar el impacto del porcentaje de células F circulantes en la capacidad de deformación global de los RBC, los ratones de los experimentos mieloablativos y de intensidad reducida (n=34) se agruparon en 3 grupos: ratones con menos del 33% de células F circulantes, 33% a 65 % F células y 66% o más células F y capacidad de deformación de RBC medida. Solo los datos de las velocidades de corte bajas (3 Pa) y altas (28 Pa) se representan en la Figura 26C. Los ratones con más del 66% de células F tuvieron una mejora muy significativa en la capacidad de deformación de los RBC tanto en esfuerzo de cizalla alto como bajo ($P < .01$). Los ratones con células F del 33% al 66% habían mejorado significativamente la capacidad de deformación de los RBC solo con un alto esfuerzo de cizalla ($P < .05$). Los ratones con menos de 33% de células F mostraron una mejora inconsistente en la capacidad de deformación de RBC a esfuerzo de cizalla alto o bajo, que no fue significativamente diferente de los controles control. Estos datos cuantifican la cantidad crítica de células HbF/F, la parte de células F y HbF general que son necesarias para la corrección de la enfermedad de células falciformes.

15 Ejemplo 74

Proporción de HSCs transducidas requeridas para la corrección fenotípica

La proporción de HSC transducidas con sG^bG en ratones sG^bG se analizó mediante el ensayo de la unidad secundaria de formación de colonias de bazo (CFU-S) realizado a los 6 meses en ambos modelos (Figura 27A-B). Los aspirados de médula ósea se realizaron a los 6 meses en los ratones BERK→BERK que fueron seguidos durante 1 año. La proporción de CFU-S transducidas se determinó mediante la expresión de HbF. Se ha demostrado previamente que todas las UFC con vectores positivos expresan el transgén en un vector idéntico que codifica la β-globina. Los ratones sG^bG en el grupo de acondicionamiento mieloablativo tenían 16% a 87% de CFU-S transducidas con sG^bG (la transducción HSC promedio era ~ 50%), y las del grupo de intensidad reducida tenían HSC transducidas de 5% a 60% (la transducción HSC promedio fue de ~30%). Cabe señalar que en el modelo de intensidad reducida, la transducción de HSC se sobreestima, secundaria a la mayor mortalidad de ratones sG^bG < 10% en los primeros 6 meses.

Es importante destacar que 3 ratones con 16%, 20% y 22% de CFU-S transducidas tenían más del 10% de HbF (HbF fue del 20%, 11% y 18%, respectivamente) y mostraron una corrección fenotípica completa. Se realizó un análisis de número de copias de vectores simultáneamente a las 24 semanas en células de médula ósea y mostró de 1 a 3 copias/célula y de 1 a 2,5 copias/célula en ratones sG^bG que se sometieron a trasplante utilizando los modelos de acondicionamiento mieloablativo y acondicionamiento de intensidad reducida, respectivamente. Cuando se corrigió la transducción de HSC, hubo 1,5 a 5 copias de vectores/celda.

30 Ejemplo 75

Transducción de células CD34⁺ humanas

El porcentaje de HSC modificados genéticamente necesarios para una terapia génica efectiva es crítico en esta enfermedad. Los estudios *in vitro* sobre la médula de SCA se pueden realizar solo a pequeña escala y leerían la corrección en progenitores, no en HSC. La corrección de HSC se mostró en modelos humanizados de SCA con análisis a largo plazo. El número extremadamente limitado de RBCs producidos por la inyección de células CD34⁺ de médula ósea de talasemia humana es prohibitivo para los estudios sobre la anemia falciforme. Por lo tanto, la transducción de lentivirus en células CD34⁺ humanas normales se optimizó para una ampliación preclínica, usando un vector de lentivirus GFP y el ensayo de repoblamiento inmunodeficiente combinado grave (SCID). Las células CD34⁺ de sangre periférica movilizadas por factor estimulante de colonias de granulocitos transducidas con un vector de lentivirus GFP se trasplantaron a ratones *IL2R γ id* (NSG) diabéticos no obesos (NOD). Aquí, los ratones control fueron aquellos que recibieron un trasplante de células CD34⁺ no transducidas inmediatamente después de la selección, como controles para el efecto de la transducción sobre el injerto y la clonogenicidad. A las 6 semanas, las UFC se colocaron en placas de médula ósea derivada de ratones NSG, y se analizaron 36 UFC/ratón individuales para determinar el porcentaje de colonias marcadas con genes. La transducción de 18 horas no afectó el injerto o la clonogenicidad (datos no mostrados). Se observó una transferencia de genes del 77% en promedio en el ensayo de células repobladoras de SCID, similar a los datos anteriores en células CD34⁺ de talasemia humana.

Los datos de este estudio indican que la administración lentiviral de γ -globina humana bajo elementos de control reguladores de β -globina en HSC da como resultado suficiente expresión postnatal de HbF para corregir SCA en ratones. La cantidad de HbF y HSC transducidas se descalificó, utilizando acondicionamiento de intensidad reducida y variando MOI, para evaluar los parámetros críticos necesarios para la corrección. Una cuantificación sistemática de los índices funcionales y hematológicos de RBC, la patología de los órganos y la duración de la vida fueron críticos para determinar la cantidad mínima de HbF, células F, células HbF/F y HSC modificados genéticamente necesarios para revertir el fenotipo falciforme.

Los resultados indican lo siguiente: (1) La mejoría de la enfermedad se produjo cuando la HbF excedió el 10%, las células F constituyeron dos tercios de los RBCs circulantes y las células HbF/F representaron un tercio de la hemoglobina total en los RBCs; y cuando aproximadamente el 20% de las HSC modificadas con sG^bG repoblaron la

médula. (2) La corrección génica se mantuvo en receptores de trasplante primario o secundario seguidos a largo plazo. (3) Existe un método para determinar el quimerismo mínimo de HSC para la corrección de una enfermedad hematopoyética en un modelo in vivo, que contribuiría al diseño de dosis celulares y regímenes de acondicionamiento para lograr HSC genéticamente corregidos equivalentes en ensayos clínicos en humanos.

5 Un aspecto novedoso de este estudio es que aborda, por primera vez, la dosis génica y la dosis de células madre hematopoyéticas modificadas genéticamente necesarias para la corrección de un defecto genético. Expresar una tremenda cantidad de hemoglobina fetal/antifaciforme indudablemente corregirá la enfermedad, como han demostrado otros, pero no es prácticamente posible en un entorno clínico. Como ejemplo, se realizó una terapia génica inicial para la deficiencia de adenosina desaminasa (ADA) sin acondicionamiento, y no fue terapéutica, a pesar de que se
10 injertaron pocas células madre marcadas con genes, y fue evidente una ventaja selectiva para los linfocitos con corrección génica tras la retirada de ADA. En un ensayo posterior, se usó 4 mg/kg de busulfán antes del trasplante, como acondicionamiento, lo que resultó en una dosis adecuada de células madre con corrección génica y células T modificadas con genes. Aunque estos estudios pioneros nos proporcionaron información invaluable, subrayan la importancia crítica de determinar los umbrales para la corrección génica antes de embarcarse en estudios clínicos.

15 Aunque la enfermedad se corrigió en 1 a 3 copias/célula, el presente estudio indica que el porcentaje de células madre transducidas en este contexto de irradiación/trasplante letal es muy alto (las HSC transducidas promedio son del 50%, según lo analizado por un ensayo de CFU-S secundaria estricta). Es probable que este nivel de transducción de HSC no se logre en el entorno clínico a menos que se realice mieloablación.

20 Por lo tanto, se desarrolló un nuevo modelo (trasplante de BERK a BERK) para abordar la mínima transferencia de genes necesaria y responder preguntas de corrección de SCA en un ratón con patología falciforme significativa a las 12 semanas de vida (Figura 25). Notablemente, un trasplante mieloablativo de falciforme a normal, usado por otros grupos que muestran corrección de SCD, es un modelo de prevención de enfermedades, donde no había una patología subyacente al momento del trasplante. Los estudios actuales muestran que la reparación de la patología preexistente puede ocurrir, si la corrección génica resulta en más del 10% de HbF.

25 Los ratones BERK tienen cierto grado de talasemia. Por lo tanto, una preocupación al usar este modelo para estudios de terapia génica para la anemia falciforme es que la corrección de la talasemia oscurecería las mejoras realizadas por los efectos antideslizantes de la HbF. Sorprendentemente, no se observaron cambios significativos en MCH en ratones $sG^bG < 10$ o $sG^bG \geq 10$, incluidos los ratones con células HbF/F de hasta el 89% (como se describe en el presente documento). Estos resultados fueron sorprendentes, pero mostraron que la corrección de la anemia falciforme en los RBCs no fue secundaria a la corrección de la talasemia, como se observa en el modelo de talasemia murina, donde se observó un aumento de MCH con aumentos en la HbF del 4% o más. Posiblemente, la HbF se produce a expensas de la HbS.
30

Aunque los ratones BERK transportan exclusivamente hemoglobina humana, la hemoglobina total en los RBCs de los ratones es un tercio de los RBC humanos. Por lo tanto, las células HbF y HbF/F se expresaron como un porcentaje, en lugar de en cantidades absolutas, para comparar mejor los datos murinos con los humanos. Se ha demostrado que un aumento de HbF de 3,6% a 13,6% reduce los eventos de anemia falciforme aguda en pacientes tratados con decitabina. Mejora similar en los eventos falciformes ocurre con 25% o más de células HbF/F en pacientes que responden a la hidroxiurea. Los datos presentados aquí, que indican una mejoría con 33% de células HbF/F, son concordantes con estos informes, pero se parecen más a los RBCs en lactantes con ACS, donde menos de un tercio de células HbF/F a los 10 a 12 meses se considera un umbral para polimerización de células falciformes intracelulares. El efecto más notable de la producción de γ -globina con el vector sG^bG fue una dramática ausencia de daño orgánico crónico y una mejor supervivencia de los ratones falciformes cuando la HbF excedía el 10%. Los pacientes con HbF alta tienen una supervivencia mejorada, confirmada por el estudio multicéntrico sobre hidroxiurea. La HbF expresada a partir del vector sG^bG fue comparable o incluso mejor que el tratamiento eficaz con hidroxiurea. El potencial de una corrección única, donde la capacidad de respuesta a la hidroxiurea y el cumplimiento de la administración diaria de por vida no serían factores limitantes, sería una gran ventaja de la terapia génica. De hecho, no anticipamos que obtendríamos la misma conclusión con la terapia génica, como se deriva del conocimiento colectivo en (1) ratones transgénicos, en los que cada RBC tiene la misma cantidad de HbF aunque estábamos imponiendo HbF en los SS RBC; (2) trasplantes quiméricos, en los que están presentes cantidades normales de glóbulos rojos productores de HbA (AA RBC) mezclados con SS RBCs^{7,37,38}; o (3) pacientes con SCD en hidroxiurea, en quienes la macrocitosis inducida por hidroxiurea diluiría la HbS y reduciría el umbral de la anemia falciforme. Se esperaba un umbral mucho más alto de HSC falciformes genéticamente corregidas necesarias para la repoblación de células F y la corrección del fenotipo SCA, ya que la HbF se impuso exógenamente en una célula falciforme con cantidades normales de HbS. Notablemente, a pesar de estas diferencias distintivas en transgénicos/quimeras, las conclusiones fueron similares con la expresión exógena de γ -globina: de hecho, la expresión de HbF exógena en RBC en concentraciones de 33% a tan alto como 89% no produjo un aumento significativo en MCV o MCH, pero falciformación corregida. Estos datos sugieren que el suministro génico de HbF disminuye la HbS endógena.
35
40
45
50
55

El porcentaje de HSC transducidas en el contexto de irradiación/trasplante letal es muy alto (50% en promedio, según lo analizado por un estricto ensayo secundario de CFU-S a las 24 semanas), un número que sería difícil de lograr en un entorno clínico. Sin embargo, el modelo de trasplante BERK→BERK muestra que una corrección de HSC autóloga del 20% puede ser suficiente para una mejora significativa de la anemia falciforme, el daño a los órganos y la
60

5 supervivencia. Sin embargo, es crucial determinar si este porcentaje de HSC modificadas genéticamente necesarias para una terapia génica efectiva es crítico, ya que no hay una ventaja de supervivencia para las HSC modificadas genéticamente en esta enfermedad. La alta transducción de HSC humana ha sido una limitación de la terapia génica con los vectores tradicionales de gamma retrovirus. Los vectores de lentivirus pueden superar esta barrera: se ha demostrado una transducción a largo plazo del 20% en la adrenoleucodistrofia con un vector de lentivirus. La transducción de lentivirus en células CD34+ humanas se optimizó, utilizando el ensayo de células repobladoras de SCID y se logró aproximadamente el 75% de transferencia de genes en células repobladoras de SCID, en promedio, similar a los datos anteriores en células CD34+ de talasemia humana, donde se observó una transducción del 70% de 3 a 4 meses después del trasplante en ratones inmunodeficiencia. En particular, este nivel de transferencia de genes en los ratones SCID es alentador, y de hecho más alto que la transferencia de genes observada en ratones NOD-SCID con el vector lentivirus de adrenoleucodistrofia en estudios preclínicos.

15 La terapia génica que utiliza este enfoque también podría superar la toxicidad y las consecuencias inmunológicas del trasplante alogénico tradicional de médula ósea/trasplante de intensidad reducida. El quimerismo mixto no coincidente de la médula drepanocítica y normal en los trasplantes murinos muestra que un quimerismo casi completo es típicamente necesario para la corrección del daño orgánico. Es alentador que, en una serie clínica, el trasplante de acondicionamiento de intensidad reducida (RIC) con 8 mg/kg de busulfán junto con fludarabina, globulina antitumoral y irradiación linfocítica total en pacientes con ACS haya mostrado un injerto alogénico promedio de 78% a 2 a 8,5 años después del trasplante, con corrección del fenotipo SCA. Este alto nivel de quimerismo del donante, incluso en un entorno RIC alogénico, donde puede producirse un rechazo inmune, sugiere que la alta eficacia de transferencia de genes en células CD34+ autólogas seguidas de RIC puede ser una alternativa potencialmente más segura al acondicionamiento mieloablativo. Se demostró un 77% de eficacia de transferencia de genes en madre/progenitores humanos utilizando un ensayo de células repobladas con NOD-SCID, así como una corrección del fenotipo en ratones con 1,3 a 1,5 copias por célula y aproximadamente 20% de CFU-S marcadas con genes (Figura 27).

25 Significativamente, la corrección se produjo en 1 a 3 copias de vectores por célula, un objetivo clínicamente alcanzable. Se espera que el flanqueo del virus sG^bG con un aislador de cromatina aumente la copia de HbF/vector de 2 a 4 veces. En modelos experimentales, el aislador parece reducir el dominio clonal, aunque se desconoce si el elemento aislante reduce el riesgo de oncogénesis insercional. Se ha demostrado que el riesgo de oncogénesis de inserción observado con vectores de integración aleatoria es menor con un vector de lentivirus que con un vector de gammaretrovirus. Se reduciría aún más cuando el elemento potenciador esté activo solo en un linaje eritroide restringido

30 Ejemplo 76

Terapia génica para la enfermedad de células falciformes

Dado que la HbF es la hemoglobina con el mayor efecto anti-falciforme, se usó un vector lentivirus, sG^bG, que porta un gen de γ -globina humano normal para producir HbF en ratones falciformes Berkeley. Como se describe en el presente documento, se diseñó un vector lentivirus que incorpora exones de γ -globina y regiones no codificantes de β -globina y elementos reguladores, sG^bG. Este vector mostró una corrección completa del fenotipo falciforme en ratones falciformes Berkeley después de la transferencia del vector sG^bG a HSC y trasplantes mieloablativos (Ejemplo 65, Figuras 23A-D, Figura 28 y Tabla 1). Las Figuras 23A y B muestran la reducción de células falciformes irreversiblemente en la sangre de los ratones, las Figuras 23C y D muestran la anemia falciforme inducida experimentalmente de los ratones y la proporción de células falciformes, y la Figura 28 muestra la mejora en la supervivencia de los ratones después del gen exitoso terapia.

Tabla 1. La corrección hematológica se obtiene en el grupo sG^bG de ratones falciformes Berkeley; la corrección se mantiene a largo plazo en trasplantes primarios y secundarios.

Ratones	N	WBC	RBC	Hb	MCV	MCH	RDW	Plt	Retic (%)
BERK	5	56,8 ± 5,4	5,3 ± 0,4	5,8 ± 0,5	48,2 ± 1	10,7 ± 0,5	35,3 ± 1,6	733 ± 80	60,8 ± 5,0
sGbG Prim.	5	10,6 ± 3,1	9,4 ± 0,8	10,0 ± 0,8	40,7 ± 1	10,4 ± 0,6	27,6 ± 1,1	733 ± 82	15,8 ± 3,2
Control Prim.	10	29,7 ± 1,4	5,8 ± 0,4	7,6 ± 0,7	48,5 ± 1	10,7 ± 0,2	32,0 ± 0,9	921 ± 50	40,0 ± 3,0
P Valor*		0,001	0,007	0,03	0,001	0,9	0,009	0,06	0,006
sG^bG Sec.	6	6,8 ± 1,4	8,9 ± 0,4	10,1 ± 0,5	40,5 ± 2	11,4 ± 0,5	28,3 ± 1,4	658 ± 33	13,8 ± 2,9
Sec. Control	1	31,7	5,2	6,4	47,6	12,2	32,1	923	49

El análisis de los parámetros sanguíneos de los ratones se muestra 18 semanas después de los trasplantes primarios (Prim.) y secundarios (Sec.) de células sG^bG o de linaje transducido Control (-), Sca (+) y Kit (+).

Después se determinaron los parámetros críticos necesarios para corregir la fisiopatología SCA utilizando un trasplante de intensidad reducida. Se observó una corrección completa de los parámetros hematológicos y funcionales de los RBC, la inflamación y la patología de los órganos en ratones SCD después del acondicionamiento mieloablativo y el trasplante. La corrección se mantuvo a largo plazo en los receptores de trasplante primario y secundario. También se determinaron los parámetros críticos necesarios para corregir la fisiopatología SCA utilizando un trasplante de intensidad reducida. Hubo un 100% de supervivencia a 6 meses de ratones falciformes Berkeley genéticamente corregidos, en comparación con un 20% de supervivencia de ratones falciformes Berkeley trasplantados.

Utilizando condiciones de acondicionamiento de intensidad reducida y simulando condiciones de trasplante autólogo, se trasplantaron diferentes partes de HSC falciforme de Berkeley modificadas genéticamente en ratones falciformes de Berkeley irradiados de forma letal. Después se definieron las proporciones mínimas de HSC genéticamente corregido, HbF, RBC que contiene HbF (células F) y células HbF/F necesarias para la corrección de la anemia falciforme. Con un 15-20% de gen HSC modificado repoblando la médula ósea de ratón falciforme de Berkeley, aproximadamente 2 copias de vectores por célula, $\geq 10\%$ de HbF y $> 66\%$ de células F, hubo una corrección completa del fenotipo falciforme, incluida la patología y la supervivencia de los órganos. Con 15-20% de HSC modificadas genéticamente que repoblaron la médula ósea de ratón falciforme de Berkeley, aproximadamente 2 copias de vectores por célula, $\geq 10\%$ de HbF y $> 66\%$ de células F, hubo una corrección completa del fenotipo falciforme, incluida la patología de los órganos y la supervivencia.

Ejemplo 77

Terapia génica para la beta talasemia

La expresión de HbF a través de vectores lentivirus que portan el gen de la γ -globina humana se ha demostrado previamente (Persons et al. Blood 10: 2175-83 (2003); Pestina et al. Mol. Ther. 17: 245-52 (2009)). Con el fin de confirmar la capacidad del vector sG^bG para corregir la β -talasemia, los ratones de talasemia (Hbbth3/+) se trataron usando el mismo enfoque que se usó en los ratones transgénicos falciformes. Los ratones con talasemia fueron trasplantados con células madre/progenitoras de talasemia (células Lin-Sca + Kit + [LSK]) transducidas dos veces aproximadamente con un intervalo de 8 horas con sG^bG (MOI de 2 x 20). Los animales de control (Control) se trataron simultáneamente con medias solamente. Aproximadamente 10.000 células LSK+ transducidas fueron inyectadas/co-trasplantadas con 200.000 células Lin-Sca-Kit-irradiadas en ratones receptores de talasemia irradiados letalmente (dosis dividida de 700 + 375 rads). Los animales primarios fueron monitoreados durante un período de 7-8 meses, y los trasplantes secundarios se realizaron a partir de entonces para un seguimiento total de 18 meses.

El vector dio como resultado un aumento de HbF a $22 \pm 3\%$ (media + SEM); que corrigió el fenotipo de talasemia (Figura 29). Hubo un aumento en la hemoglobina de una media de $8,8 \pm 0,2$ g/dL en ratones trasplantados Control a $12,5 \pm 0,5$ g/dL en ratones trasplantados sG^bG (Figura 29A); el hematocrito aumentó de $31,8 \pm 0,3$ a $42,1 \pm 1,07$ (Figura 29B). Esto fue acompañado por una caída en la reticulocitosis de $20,8 \pm 0,3\%$ a $8,7 \pm 1,4\%$ (Figura 29D). La microcitosis observada en la talasemia también se corrigió, con un aumento en el MCV de $38,16 \pm 0,3$ a $45,3 \pm 1,7$ fl. Esta corrección fue estable en el tiempo y se mantuvo en ratones primarios y secundarios.

Ejemplo 78

Vector de expresión de HbF mejorado con propiedades anti-falciformación superiores

Como se describió anteriormente, se demostró que la producción de $> 10\%$ de HbF corrige el fenotipo SCD en el modelo de ratón. Mientras que el vector sG^bG corrigió eficazmente el fenotipo en el modelo de ratón falciforme de Berkeley (Ejemplo 65, Figuras 23A-D, Figura 28; Perumbeti et al., Blood 114: 1174-85 (2009)), fue mucho menos eficaz en el modelo de ratón falciforme knock-in (ratones UAB), a menos que estuvieran presentes copias de vectores muy altas por célula.

Los ratones falciformes de Berkeley son transgénicos para los transgenes de globina α y β^S humana, y la desactivación de las globinas de ratón y los transgenes humanos conduce a la producción de cadenas de globina desequilibradas. Los ratones falciformes Berkeley tienen un exceso relativo de cadenas de globina α humana, en comparación con las cadenas de globina β^S , lo que permite que la γ -globina producida por el vector sG^bG forme HbF ($\alpha_2\gamma_2$) fácilmente, en presencia de β^S globina que también une α -globina para formar HbS ($\alpha_2\beta^S_2$). Los ratones UAB, por otro lado, son complementos para la α humana en lugar del ratón, una globina β^S humana en lugar del gen de la globina $\beta^{\text{principal}}$ del ratón, produciendo globinas humanas en lugar de las globinas del ratón. Por lo tanto, estos ratones tienen cadenas α y β^S humanas completamente equilibradas y se parecen a pacientes con anemia falciforme homocigótica (enfermedad de Hb SS). Los pacientes con SCD homocigoto (y el modelo de ratón falciforme UAB) tienen moléculas α y β^S equilibradas (cantidades iguales de), y la γ -globina introducida genéticamente tiene que competir con β^S por la α -globina. Por lo tanto, se requiere un exceso lejano de γ -globina para competir con la β^S globina para formar HbF.

En consecuencia, en los ratones falciformes de Berkeley, la γ -globina producida por este vector une efectivamente el exceso de globina para formar HbF, sin mucha competencia de la β^S globina, que se une con α globina para formar HbS. Por lo tanto, en ratones falciformes Berkeley, en copias de vectores clínicamente alcanzables, se observa la corrección de la enfermedad. Sin embargo, en ratones UAB, las cadenas de globina α se vuelven limitantes debido a cantidades iguales de cadenas de globina β^S competidoras. Por lo tanto, se requiere un alto nivel/exceso de γ -globina

derivada del vector para poder competir con β^S globina para formar HbF.

Para abordar esto, se realizaron varios cambios en el protocolo y la estrategia de transferencia de genes. El gen de γ -globina se modificó con una mutación de punto G→A en bp 50 en el exón 1. Esta modificación cambia el aminoácido glicina (GGC) a ácido aspártico (GAC) para mejorar su afinidad por la α -globina sin alterar sus propiedades funcionales, de modo que la HbF se forma con mayor eficacia que la HbS en los RBCs. La capacidad del vector de γ -globina original (sG^bG) se comparó con una mutación puntual en la secuencia de codificación de γ -globina (sG^bG^M) en ratones falciformes. El mapa vectorial anotado para el sG^bG^M se representa en la Figura 30, con las diversas regiones de la secuencia identificadas en las Figuras 30 y 31. La secuencia sG^bG^M se muestra en la Figura 31.

Se realizaron estudios comparativos entre los vectores sG^bG y sG^bG^M en ratones falciformes Berkeley y en ratones falciformes UAB, donde las células Sca + Kit + (LSK) empobrecidas en linaje, que están altamente enriquecidas en células madre hematopoyéticas, se clasificaron, se transdujeron con medio único (control), el vector sG^bG, o el vector sG^bG^M, y trasplantado a Berkeley o ratones receptores de falciformación UAB irradiados de forma letal, como se describió previamente para los estudios de eficacia de sG^bG (Perumbeti et al., Blood 114:1174-85 (2009)). Los ratones se desangraron a las 6, 12 y 24 semanas después del trasplante para evaluar los parámetros hematológicos y la expresión de HbF, y después se realizó un seguimiento de seis a ocho ratones por brazo durante 6-12 meses. Los datos de 12 semanas en ratones falciformes Berkeley se muestran en la Figura 32, que demuestra la producción superior de HbF por copia de vector y la reticulocitosis mejorada del vector sG^bG^M.

Los resultados comparativos entre Berkeley y los ratones falciformes UAB se muestran en la Figura 33. Los datos mostrados son resultados de un análisis de 6 meses. La cantidad de HbF producida por copia de vector de los vectores sG^bG y sG^bG^M se muestra en ratones falciformes Berkeley (Figura 33A) y ratones falciformes UAB (Figura 33B). Los ratones sG^bG^M mostraron una capacidad casi 1,5-2 veces superior para formar HbF en comparación con el vector sG^bG en ambos tipos de ratones falciformes. Es notable que la cantidad de HbF producida por copia del vector sG^bG^M es casi el doble en los ratones Berkeley en comparación con los ratones UAB con el vector sG^bG^M, lo que muestra la facilidad con la que se forman los tetrámeros de HbF si el exceso de α -Las cadenas de globina están presentes y la dificultad para formar estos tetrámeros si las cadenas de α -globina son limitantes de la velocidad.

La HbF generada a partir del vector sG^bG^M fue funcional, mostrando corrección de la falciformación, una reducción superior de la reticulocitosis y un aumento de la hemoglobina en ambos tipos de ratones falciformes. Se observó la corrección de la anemia en ratones UAB trasplantados con el vector sG^bG^M pero no con el vector sG^bG. Algunos de estos ratones han sido seguidos durante casi un año, y la expresión es estable. También se observó una corrección mucho mejor de la vida media de los RBC y la capacidad de deformación de la membrana de los RBC con el vector sG^bG^M en comparación con el vector sG^bG cuando los niveles de HbF son los mismos. La Figura 32 muestra que a pesar de los niveles de HbF del 30-35% con el vector sG^bG (diamantes rellenos, Figura 32B), los ratones tenían un recuento promedio de reticulocitos de aproximadamente el 15%, mientras que el recuento de reticulocitos era del 5% en los ratones sG^bG^M con niveles de HbF similares (diamantes abiertos). Esto demuestra que la mutación también mejoró la vida útil de los RBCs al reducir la falciformación, a pesar de los niveles similares de HbF. Por lo tanto, el vector de gammaglobina mutada diseñado también produce una HbF anti falciforme superior, mejorando la calidad y la vida útil de los glóbulos rojos. Los estudios relacionados con el efecto sobre el daño a los órganos, la capacidad de deformación de la membrana de los glóbulos rojos, la vida media de los glóbulos rojos y la afinidad de oxígeno de la HbF mutante en comparación con la HbF normal para determinar el mecanismo detrás de esta propiedad favorable inesperada de la HbF están en curso.

Estos resultados demuestran que el gen de γ -globina con mutación puntual en el vector sG^bG^M previene la falciformación y, por lo tanto, prolonga la vida media de los RBC falciformes, lo que conduce a un recuento de reticulocitos más bajo (Figura 33). Esta mayor producción de HbF y la reducción de la reticulocitosis dan como resultado un aumento proporcional de la hemoglobina y la corrección hematológica del fenotipo falciforme. El vector sG^bG^M no tiene cambios en la cadena principal del vector ni en ninguno de los elementos reguladores de la transcripción.

Los diversos métodos y técnicas descritos anteriormente proporcionan varias formas de llevar a cabo la invención. Por supuesto, debe entenderse que no necesariamente todos los objetivos o ventajas descritos pueden lograrse según cualquier realización particular descrita en este documento. Por lo tanto, por ejemplo, los expertos en la materia reconocerán que los métodos pueden realizarse de una manera que logre u optimice una ventaja o grupo de ventajas como se enseña aquí sin necesariamente alcanzar otros objetivos o ventajas como se puede enseñar o sugerir aquí. Una variedad de alternativas ventajosas y desventajosas se mencionan en el presente documento. Debe entenderse que algunas realizaciones preferidas incluyen específicamente una, otra o varias características ventajosas, mientras que otras excluyen específicamente una, otra o varias características desventajosas, mientras que otras mitigan específicamente una característica desventajosa actual mediante la inclusión de una, otra o varias características ventajosas.

En algunas realizaciones, los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., usadas para describir y reivindicar ciertas realizaciones de la invención deben entenderse como modificadas en algunos casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, en algunas realizaciones, los parámetros numéricos establecidos en la descripción escrita y las reivindicaciones adjuntas son

aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se desean obtener mediante una realización particular. En algunas realizaciones, los parámetros numéricos deben interpretarse a la luz del número de dígitos significativos informados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo ordinarias. A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de algunas realizaciones de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se informan con la mayor precisión posible. Los valores numéricos presentados en algunas realizaciones de la invención pueden contener ciertos errores necesariamente resultantes de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

En algunas realizaciones, los términos "un" y "una" y "el" y referencias similares usadas en el contexto de describir una realización particular de la invención (especialmente en el contexto de algunas de las siguientes reivindicaciones) pueden interpretarse para cubrir ambas el singular y el plural. La recitación de intervalos de valores en el presente documento solo pretende servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora a la especificación como si se mencionara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en este documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en este documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado con respecto a ciertas realizaciones en el presente documento pretende simplemente iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otro modo.

Listado de secuencias

<110> Punam Malik Children's Hospital Medical Center

<120> Una hemoglobina fetal mejorada para la corrección génica de la anemia falciforme

<130> 0088544-029WO0

<150> 61/933788

<151> 30-01-2014

<160> 5

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Gamma globina humana mutada

<400> 1

```

Met Gly His Phe Thr Glu Glu Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ser Leu Trp
 1          5          10          15
Asp Lys Val Asn Val Glu Asp Ala Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu
 20          25          30
Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Ser Phe Gly Asn
 35          40          45
Leu Ser Ser Ala Ser Ala Ile Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His
 50          55          60
Gly Lys Lys Val Leu Thr Ser Leu Gly Asp Ala Ile Lys His Leu Asp
 65          70          75          80
Asp Leu Lys Gly Thr Phe Ala Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
 85          90          95
Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Lys Leu Leu Gly Asn Val Leu Val
 100         105         110
Thr Val Leu Ala Ile His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Glu Val Gln
 115         120         125
Ala Ser Trp Gln Lys Met Val Thr Ala Val Ala Ser Ala Leu Ser Ser
 130         135         140
Arg Tyr His
145

```

<210> 2

<211> 444

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 747 817 T3

<220>

<223> Región (CDS) que codifica el gen de gamma globina humana mutada, orientación de sentido

5 <400> 2
 atgggtcatt tcacagagga ggacaaggct actatcacaa gcctgtggga caaggtgaat 60
 gtggaagatg ctggaggaga aaccctggga aggtcctggt ttgtctaccc atggacccag 120
 aggttctttg acagcttttg caacctgtcc tctgctctg ccatcatggg caaccccaaa 180

 gtcaaggcac atggcaagaa ggtgctgact tccttggggag atgccataaa gcacctggat 240
 gatctcaagg gcacctttgc ccagctgagt gaactgcact gtgacaagct gcatgtggat 300
 cctgagaact tcaagctcct gggcaacgtg ctggtcaccg tgctggccat tcactttggc 360
 aaagaattca cccctgaggt gcaggcttcc tggcagaaga tgggtgactgc agtggccagt 420
 gccctgtcct ccagatacca ctga 444

10 <210> 3
 <211> 2141
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Gen de gamma globina humana mutada, orientación de sentido

<400> 3
 gtaaatcac ttgcaaagga ggatgttttt agtagcaatt tgtactgatg gtatggggcc 60
 aagagatata tcttagaggg agggctgagg gtttgaagtc caactcctaa gccagtgccca 120
 gaagagccaa ggacaggtac ggctgtcatc acttagacct caccctgtgg agccacaccc 180
 tagggttggc caatctactc ccaggagcag ggagggcagg agccaggcct gggcataaaa 240
 gtcagggcag agccatctat tgcttacatt tgcttctgac acaactgtgt tcactagcaa 300
 cctcaaacag acaccatggc aaggcacatg gcaagaaggt gctgacttcc cacaagcctg 360
 tgggacaagg tgaatgtgga agatgctgga ggagaaaccc tgggaaggtg ggctctgggtg 420
 accaggacaa gggagggaa gaggaccct gtgcctggca aaagtccagg ttgcttctca 480
 ggatttgtgg caccttctga ctgtcaaact gttctgttca atctcacagg ctctctggttg 540
 tctacccatg gacccagagg ttctttgaca gctttggcaa cctgtcctct gcctctgccca 600
 tcatgggcaa ccccaaagtc aaggcacatg gcaagaaggt gctgacttcc ttgggagatg 660
 ccataaagca cctggatgat ctcaagggca cctttgccca gctgagtga ctgactgtg 720
 acaagctgca tgtggatcct gagaacttca aggtgagtct atgggaccct tgatgttttc 780
 tttcccttc tttctatagg ttaagttcat gtcataaggaa ggggagaagt aacagggtag 840
 acatattgac caaatcaggg taattttgca tttgtaatt taaaaaatgc tttcttcttt 900
 taatatactt tttgtttat ctatttcta atactttccc taatctcttt ctttcagggc 960
 aataatgata caatgtatca tgcctctttg caccattcta aagaataaca gtgataaatt 1020
 ctgggttaag gcaatagcaa tatttctgca tataaatatt tctgcatata aattgtaact 1080
 gatgtaagag gtttcatatt gctaatagca gtcacaatcc agctaccatt ctgcttttat 1140
 tttatggtg ggataaggct ggattattct gaggccaagc taggcccttt tgctaactcat 1200
 gttcacaact ctatcttcc tcccacagct cctggggcaac gtgctggtca ccgtgctggc 1260
 cattcacttt ggcaagaat tccccctga ggtgcaggct tcctggcaga agatggtgac 1320
 tgcagtggcc agtgccctgt cctccagata cactgagcc tcttgcccat gattcagagc 1380
 tttcaagga aggctttat ctgcaagcaa tacaataat aaatctattc tgctgagaga 1440
 tcacacatga tttcttccag ctcttttttt tacatctttt taatatatg agccacaaag 1500
 ggtttatatt gagggaagtg tgtatgtgta tttctgcatg cctgtttgtg tttgtggtgt 1560
 gtgcatgctc ctcatttatt tttatatgag atgtgcattt tgttgagcaa ataaaagcag 1620
 taaagacact tgtacacggg agttctgcaa gtgggagtaa atgggtgtagg agaaatccgg 1680
 tgggaagaaa gacctctata ggacaggact tctcagaaac agatgttttg gaagagatgg 1740
 gaaaaggttc agtgaagacc tgggggctgg attgattgca gctgagtgc aaggatggtt 1800
 cttaatgaag ggaagtgtt ccaagctcgg ctagccggtg ctagtctccc ggaactatca 1860
 ctctttcaca gtctgctttg gaaggactgg gcttagtatg aaaagttagg actgagaaga 1920
 atttgaaagg gggctttttg tagcttgata ttcactactg tcttattacc ctatcatagg 1980
 cccaccccaa atgggaagtcc cattcttctc caggatgttt aagattagca ttcaggaaga 2040
 gatcagaggt ctgctggctc ccttatcatg tcccttatg tgcttctggc tccggctagc 2100
 accggtgatg atcctcgcca gctcgactct agaggatccc c 2141

20 <210> 4
 <211> 11868
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Gen de gamma globina humana mutada sSIN

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (0)...(0)
 <223> n=a, t, c, or g

5

<400> 4
 caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatTT ttctaataac 60
 attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa 120
 aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat 180
 tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc 240
 agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga 300
 gttttcgccc cgaagaacgc tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg 360
 cggattatc cgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc 420
 agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag 480
 taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtataaa cactgcccgc aacttacttc 540
 tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg 600
 taactcgctc tgcggtatc gaaccggagc tgaatgaagc catacctaac gacgagcgtg 660
 acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgccgaa actattaact ggcgaactac 720
 ttactctagc ttcccgcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac 780
 cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccgggtg 840
 agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg 900
 tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg 960
 agatagtgct ctcaactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac 1020
 ttttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctagggtgaag atcctttttg 1080
 ataactctcat gaccaaaact cottaacgtg agttttcgtt ccaactgagc tcagaccocg 1140
 tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 1200
 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 1260
 tttttccgaa ggttaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaataactgtc cttctagtgt 1320
 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 1380
 taactcctgtt accagtgctg gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc ggggtggact 1440
 caagcagata gttaccggat aagcgcagc ggtcgggctg aacggggggg tctgtgcacac 1500
 agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 1560
 aaagcggcac gcttcccgaa gggagaaaag cggacaggta tccggtaagc ggcagggctg 1620
 gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 1680
 tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga 1740
 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt 1800
 ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt 1860
 ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcagc tcagtgagcg 1920
 aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgctctccc gcgcgcttgg ccgattcatt 1980
 aatgcagctg gcacgacagg tttcccact gaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta 2040
 atgtgagtta gctcaactcat taggcacccc aggccttaca ctttatgctt ccggctcgtg 2100
 tgttggtggt aatgttgagc ggataacaat ttcacacagc aaacagctat gacctgatt 2160
 acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaaacaaa gctggagctg caagcttggc 2220
 cattgacata gttgtatcca tatcataata tgcacattta tattggctca tgtccaacat 2280
 taccgcatg ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaataaatt acggggtcat 2340
 tagttcatag cccatataat gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg 2400
 gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa 2460
 cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa actgcccact 2520
 tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaat gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta 2580
 aatggccgct ctggcattat gccagtagca tgacctatg ggactttcct acttggcagt 2640
 acatctacgt attagtcacg gctattacca tgggtgatgc gttttggcag tacatcaatg 2700
 ggcgtggata gcgggttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg 2760
 ggagtttgtt ttggcaccac aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc 2820
 cattgacgca aatgggctgt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt 2880
 tagtgaaccg ggtctctctc ggttagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact 2940
 agggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc 3000
 ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa 3060
 aatctctagc agtggcgccc gaacagggac ttgaaagcga aagggaaacc agaggagctc 3120
 tctcgacgca ggaactcggct tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcgcgactg 3180
 gtgagtacgc caaaaatttt gactagcggg ggctagaagg agagagatgg gtgagagagc 3240
 gtcagtatta agcgggggag aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg 3300
 ggaaagaaaa aatataaatt aaaacatata gtatgggcaa gcagggagct agaacgattc 3360
 gcagttatc ctggcctgtt agaacatca gaagctgta gacaaact gggacagcta 3420
 caaccatccc ttcagacagg atcagaagaa cttagatcat tatataatc agtagcaacc 3480
 ctctattgtg tgcatacaag gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata 3540
 gaggaagagc aaaacaaaag taagaccacc gcacagcaag cggccgctga tcttcagacc 3600

ES 2 747 817 T3

tggaggagga gatatgaggg acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa 3660
aattgaacca ttaggagtag cacccaccaa ggcaaagaga agagtgggtgc agagagaaaa 3720
aagagcagtg ggaataggag ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat 3780
gggcgcagcg tcaatgacgc tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtgc 3840
gcagcagaac aatttgctga gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt 3900
ctggggcatc aagcagctcc aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca 3960
acagctcctg gggatttggg gttgtctctg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg 4020
gaatgctagt tgggtaata aatcctctgga acagatttgg aatcacacga cctggatgga 4080
gtgggacaga gaaattaaca attacacaag cttataacac tccttaattg aagaatcgca 4140
aaaccagcaa gaaaagaatg aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagtttctg 4200
gaattggttt aacataacaa attggctgtg gtatataaaa ttattcataa tgatagttag 4260
aggcttggta ggtttaagaa tagtttttgc tgtactttct atagtgaata gaggtaggca 4320
gggatattca ccatatcgtt ttcagaccca cctcccaacc ccgaggggac ccgacaggcc 4380
cgaaggaata gaagaagaag gtggagagag agacagagac agatccattc gattagttaa 4440
cggatctcga cggatcgtat agcgggacaa atggcagtat tcatccacaa ttttaaaaga 4500
aaagggggta tgggggggta cagtgcaggg gaagaatag tagacataat agcaacagac 4560
atacaaaacta aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg ggtttattac 4620
agggacagca gagatccagt ttggatcgtc gacatcggcg gtgaattcac tagtggatcg 4680
ctctcgaggg gatcctctag agtcgagctc gcgaggatca tcaccgggtg tagccggagc 4740
cagaagcacc ataaggggca tgataaggga gccagcagac ctctgatctc ttctgaaag 4800
ctaactctta acatcctgag gaagaatggg acttccattt ggggtgggccc tatgataggg 4860
taatagaca gtagtgaata tcaagctaca aaaagcccc ttcaaattc ttctcagtc 4920
taacttttca tactaagccc agtccttcca aagcagactg tgaagagtg atagttcccg 4980
gagactggca ccgctagccc gagcttggaa cactttccct tcattaagaa ccatccttgc 5040
tactcagctg caatcaatcc agccccagg tcttacttga accttttccc atctcttcca 5100
aaacatctgt ttctgagaag tcctgtccta tagaggtctt tcttcccacc ggatttctcc 5160
tacaccattt actcccactt gcagaactcc cgtgtacaag tgtctttact gcttttattt 5220
gctcaacaaa atgcacatct catataaaaa taatagggga gcatgcacac accacaaa 5280
caaacaggca tgcagaaata cacatacaca cttccctcaa tataaacctt ttgtggctca 5340
tatatttaaa aagatgtaaa aaaaagagct gaagaaaatc atgtgtgatc tctcagcaga 5400
atagatttat tatttgtatt gcttgcaaaa taaagcctat ccttgaaagc tctgaatcat 5460
gggcaagagg ctccagtggta tctggaggac agggcactgg ccaactgcagt caccatctt 5520
tgccaggaag cctgcacctc aggggtgaat tctttgccaa agtgaatggc cagcacgggtg 5580
accagcacgt tgcccaggag ctgtgggagg aagataagag gtatgaacat gattagcaaa 5640
agggcctagc ttggactcag aataatccag ccttatccca accataaaa aaaagcagaa 5700
tggtagctgt attgtagctg tatgaaacct cttacatcag ttcaaattda 5760
tatgcagaaa tatttatatg cagaaatatt gctattgcct taaccagaa attatcactg 5820
ttattcttta gaatggtgca aagaggcatg atacattgta tcattattgc cctgaaagaa 5880
agagatttag gaaagtatta gaaataagat aaacaaaaaa gtatatttaa agaagaaagc 5940
atthtttaaa attacaaatg caaaattacc ctgatttggg caatatgtgt accctgttac 6000
ttctcccctt cctatgacat gaacttaacc atagaaaaga aggggaaaga aaacatcaag 6060
ggtcccatag actcaacctg aagttctcag gatccacatg cagcttgtca cagtgcagtt 6120
cactcagctg ggcaaaagtg cccttgagat catccagggt ctttatggca tctcccagg 6180
aagtccagcac cttcttgcca tgtgccttga ctttggggtt gcccatgatg gcagaggcag 6240
aggacagggt gccaaagctg tcaaagaacc tctgggtcca tgggtagaca accaggagcc 6300
tgtgagattg acaagaacag tttgacagtc agaaggtgcc acaaatcctg agaagcaacc 6360
tggacttttg ccaggcacag ggtccttctt tccctccctt gtccctgtca ccagagccta 6420
ccttcccagg gtttctctc cagcatcttc cacattcacc ttgtcccaca ggcttgtgat 6480
agtagccttg tcctcctctg tgaaatgacc catgggtgtc gtttgagggt gctagtgaac 6540
acagttgtgt cagaagcaaa tgtaagcaat agatggctct gcctgactt ttatgcccag 6600
ccctggctcc tgccctccct gctcctggga gttagattggc caaccctagg gtgtggctcc 6660
acagggtgag gtctaagtga tgacagccgt acctgtcctt ggctcttctg gcaactggctt 6720
aggagtggga cttcaaaccc tcagccctcc ctctaagata tatctcttgg ccccatacca 6780
tcagtacaaa ttgctactaa aaacatcctc ctttgcaagt gtatttaaga cggatcagat 6840
gtatgtgagc atgtgtcctc taacagcaca ggccttttgc cacctagctg tccaggggtg 6900
ccttaaaatg gcaaacagg tttgttttct tttcctgttt tcatgccttc ctctccata 6960
tccttgtttc atattaatac atgtgtatag atcctaaaaa tctatacaca tgtattaata 7020
aagcctgatt ctgccgcttc taggtataga ggccacctgc aagataaata tttgattcac 7080
aataactaat cattctatgg caattgataa caacaaatat atatatatat atatatatac 7140
gtatatgtgt atatatatat atatatatat atattcagga aataatatat tctagaatat 7200
gtcacattct gtctcaggca tccattttct ttatgatgcc gtttgagggt gagttttagt 7260
caggtgggtc gcttctcctt ttttttgcca tctgccctgt aagcatcctg ctggggaccc 7320
agataggagt catcactcta ggctgagaac atctgggacac acaccctaag cctcagcatg 7380

ES 2 747 817 T3

actcatcatg actcagcatt gctgtgcttg agccagaagg tttgcttaga aggttacaca 7440
gaaccagaag gcgggggtgg ggcactgacc cgcacagggg cctggccaga actgctcatg 7500
cttggactat ggggaggtcac taatggagac acacagaaat gtaacaggaa ctaagggaat 7560
tccggtgccc tgcttaggag cttaatcttt aatgaaagct aagctttcat taaaaaagt 7620
ctaaccagct gcattcgact ttgactgcag cagctggtta gaaggttcta ctggaggagg 7680
gtcccagccc attgctaaat taacatcagg ctctgagact ggcagtatat ctctaacagt 7740
ggttgatgct atcttctgga acttgctctgc tacattgaga cactgacccc atacatagga 7800
agccatagc tctgtcctga actggttaggc cactggtcca gagagtgtgc atctccttg 7860
atcctcataa taaccctatg agatagacac aattattact cttactttat agatgatgat 7920
cctgaaaaca taggagtcaa ggcacttgcc cctagctggg ggtatagggg agcagctcca 7980
tgtagtagta gaatgaaaaa tgctgctatg ctgtgcccct cccacctttc ccatgtctgc 8040
cctctactca tggctatctc ctctggctc ctgggagtca tggactccac ccagaccac 8100
caacctgacc taaccaccta tctgagcctg ccagcctata acccatctgg gccctgatag 8160
ctggtggcca gccctgaccc caccaccacc tccttggaac ctctgataga cacatctggc 8220
acaccagctc gcaaggtcac cgtgagggtc ttgtgtttgc tgagtcaaaa ttccttgaaa 8280
tccaagtctc tagagactcc tgctccaaa ttacagtca tagacttctt catggctgtc 8340
tcctttatcc acagaatgat tcctttgctt cattgcccga tccatctgat cctcctcatc 8400
agtgcagcac agggcccatg agcagttagc gcagagtctc acataggtct ggcaactgct 8460
ctgacatgct cgaccttagg caaatgcttg actcctctga gctcggatcc cttgagctca 8520
ggaggtgata gctgcagtga gacatgatct tgccactgca ctccagcctg gacagcagag 8580
tgaaaacctg cctcacgaaa gagaatacaa aaacaaacaa acaaaaaact gctccgcaat 8640
gcgcttcctt gatgctctac cacataggctc tgggtacttt gtacacatta tctcattgct 8700
gttcataaatt gttagattaa ttttgaata ttgatattat tcctagaaaag ctgaggcctc 8760
aagatgataa cttttatttt ctggacttgt aatagctttc tcttgattc accatggtgt 8820
aactttctta gagtagtaac aataaaagt tattgtgagt ttttgcaaac acagcaaaaca 8880
caacgacccta tatagacatt gatgtgaaat tgtctattgt caatttatgg gaaaacaagt 8940
atgtactttt tctactaagc cattgaaaca ggaataacag aacaagattg aaagaataca 9000
ttttccgaaa ttacttgagt attatacaaaa gacaagcacg tggacctggg aggagggtta 9060
ttgtccatga ctggtgtgtg gagacaaatg caggtttata atagatggga tggcatctag 9120
cgcaatgact ttgccatcac ttttagagag ctcttggggg cccagtagca caagagggga 9180
cgcaggggat atgtagacat ctcattcttt ttcttagtgt gagaataaga atagccatga 9240
cctgagttta aggagactga gcccttttct ctctcccact cagcagctat gagatggctt 9300
gccctgcctc tctactaggc tgactcactc caaggcccag caatgggcag ggctctgtca 9360
gggctttgat agcactatct gcagagccag ggccgagaag ggggtgactc cagagactct 9420
ccctcccatt cccgagcagg gtttgcctat ttatgcattt aaatgatata tttattttaa 9480
aagaaataac aggagactga ccgccctgg ctgtgacatg gaaactatgt agaataattt 9540
gggttccatt ttttttctc tctttcagtt agaggaaaag gggctcactg cacatacact 9600
agacagaaag tcaggagctt tgaatccaag cctgatcatt tccatgtcat actgagaaag 9660
tccccaccct tctctgagcc tcagttttctc tttttataag taggagtctg gagtaaatga 9720
tttccaatgg ctctcattttc aatacaaaat ttccgtttat taaatgcatg agcttctgtt 9780
actccaagag tgagaaggaa attgaaacct agactcattg actggcaaga tgtccccaga 9840
ggctctcatt cagcaataaaa attctcacct tcacccaggc cactgagtgt tcagatttgc 9900
atgcggatcc actagtctca gagcggccgg ggtcgacgaa ttcgagctcg gtaccttaa 9960
gaccaatgac ttacaaggca gctgtagatc tttagccactt tttaaaagaa aaggggggac 10020
tggaagggct aattcactcc caacgaagac aagatcgcta gcgatatctc cggatttatt 10080
tgtgaaatth gtgatgctat tgctttatth gaccggtctg ctttttgctt gtactgggtc 10140
tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagggga acccactgct 10200
taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgct tcaagtagtg tgtgccgctc tgttgtgtga 10260
ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt tttagtcagtg tggaaaatct ctagcaacgc 10320
gtccatctgt tgtttgcccc tccccctgct cttccttgac cctggaagggt gccactcca 10380
ctgtcctttc ctaataaaaat gaggaaattg catcgactg tctgagttagg tgtcattcta 10440
ttctgggggg tgggtggggg cagcacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc 10500
atgctgggga tgcggtgggc tctatgggta cccaggtgct gaagaattga cccggttcct 10560
cctgggcccag aaagaagcag gcacatcccc ttctctgtga cacaccctgt ccacgcccct 10620
ggttcttagt tccagcccca ctcataggac actcatagct caggagggct ccgccttcaa 10680
tcccaccctg taaagtactt ggagcggctc ctccctccct catcagccca ccaaaccaaa 10740
cctagcctcc aagagtggga agaaatataa gcaagatagg ctattaagtg cagagggaga 10800
gaaaatgcct ccnnnccgc gggtagtagt tcatgtcatc ttattatca gtatttataa 10860
cttgcaaaaga aatgaatatc agagagttag aggaacttgt ttattgcagc ttataatggt 10920
tacaataaaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag catttttttc actgcattct 10980
agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggcteta gctatcccgc 11040
ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc cgccattct ccgcccctg 11100
gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctggcctct gagctattcc 11160

ES 2 747 817 T3

```

agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg cgtcgagacg tacccaattc 11220
gccctatagt gagtogtatt acgcgcgctc actggcgcgtc gttttacaac gtcgtgactg 11280
ggaaaaccct ggcgttacc cacttaatcg ccttgccagca catccccctt tcgccagctg 11340
gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg 11400
cgaatggcgc gacgcgccct gttagcgcgc attaaagcgc gcgggtgagg tggttacgcg 11460
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctc agcgcgcgct cctttcgctt tcttcccttc 11520
ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 11580
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 11640
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgcccct ttgacgttgg agtccacggt 11700
ctttaatagt ggactcttgg tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggcttattc 11760
ttttgattta taagggtatt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 11820
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttc 11868

```

<210> 5

<211> 6651

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sólo sSIN

10

<220>

<221> característica_misc

<222> (0)...(0)

<223> n=a, t, c, or g

15

<400> 5

```

caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatt ttctaaatac 60
attcaaatat gtatocgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa 120
aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat 180
tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc 240
agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga 300
gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg 360
cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgcccata cactattctc 420
agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag 480
taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtataa cactgcggcc aactacttc 540
tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg 600
taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg 660
acaccacgat gctctgtagc atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac 720
ttactctagc tttccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac 780
cacttctgcg ctcgccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccgggtg 840
agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg 900
tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg 960
agataggtgc ctcaactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac 1020
tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctagggtgaag atcctttttg 1080
ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt cactgagcg tcagaccccg 1140
tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 1200
aaacaaaaaa accacgcgta ccagcgtggt tttgtttggc ggatcaagag ctaccaactc 1260
tttttcgaaa ggttaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt 1320
agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgctctgct 1380
taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 1440
caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac 1500
agcccagcct ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 1560
aaagcggcac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggctg 1620
gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 1680
tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttttgt atgctcgtca gggggcggga 1740
gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt 1800
ttgtcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt 1860
ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 1920
aggaagcggg agagcggcca atacgcaaac cgctctccc cgccgcttgg ccgattcatt 1980
aatgcagctg gcacgacagg tttcccactt ggaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta 2040
atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggttttaca ctttatgctt ccggctcgta 2100
tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaaat ttcacacagc aaacagctat gaccatgatt 2160

```

ES 2 747 817 T3

acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaacaaaa gctggagctg caagcttggc 2220
cattgcatac gttgtatcca tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaacat 2280
taccgccatg ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggcat 2340
tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgctg 2400
gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa 2460
cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta ttacggtaa actgccact 2520
tggcagtaga tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggt 2580
aatggcccag ctggcattat gccagtaga tgacctatg ggactttcct acttggcagt 2640
acatctacgt attagtcatc gctattacca tgggtgatgcy gttttggcag tacatcaatg 2700
ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg 2760
ggagtttgtt ttggcaccia aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgcc 2820
cattgacgca aatggcggtt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt 2880
tagtgaacca gggctctctc gtttagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact 2940
aggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag ctgctctga gtgcttcaag tagtgtgtc 3000
ccgtctgttg tgtgactcgc gtaactagag atccctcaga cccttttagt cagtgtgaa 3060
aatctctagc aaaacaaaat taagcggcag gaacaggagc ttgaaagcga aagggaaacc agaggagctc 3120
tctcgacgca ggactcggct tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcgcgactg 3180
gtgagtacgc caaaaatttt gactagcggg ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc 3240
gtcagtatta agcgggggag aattagatcg cgatgggaaa aaattcggtt aaggccaggg 3300
ggaaagaaaa aatataaatt aaaacatata gtatgggcaa gcagggagct agaacgattc 3360
gcagttaatc ctggcctggt agaaacatca gaaggctgta gacaaact gggacagcta 3420
caaccatccc ttcagacagc atcagaagaa cttagatcat tatataatc agtagcaacc 3480
ctctattgtg tgcataaaag gatagagata aaagacacca aggaagctt agacaagata 3540
gaggaagagc aaaacaaaat taagcggcag gcacagcaag cggccgctga tcttcagacc 3600
tggaggagga gatatgaggg acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa 3660
aattgaacca ttaggagtag caccaccaa ggcaagaga agagtggctc agagagaaaa 3720
aagagcagtg ggaataggag ctttgttctc tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat 3780
ggcgagcagc tcaatgacgc tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga 3840
gcagcagaac aatttgctga gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt 3900
ctgggcatc aagcagctcc aggcaagaat cctggctgtg gaagatacc taaaggatca 3960
acagctcctg gggatttggg gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg 4020
gaatgctagt tgggtaata aatctctgga acagatttg aatcacagc cctggatgga 4080
gtgggacaga gaaattaaca attacacaag cttaatacac tccttaattg aagaatcgca 4140
aaaccagcaa gaaaagaatg aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagtttgtg 4200
gaattggttt aacataacaa attggctgtg gtatataaaa ttattcataa tgatagtagg 4260
aggctgggta ggttaagaa tggtttttgc tgtacttct atagtgaata gatttaggca 4320
gggatattca ccattatcgt ttcagaccca cctcccaacc ccgaggggac ccgacaggcc 4380
cgaaggaata gaagaagaag gtggagagag agacagagac agatccattc gatttagtga 4440
cggatctcga cggatcagat agcgggacaa atggcagtat tcatccaca ttttaaaaga 4500
aaagggggga tgggggggta cagtgcaagg gaaagaatag tagacataat agcaacagc 4560
atacaaaact aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaatttctg ggtttattac 4620
agggacagca gagatccagt ttggatcgtc gacatcggc gtgaattcac tagtggatcg 4680
ctctcgagga tccactagtt ctagagcggc cggggtcgac gaattcgagc tccgtacctt 4740
taagaccaat gacttacaag gcagctgtag atcttagcca ctttttaaaa gaaaagggg 4800
gactggaagg gctaattcac tcccacgaa gacaagatcg ctagcgatat ctccggattt 4860
atthgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta ttgaccgggt ctgctttttg cttgtactgg 4920
gtctctctgg ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact 4980
gcttaagcct caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgcc gctgtttgtg 5040
tgactctggt aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaa tctctagcaa 5100
cgctccatc tgttgtttgc ccctccccg tgccttctct gaccctgaa ggtgccactc 5160
ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 5220
ctattctggg ggggtggggtg gggcagcaca gcaaggggga ggattggaa gacaatagca 5280
ggcatgctgg ggatcgggtg ggctctatgg gtaccagggt gctgaagaat tgaccgggt 5340
cctcctgggc cagaaagaag caggcacatc cccttctctg tgacacacc tgtccacgcc 5400
cctggttctt agttccagcc ccaactcatg gacactcata gctcaggagg gctccgcctt 5460
caatcccacc cgctaagta cttggagcgg tctctccctc cctcatcagc ccaccaaacc 5520
aaactagcc tccaagagtg ggaagaaatt aaagcaagat aggtattaa gtgcagaggg 5580
agagaaaatg cctcnnnnc cgcggtagt agttcatgct atcttattat tcagtattta 5640
taacttgcaa agaaatgaat atcagagagt gagaggaaat tgtttattgc agcttataat 5700
ggttacaaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat 5760
tctagttgtg gtttgcctca actcatcaat gtatcttctc atgtctggct ctactatcc 5820
cgccoctaac tccgcccctc ccgcccctaa ctccgcccag ttccgcccct tctccgccc 5880
atggtcagct aattttttt atttatgcag aggcggaggg cgctcggcc tctgagctat 5940

ES 2 747 817 T3

```
tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag gcctaggcct ttgcgtcgag acgtacccaa 6000
ttcgccctat agtgagtcgt attacgcgcg ctactggcc gtcgttttac aacgtcgtga 6060
ctgggaaaac cctggcggtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatccc ctttcgccag 6120
ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa 6180
tggcgaatgg cgcgacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tggtggttac 6240
gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgccc gtcctttcg ctttcttccc 6300
ttcctttctc gccacgttcg cggctttcc ccgtcaagct ctaaactcggg ggctcccttt 6360
agggttccga tttagtgctt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt agggtgatgg 6420
ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac 6480
gttctttaat agtggactct tgttccaac tgaacaaca ctcaacccta tctcggctca 6540
ttctttgat ttataaggga ttttgccgat ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat 6600
ttaacaaaaa ttaacgcga attttaacaa aatattaacg tttacaattt c 6651
```

REIVINDICACIONES

1. Un gen de gamma-globina humano mutado, en donde el gen de gamma-globina humana mutado codifica una proteína que comprende la SEC ID NO: 1.
- 5 2. El gen de la gammaglobina humana mutado de la reivindicación 1, en donde el gen de la gammaglobina humana mutado tiene una identidad de secuencia del 70% o mayor que la SEQ ID NO: 2.
3. Un vector de expresión lentiviral capaz de corregir genéticamente la anemia falciforme o la β -talasemia o reducir los síntomas de la misma, que comprende el gen de la gammaglobina humana mutada de la reivindicación 1.
4. El vector de expresión lentiviral de la reivindicación 3, que comprende además:
 - 10 una secuencia señal heteróloga de poliA inversa de una secuencia viral 3'LTR en una cadena principal de vector lentiviral SIN estándar; y
 - una o más secuencias USE derivadas de una señal de poliA tardía de SV40 en una región de delección de U3 de una cadena principal de vector lentiviral SIN estándar.
5. El vector de expresión lentiviral de la reivindicación 4, que comprende además una o más secuencias de aislador funcionales de longitud reducida derivadas de CHS4 flanqueantes.
- 15 6. El vector de expresión lentiviral de la reivindicación 5, que comprende además uno o más elementos de una región de control de locus de beta-globina clonada en orientación inversa a una unidad de transcripción viral.
7. El vector de expresión lentiviral de la reivindicación 5, que comprende además un elemento potenciador específico del linaje eritroide.
8. Células madre hematopoyéticas que tienen un vector de expresión lentiviral como se establece en cualquiera de las reivindicaciones 3-7.
- 20 9. Las células madre hematopoyéticas de la reivindicación 8, para usar en el tratamiento de la anemia falciforme o la talasemia β en un sujeto que lo necesite, en donde las células madre hematopoyéticas se han preparado mediante la transfección de células madre hematopoyéticas autólogas (HSC) del sujeto con el vector de expresión lentiviral modificado.
- 25 10. Las células madre hematopoyéticas para usar según la reivindicación 9, en donde El sujeto es un sujeto humano.
11. Las células madre hematopoyéticas para uso según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde el sujeto se trata adicionalmente con acondicionamiento de intensidad reducida antes del trasplante.
12. Un gen de gammaglobina humana mutada de la reivindicación 1 para usar en el tratamiento de la anemia falciforme o la talasemia β en un sujeto que lo necesite;
- 30 en donde el vector de expresión lentiviral expuesto en una cualquiera de las reivindicaciones 3-7 se introduce en células madre hematopoyéticas autólogas (HSCs) del sujeto mediante transfección; y
- en donde las HSC transfectadas son para trasplante en el sujeto.
13. El gen de la gammaglobina humana mutada para usar según la reivindicación 12, en donde El sujeto es un sujeto humano.
- 35 14. El gen de la gammaglobina humana mutada para usar según la reivindicación 12 o 13, en donde el sujeto se trata adicionalmente con acondicionamiento de intensidad reducida antes del trasplante.

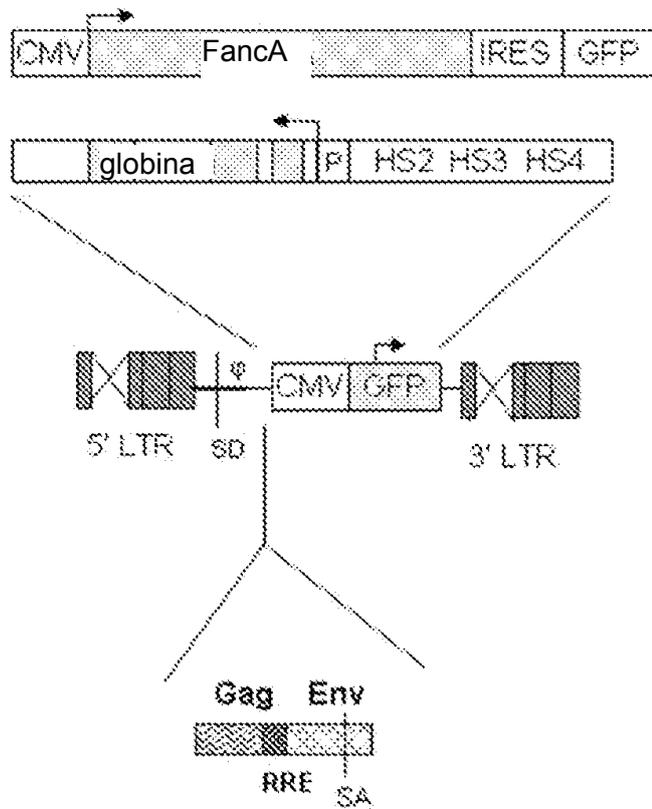


Figura 1A

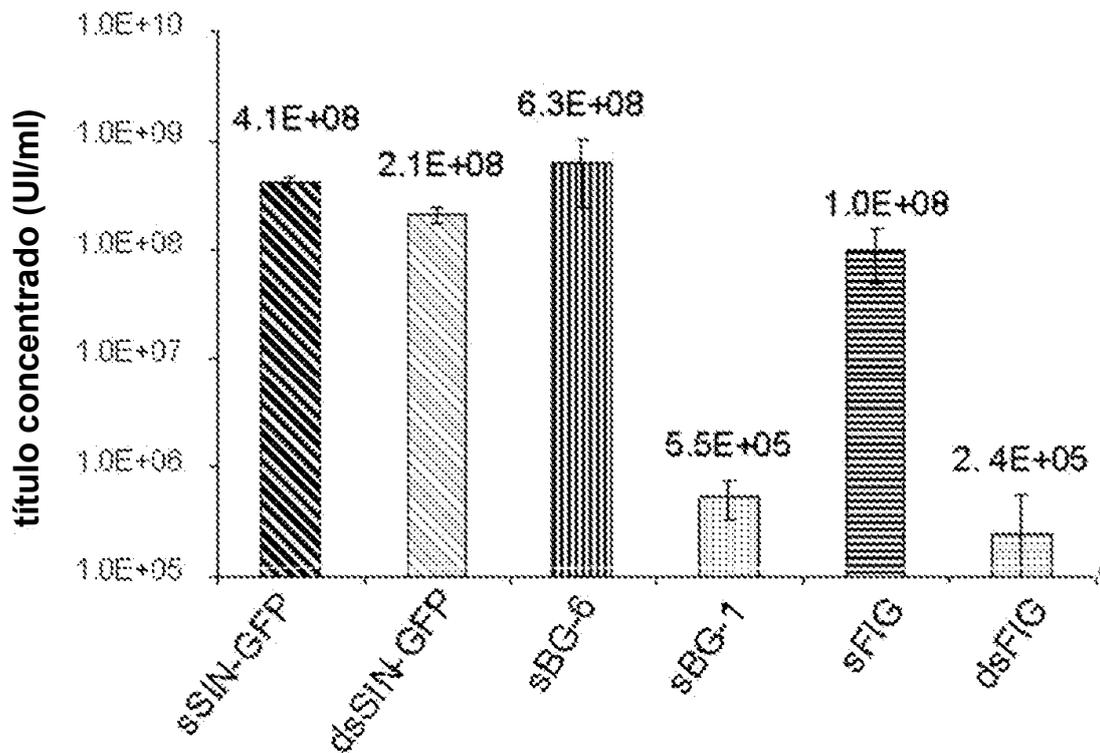


Figura 1B

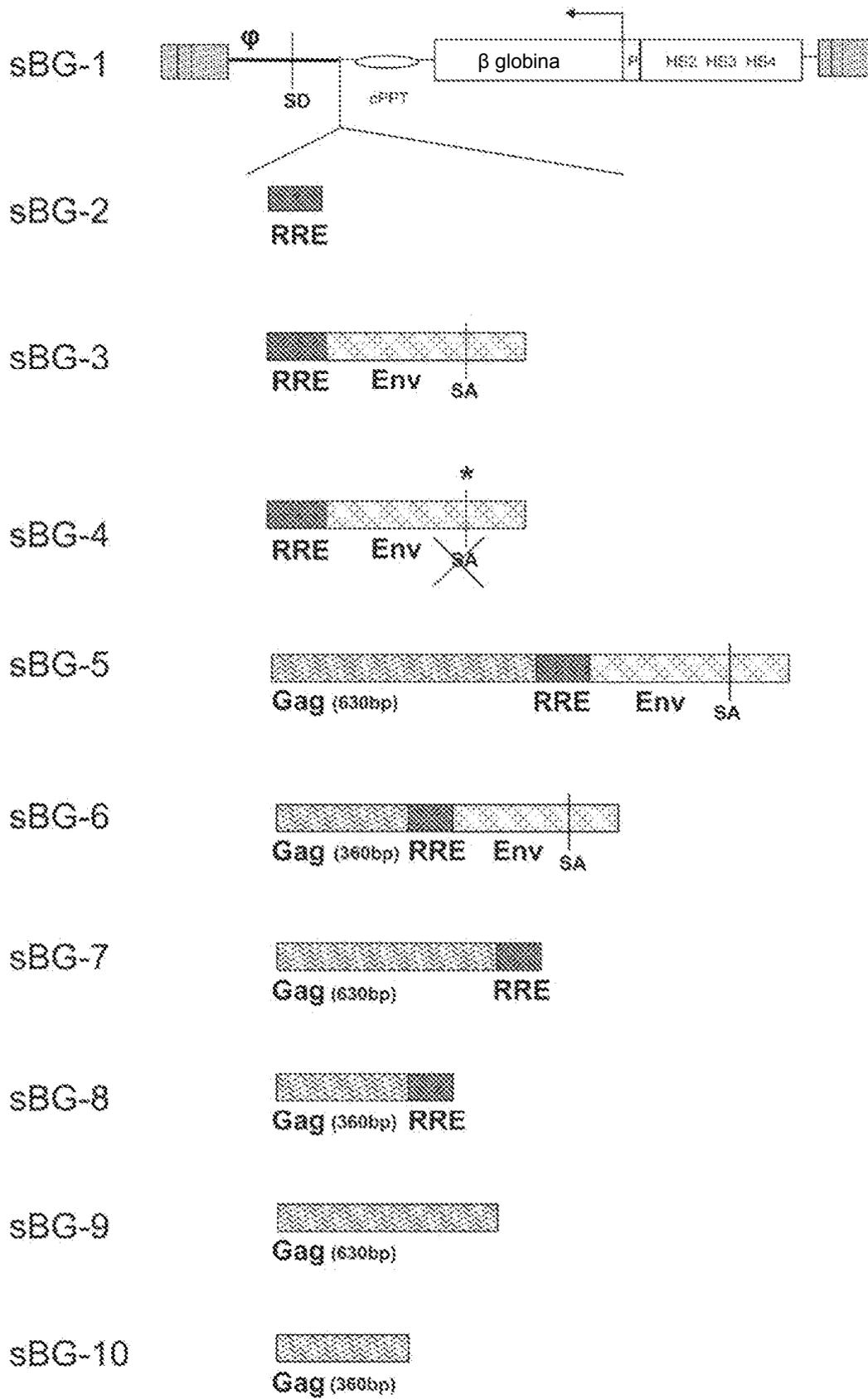


Figura 2

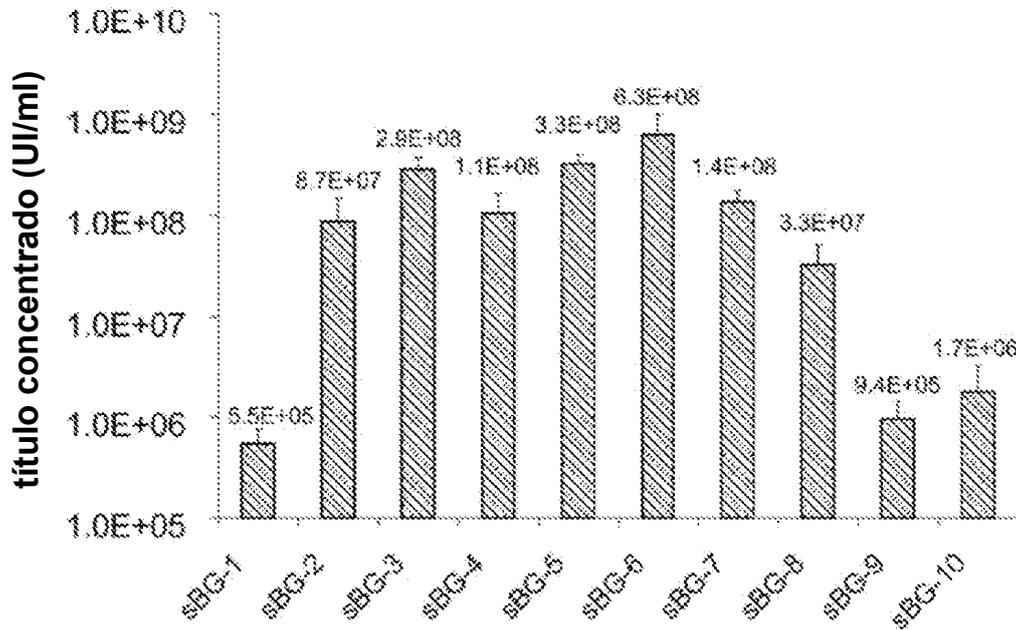


Figura 3A

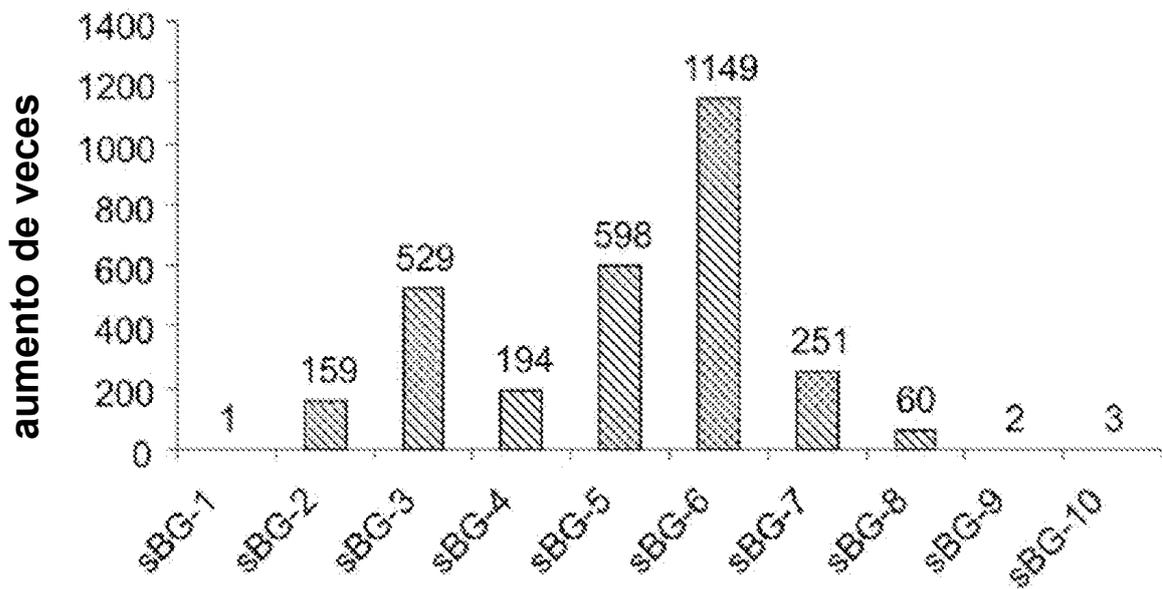


Figura 3B

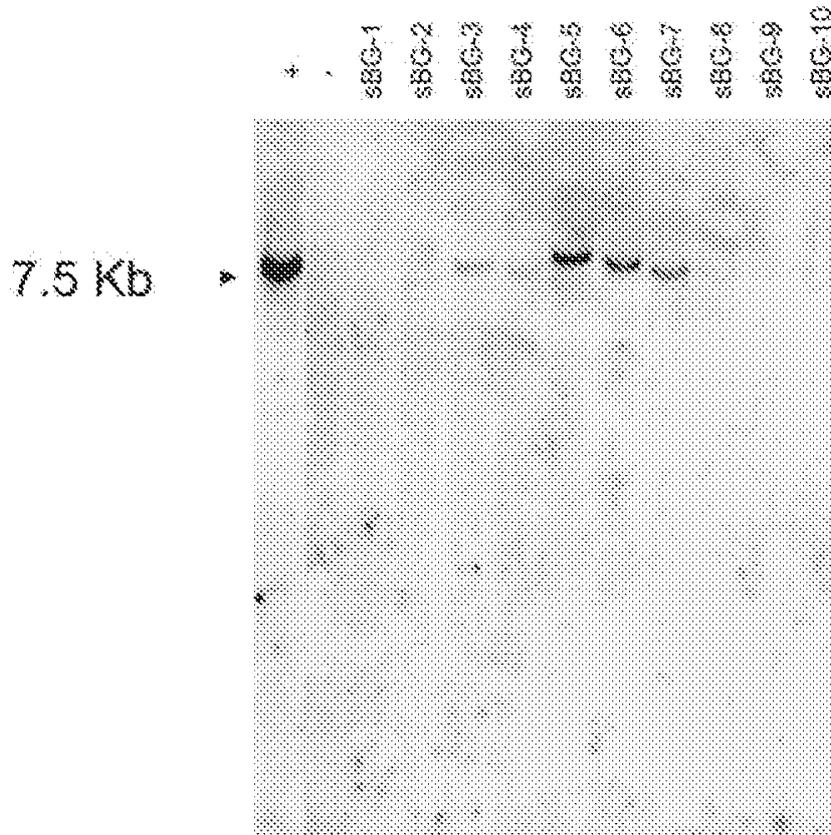


Figura 4A

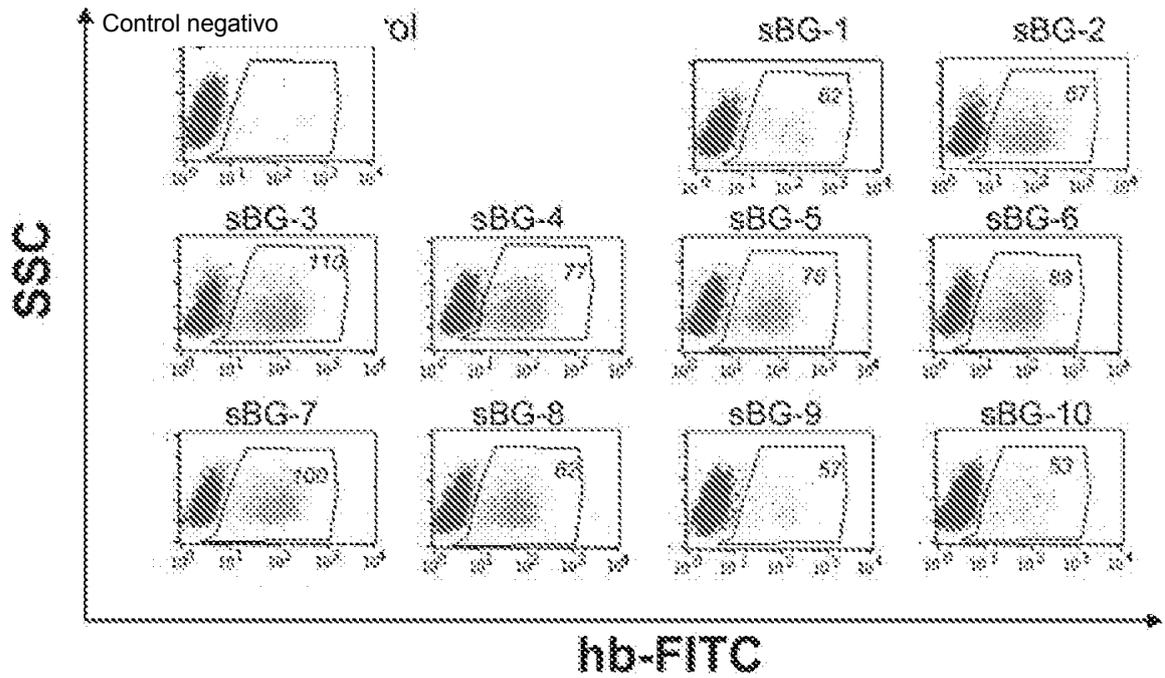


Figura 4B

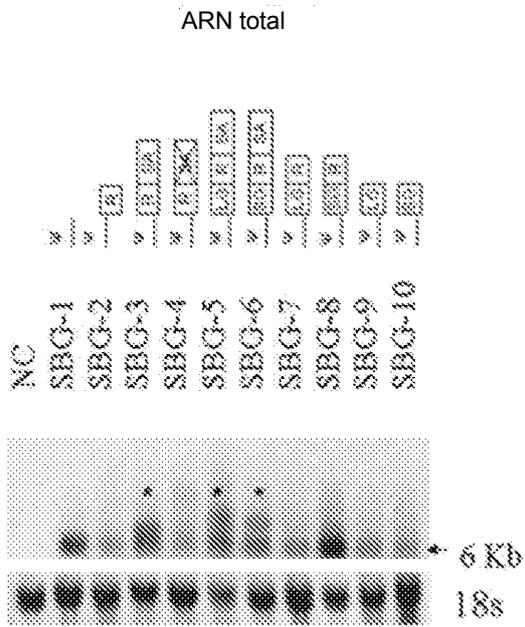


Figura 5A

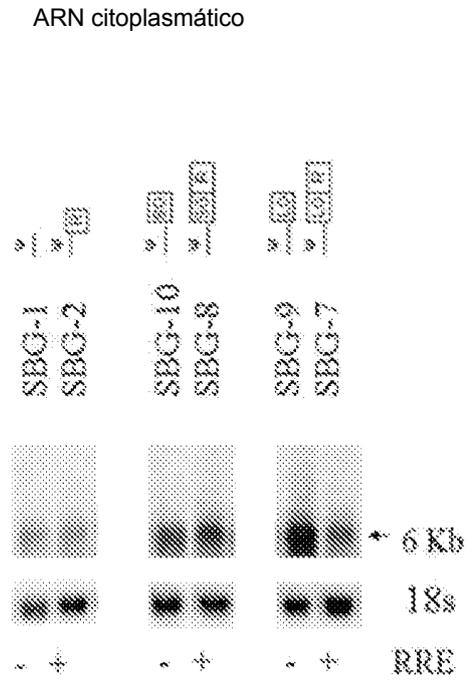


Figura 5B

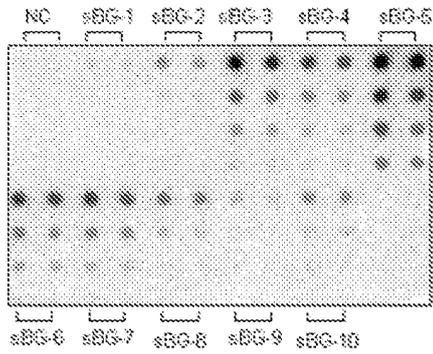


Figura 6A

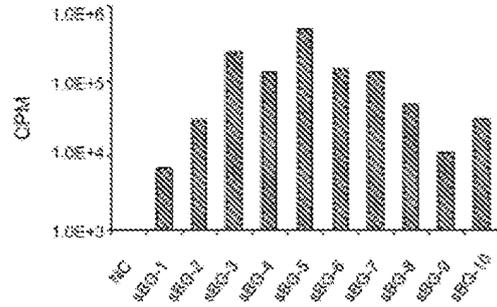


Figura 6B

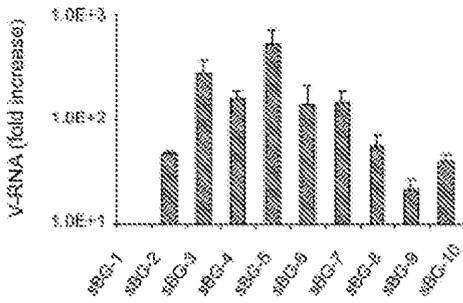


Figura 6C

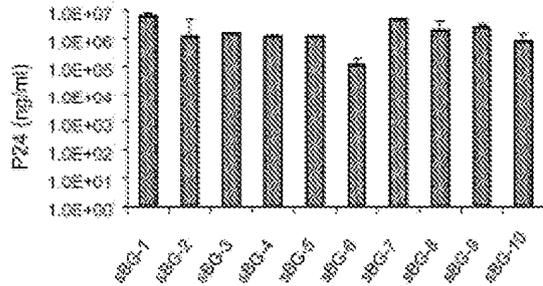


Figura 6D

Vector	RRE	NB-1	NB-2
SBG-1 ^I	-	1.00	1.00
SBG-2 ^I	+	1.82	2.40
SBG-3	+	1.91	3.34
SBG-4	+	5.01	5.14
SBG-5	+	3.35	2.76
SBG-6	+	3.45	2.42
SBG-7 ^{II}	+	4.13	2.33
SBG-8 ^{III}	+	2.18	1.70
SBG-9 ^{II}	-	6.35	NA
SBG-10 ^{III}	-	5.34	5.75

Figura 6E

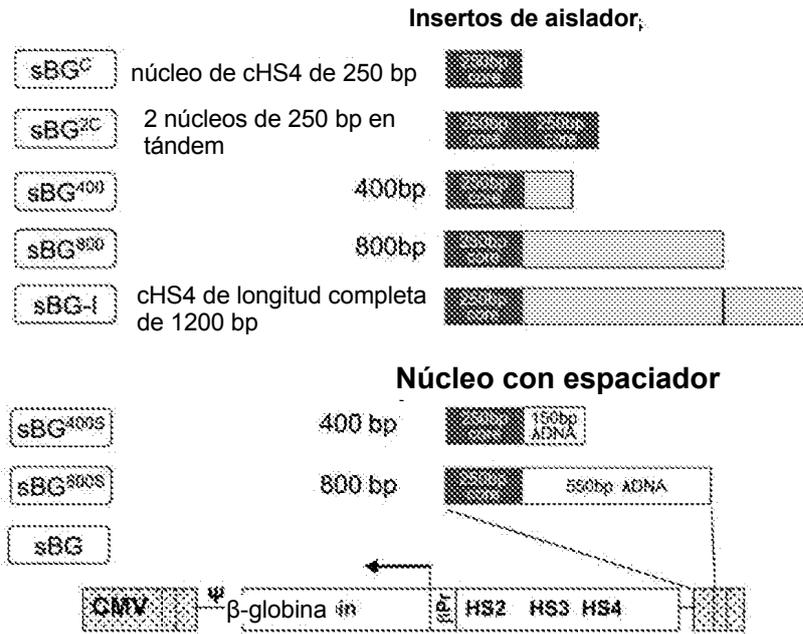
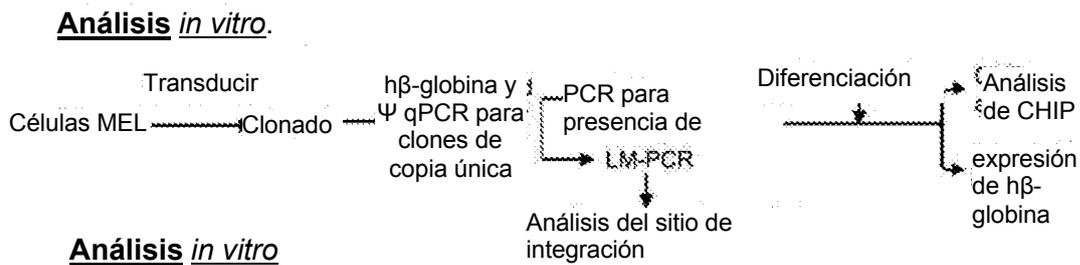


Figura 7A



Análisis *in vitro*

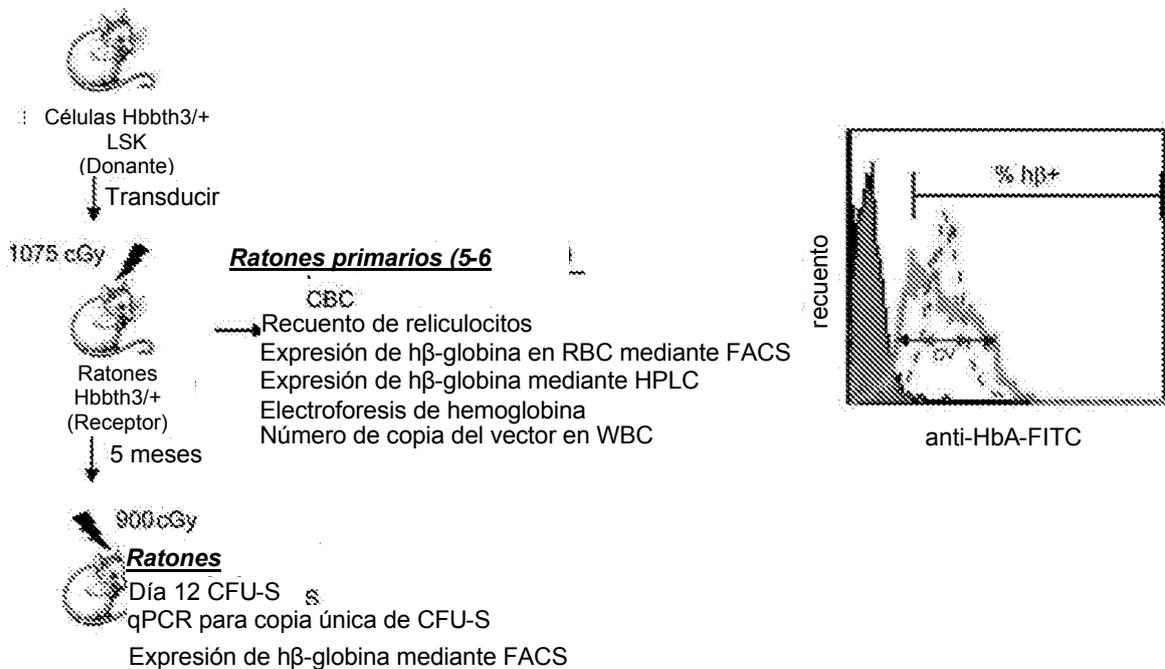


Figura 7B

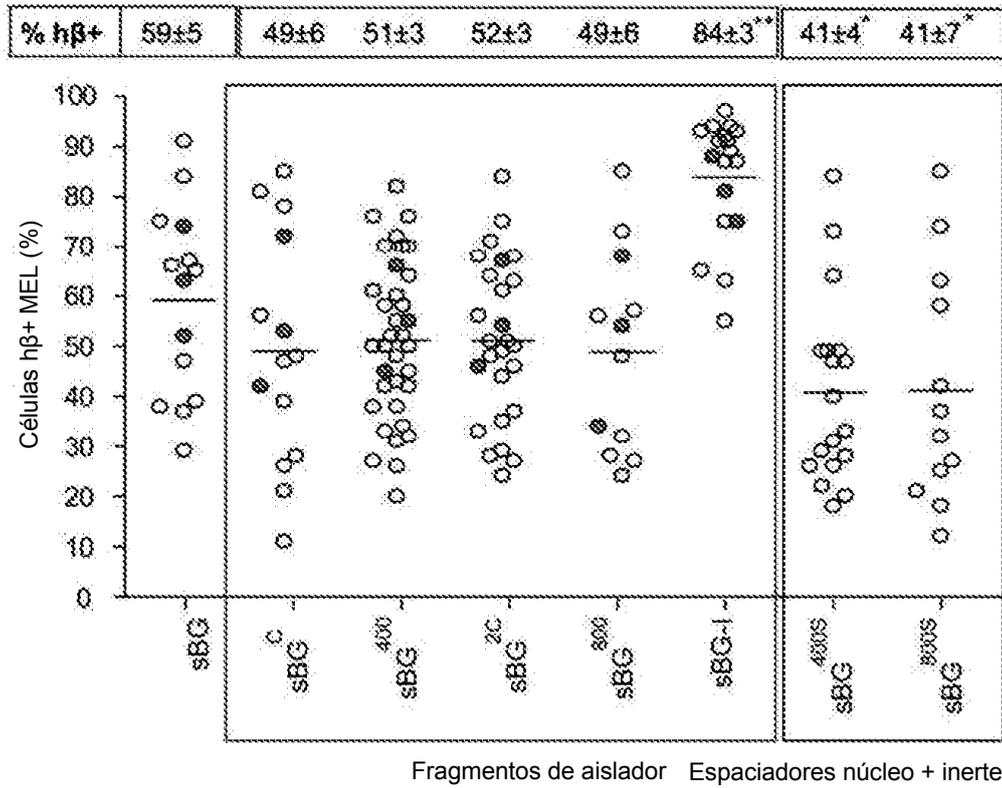


Figura 8A

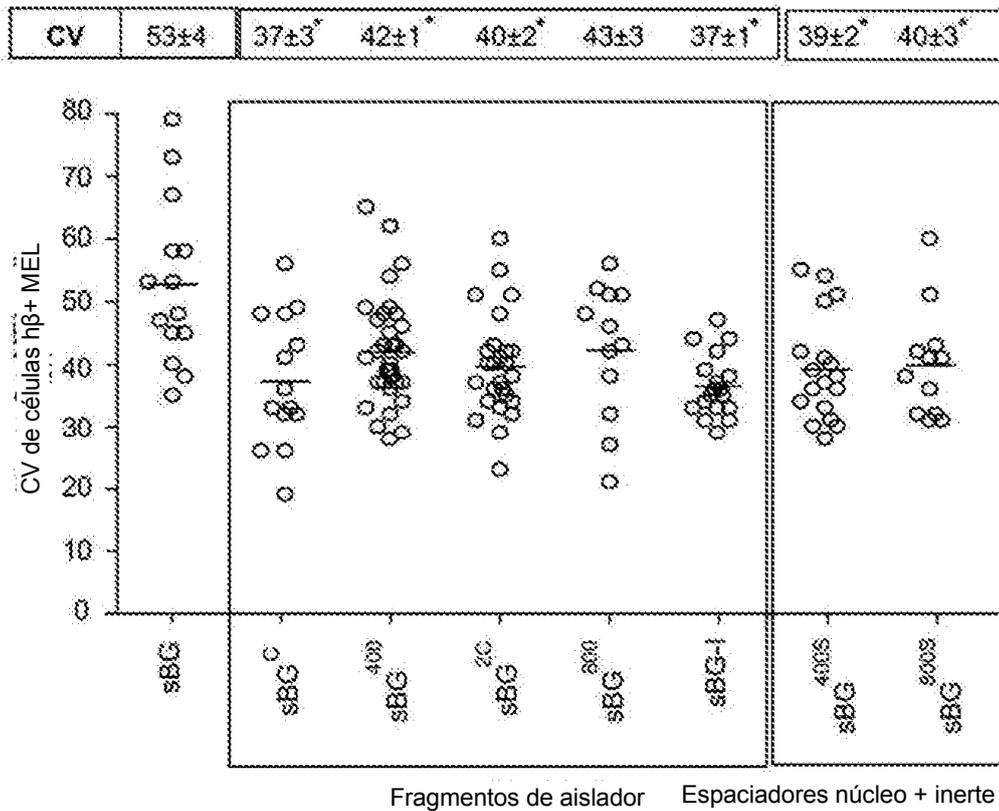


Figura 8B

FACS representativo (RBC)

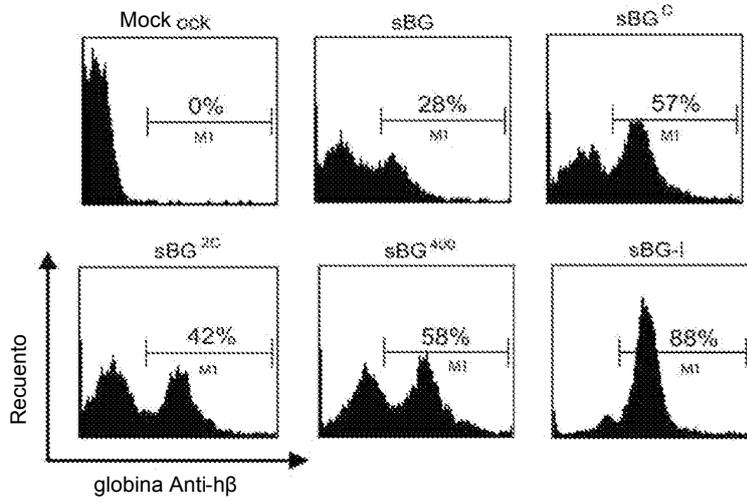


Figura 9A

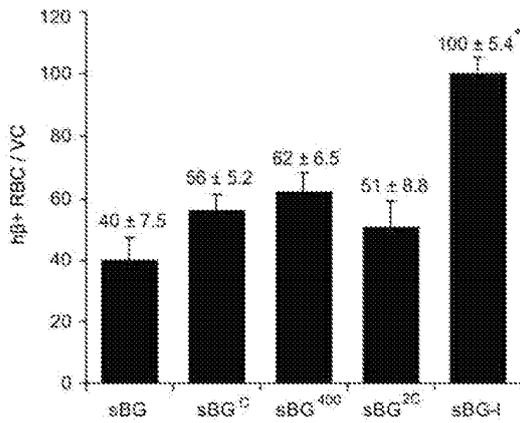


Figura 9B

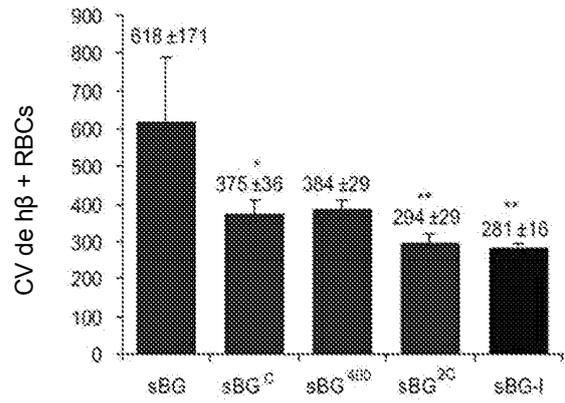


Figura 9C

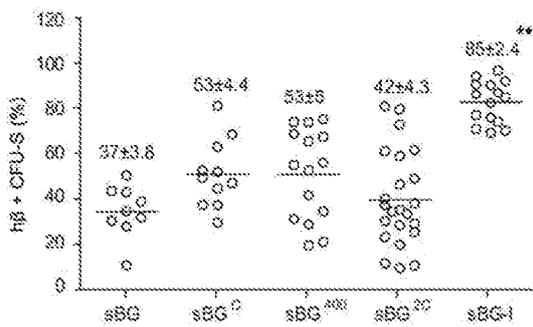


Figura 9D

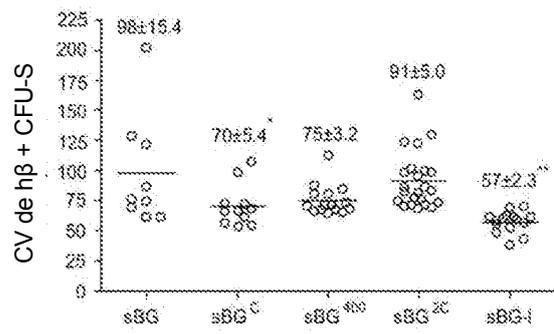


Figura 9E

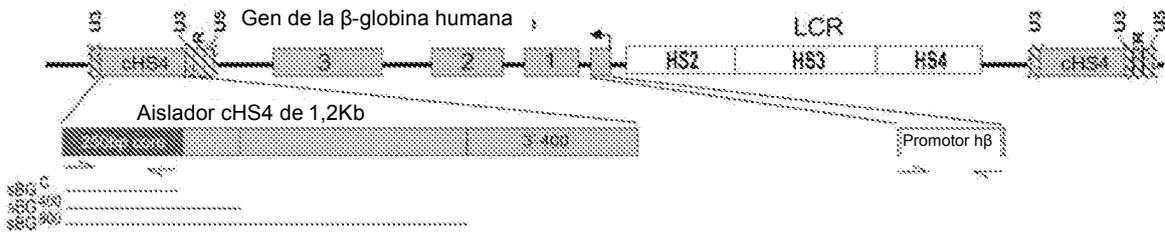


Figura 10A

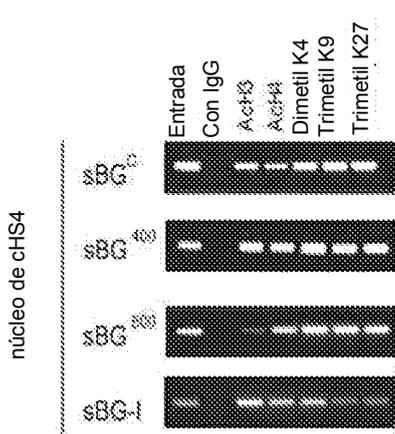


Figura 10B

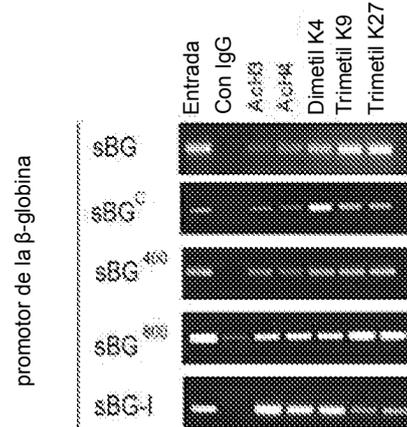


Figura 10C

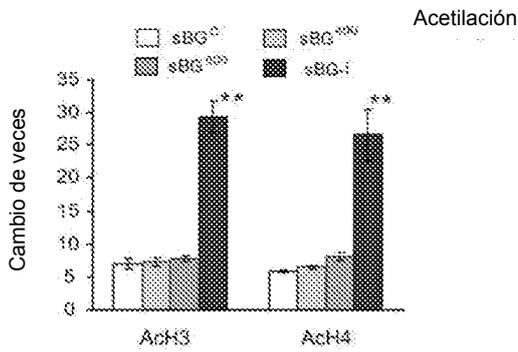


Figura 10D

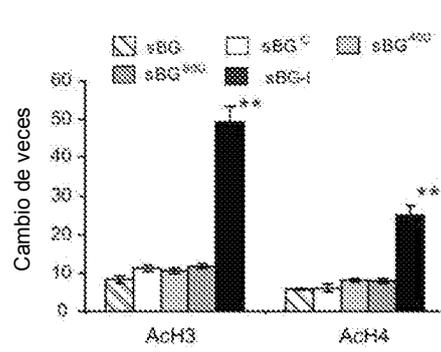


Figura 10E

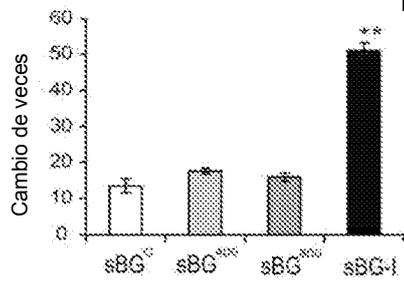
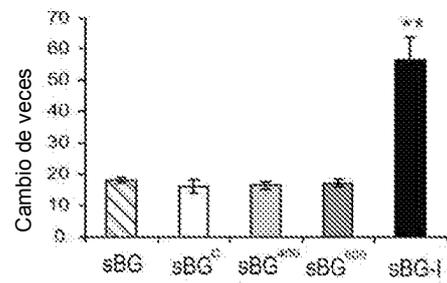


Figura 10E



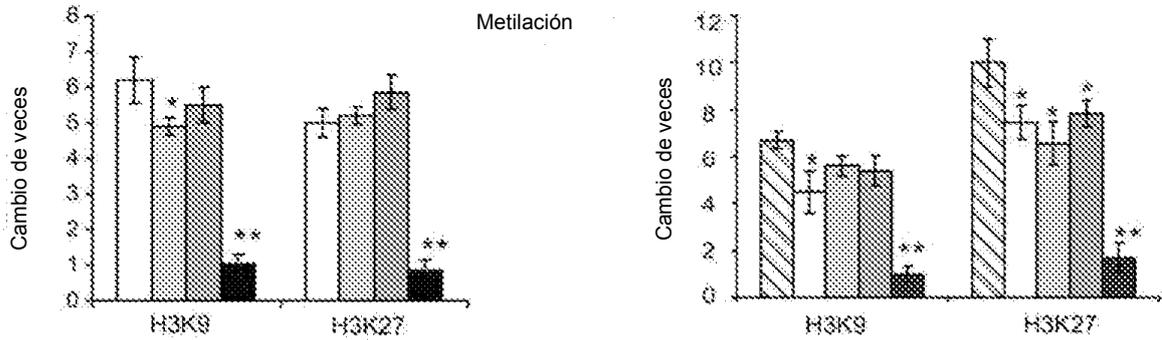


Figura 10F

Parámetros de RBC, reticulocitos y copias de vectores en ratones 24 semanas después del trasplante

	Mock (n=8)	sBG (n=8)	sBG ^{1C} (n=8)	sBG ^{20C} (n=8)	sBG ^{40C} (n=7)	sBG-I (n=8)
Hb (g/dl)	8 ± 0.2	10 ± 0.7	10 ± 0.5	10 ± 0.5	10 ± 0.3	11 ± 0.2
Hematocrito (%)	24 ± 1.5	32 ± 2.8	36 ± 1.2	38 ± 1.4	35 ± 1.6	38 ± 1.3
Recuento de reticulocitos	39 ± 2	11 ± 4	10 ± 2	12 ± 7	11 ± 3	8 ± 1*
RBC (M ¹² /l)	6.6 ± 0.4	8.6 ± 0.5	8.5 ± 0.3	7.9 ± 0.2	7.5 ± 0.2	8.9 ± 0.2
MCV (fL)	43 ± 1.4	44 ± 1.6	46 ± 1.4	45 ± 1.5	43 ± 2.2	49 ± 1.3*
MCHC (g/dL)	24 ± 1.1	28 ± 1.4	29 ± 1.6	29 ± 1.7	27 ± 1.8	33 ± 0.9*
Copia del vector	N/A	1.2 ± 0.2	1 ± 0.1	1 ± 0.1	1.2 ± 0.3	0.6 ± 0.1

Los valores representan medias ± SEM, Hb = hemoglobina, MCV = volumen corpuscular medio, MCHC = concentración de hemoglobina corpuscular media, copia de vector = número promedio de copias de vectores en leucocitos mediante qPCR

Figura 11A

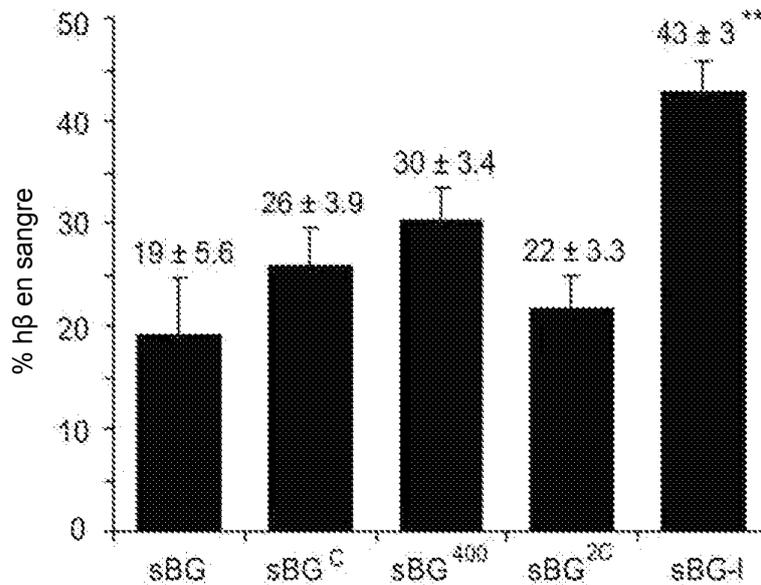


Figura 11B

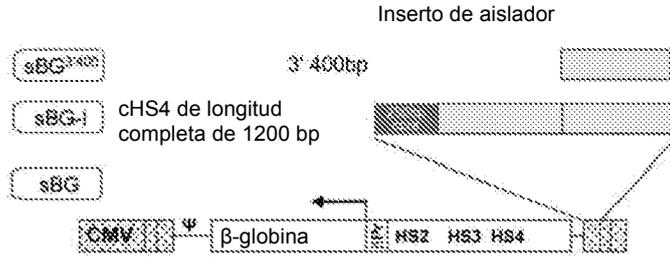


Figura 12A

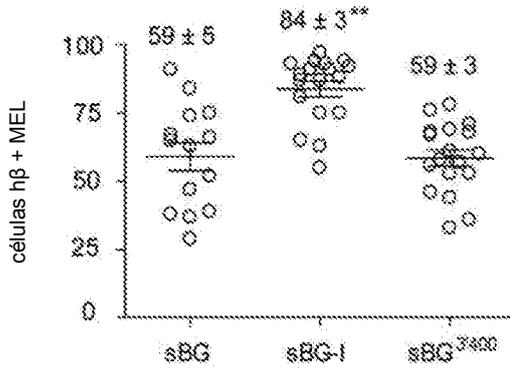


Figura 12B

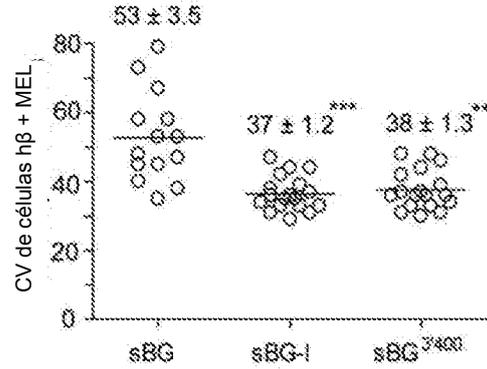


Figura 12C

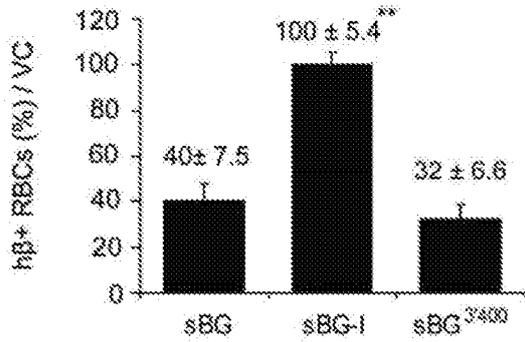


Figura 12D

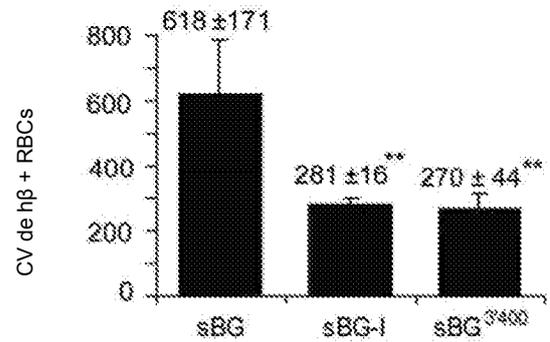


Figura 12E

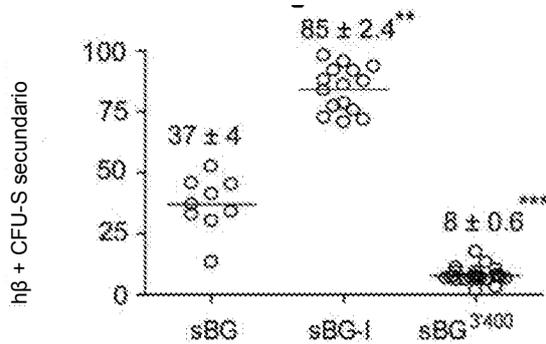


Figura 12F

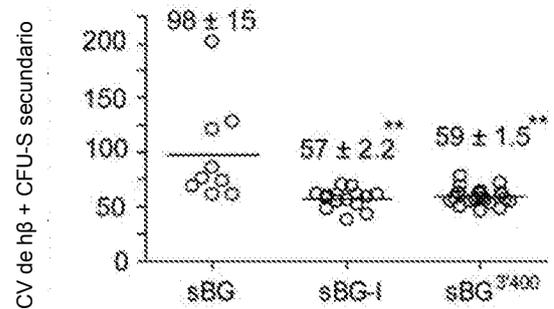


Figura 12G

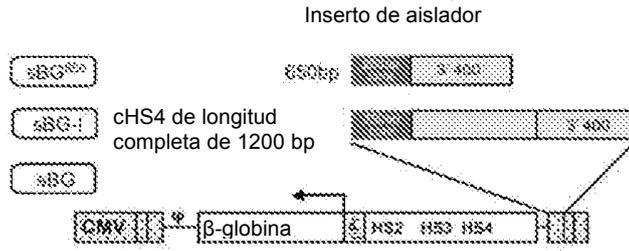


Figura 13A

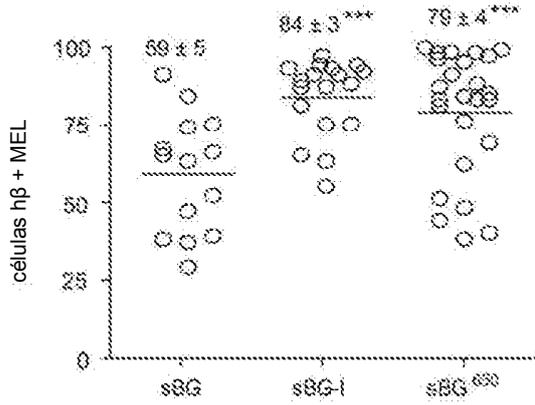


Figura 13B

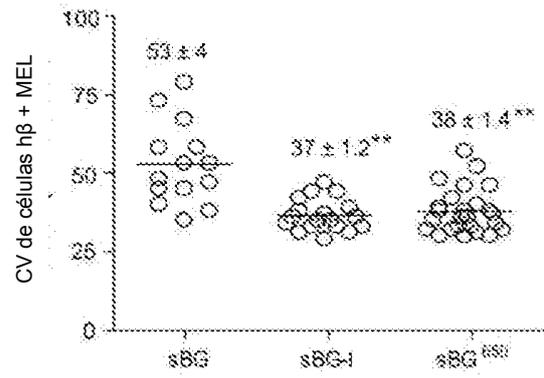


Figura 13C

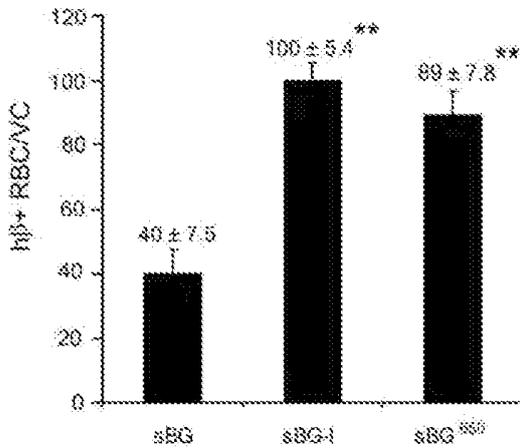


Figura 13D

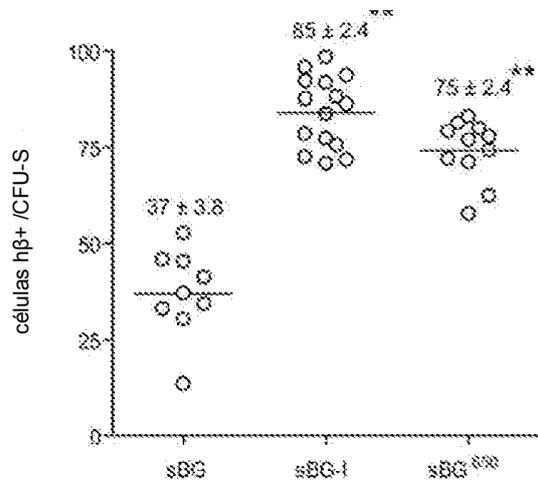


Figura 13E

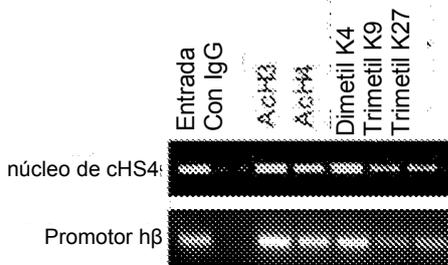


Figura 13F

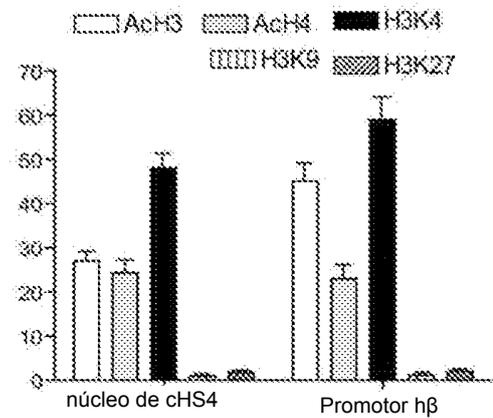


Figura 13G

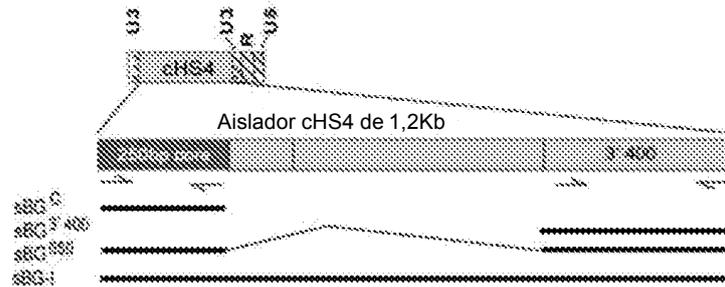


Figura 14A

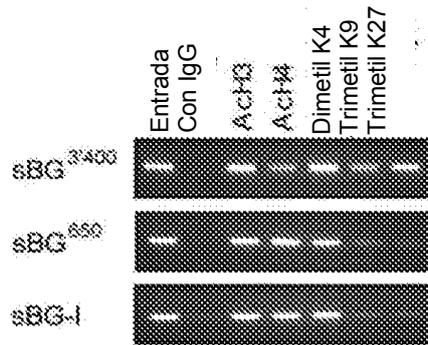


Figura 14B

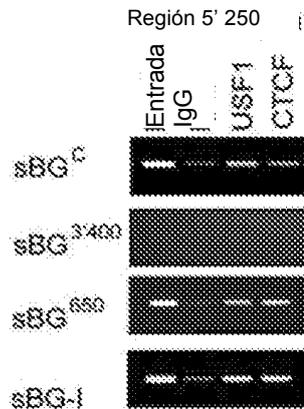


Figura 14C

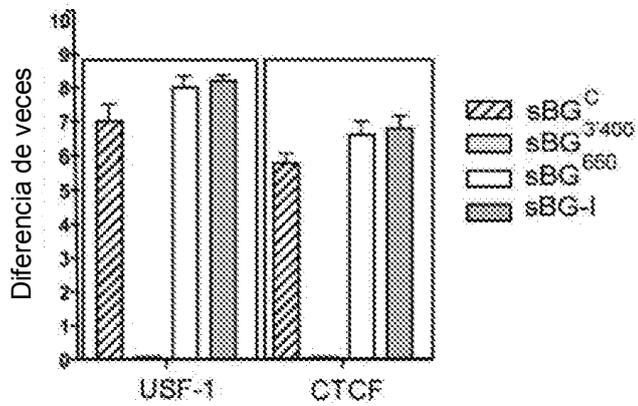


Figura 14D

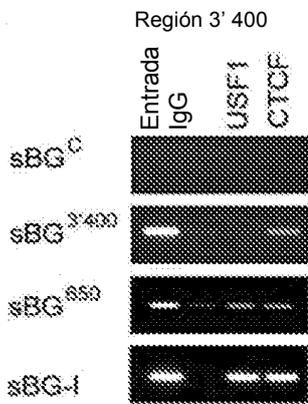


Figura 14E

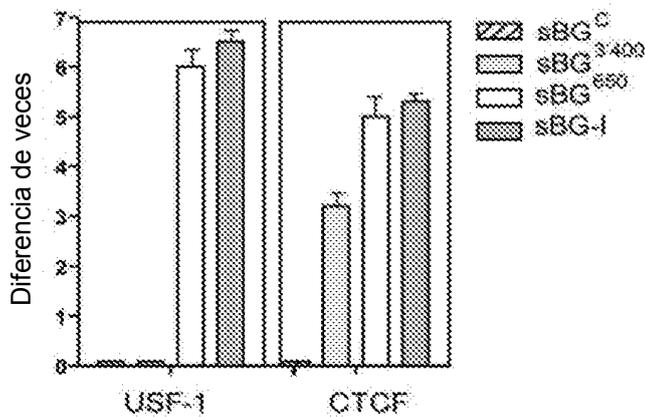


Figura 14F

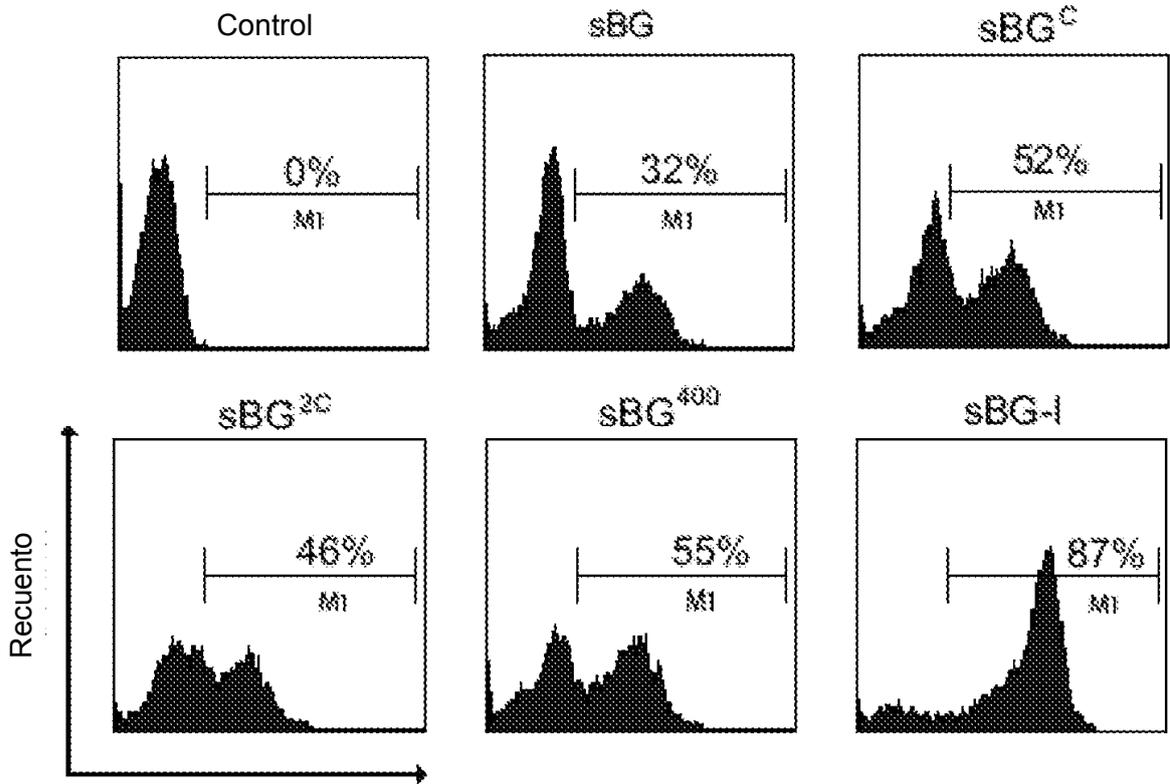


Figura 14G

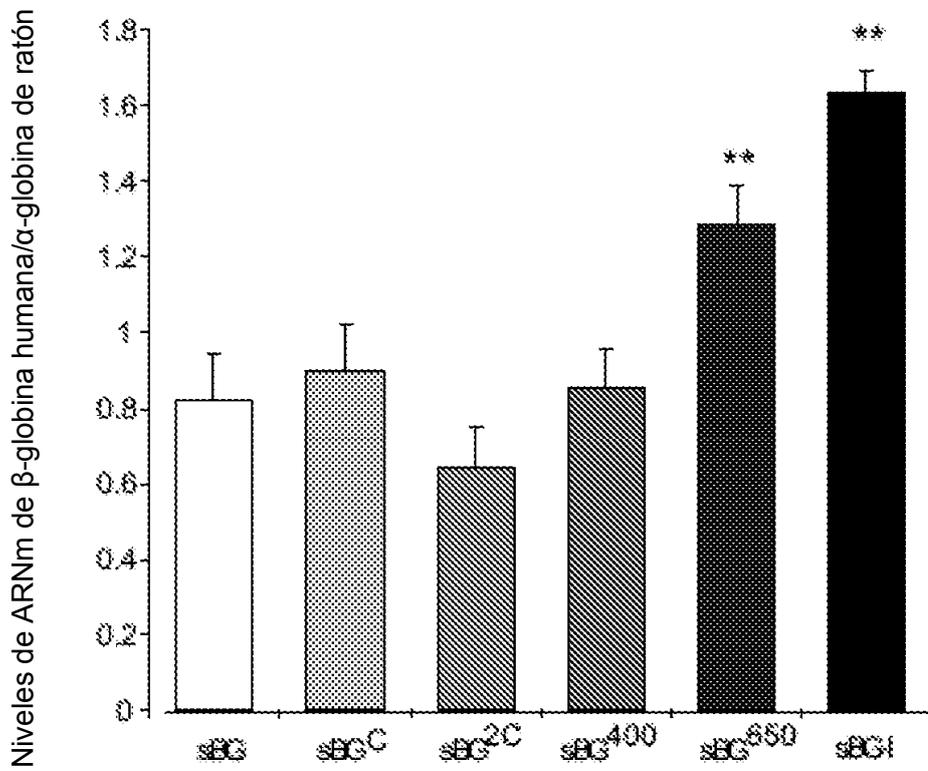


Figura 14H

ES 2 747 817 T3

Secuencias de cebador (5' -> 3')	
Núcleo F	aagccccagggatgtaaf
Núcleo R	aaagcttttccccgtafcc
promotor F de BG	tgaacacagftgtgcagaagc
promotor R de BG	cacttgc aaaggaggatgfft
Ins3'400 F	tcaaaatcatgaaggctggaa
Ins 3'400 R	ctgactccgtcctggagftg
Ins 3' F	gtctgagccgc atgttfga
Ins 3' R	gtcccctggaggtagaaga
Promotor F de necdina	ggctctgctctgatccgaag
Promotor R de necdina	gggtcgcfcaggctctactt
región F de necdina 5'	ttcagtagctgatgccaggf
región R de necdina 5'	ggggaggataccagagatggga

Figura 14I

Clon #	Símbolo del gen	Identificación de genes	# Nucleotide	Cromosoma; posición	Descripción
Insulated sBG-I vector					
1	Trap	BC026826	9	107811556	TRAF Interacting protein
2	Repeat element		13		
3	Prmt3	NM_030740	7	49720743	Protein-Arginine methyl transferase
4	Rap80	NM_004457	10	117233934	member of RAS-oncogene family
5	2010310056Rik	NM_070641	5	636203764	Riken cDNA 2010310056 gene
6	Repeat element		4		
7	Flop	BC026651	4	140441749	Podoplanin encodes Type-1 integrin membrane protein
8	Sczn	NM_001001182	2	59754076	Scrm domain adjacent to zinc-finger domain 25
9	Repeat element		11		
10	Tmem57	NM_027352	4	624222264	Transmembrane protein 57
Uninsulated sBG vector					
1	Atax13	AK027516	7	82964162	Ataxin containing protein
2	Top1	NM_010556	12	13117451	T-complex protein functions as a molecular chaperone
3	Cdkn3	AK0212426	14	45211475	Cyclic-dependent kinase associated protein
4	Ptdfr	NM_06574	12	7031136	Phospholipase C beta 3
5	Repeat element		3		
6	Dusp11	NM_028099	5	8529567	Dual specific phosphatase functions in nuclear mRNA metabolism
7	nar1	NM_029766	1	193273654	nucleic acid regulated nuclear matrix associated protein
8	Repeat element		1		
9	Rimml	NM_052279	1	22792719	regulator of synaptic membrane exocytosis 1
10	Adam12	NM_007401	7	141295540	a disintegrin and metalloprotease domain 12

Figura 14J

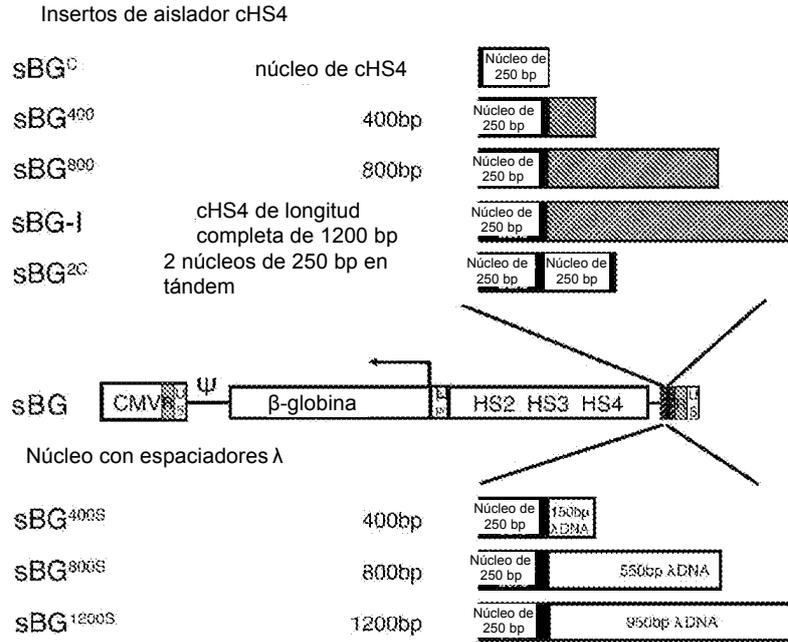


Figura 15A

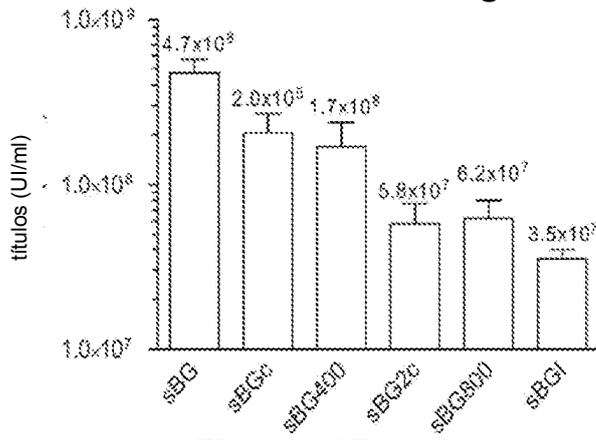


Figura 15B

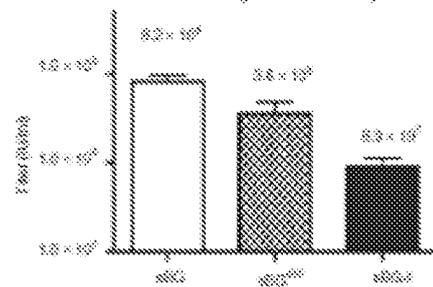


Figura 15C

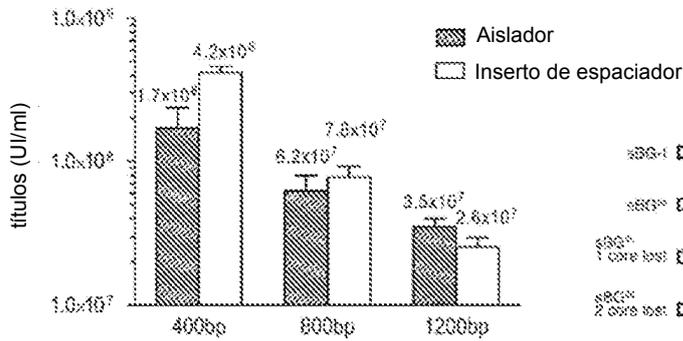


Figura 15D

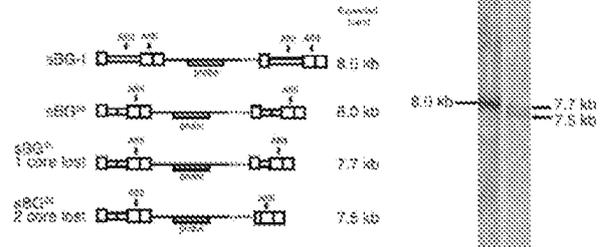


Figura 15E

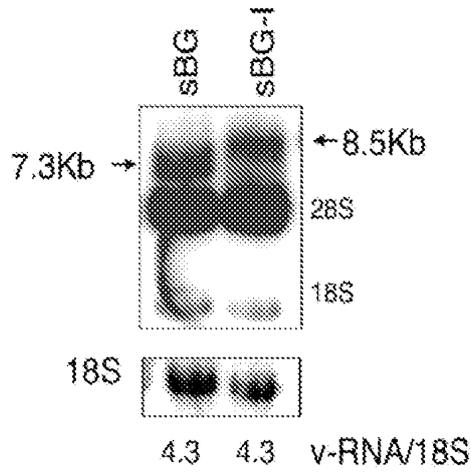


Figura 16A

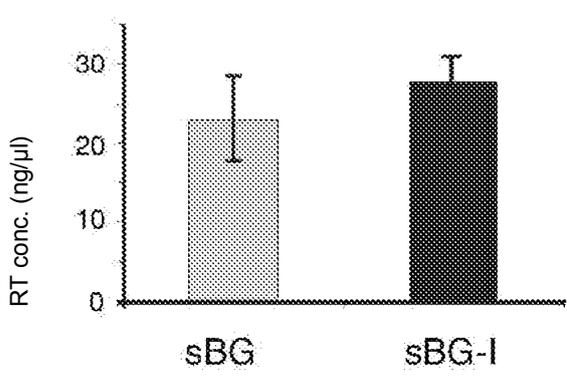


Figura 17A

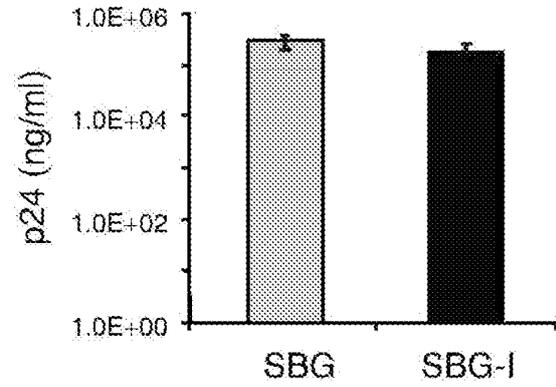


Figura 17B

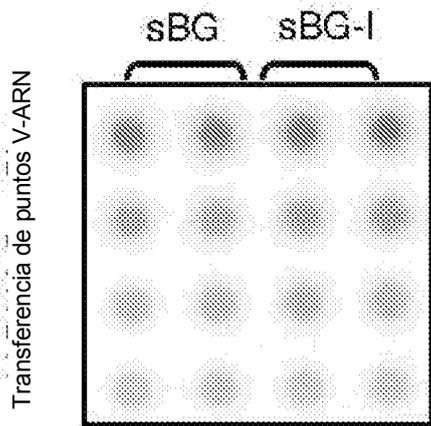


Figura 17C

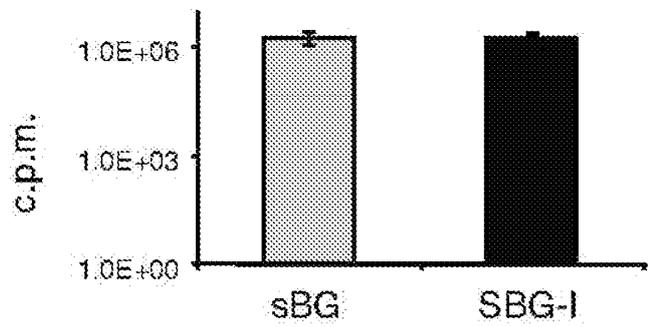


Figura 17D

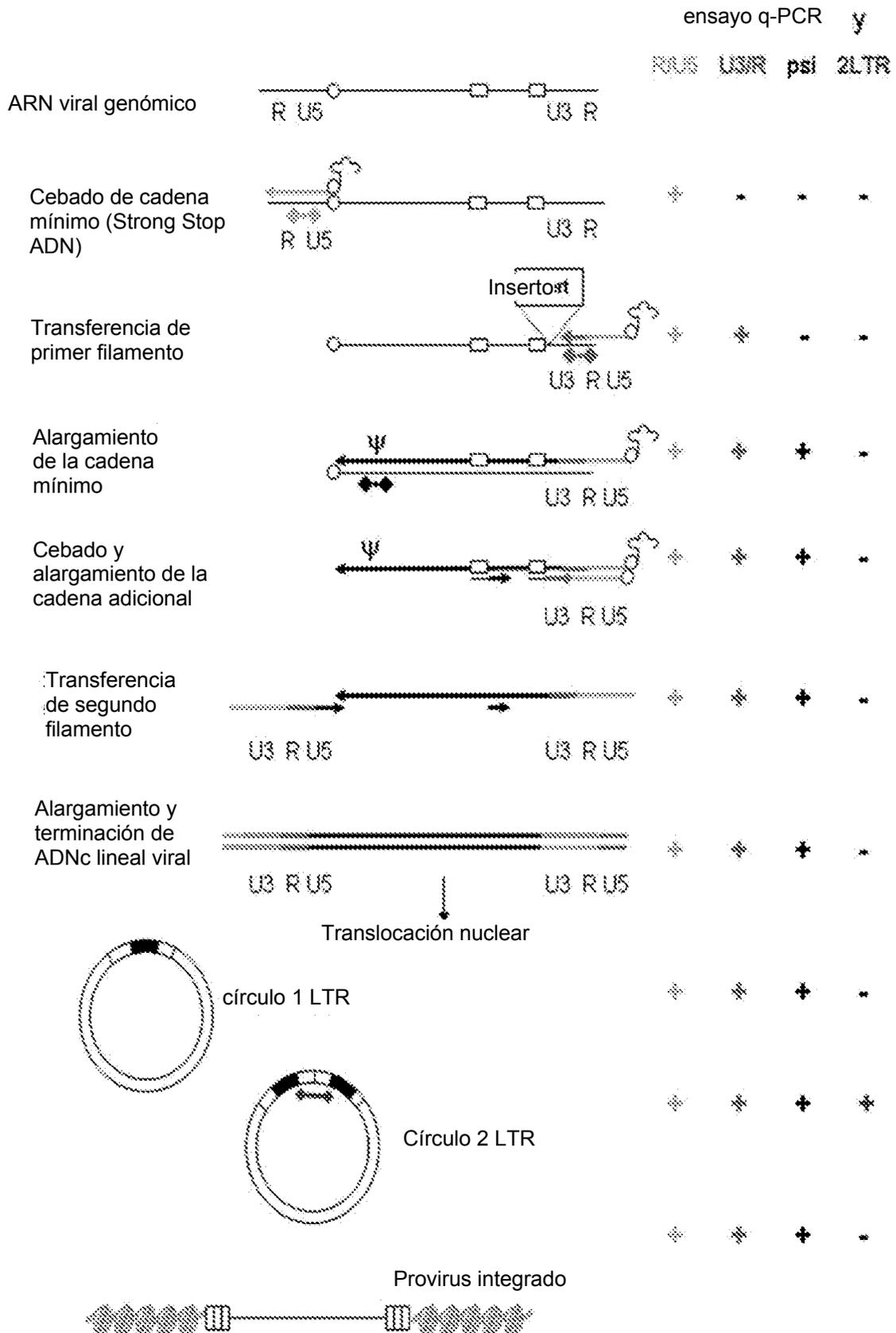


Figura 18A

R/U5

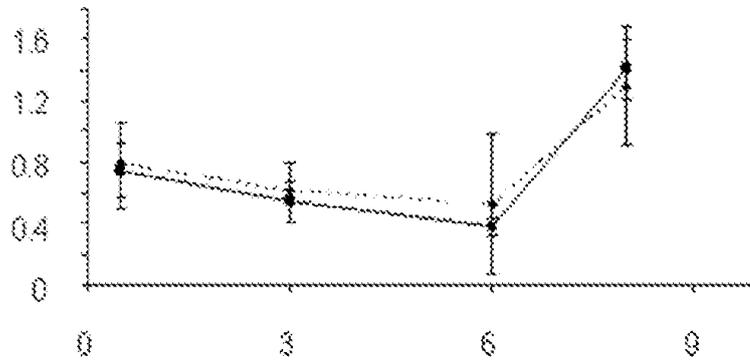


Figura 18B

U3/R

Copia/célula

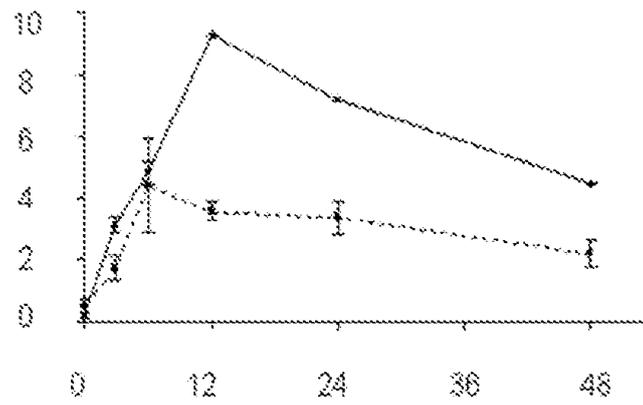
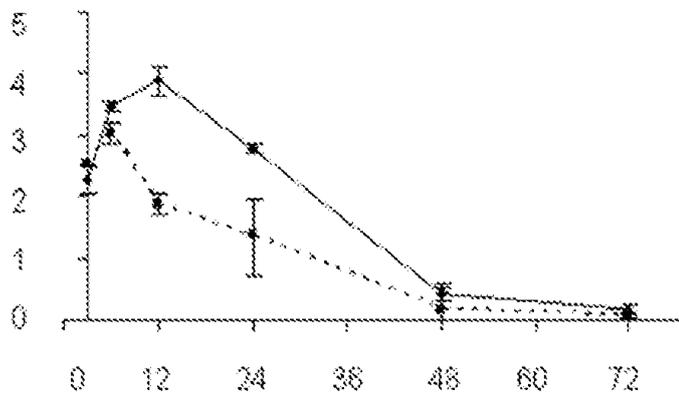


Figura 18C

psi



Tiempo (horas)

Figura 18D

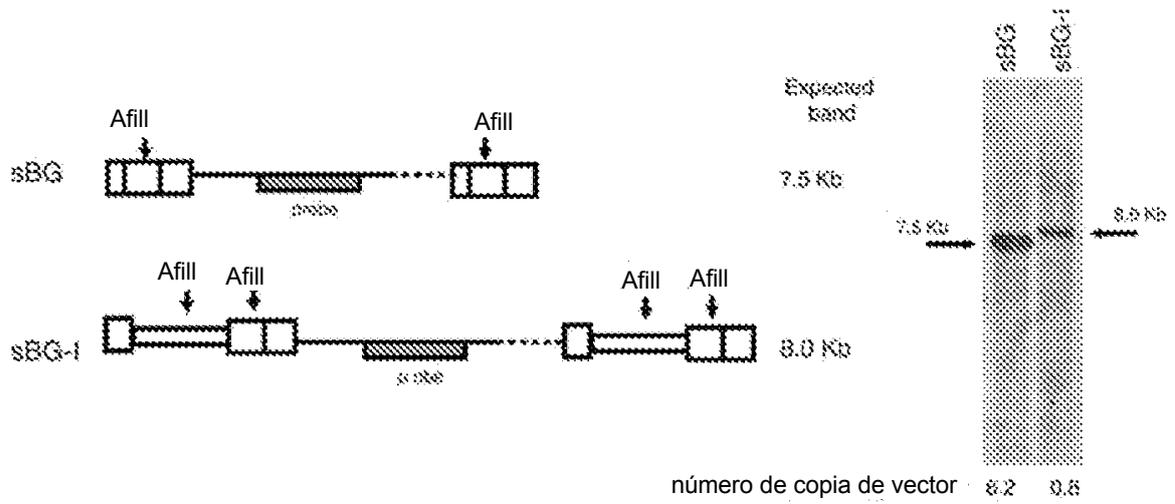


Figura 19C

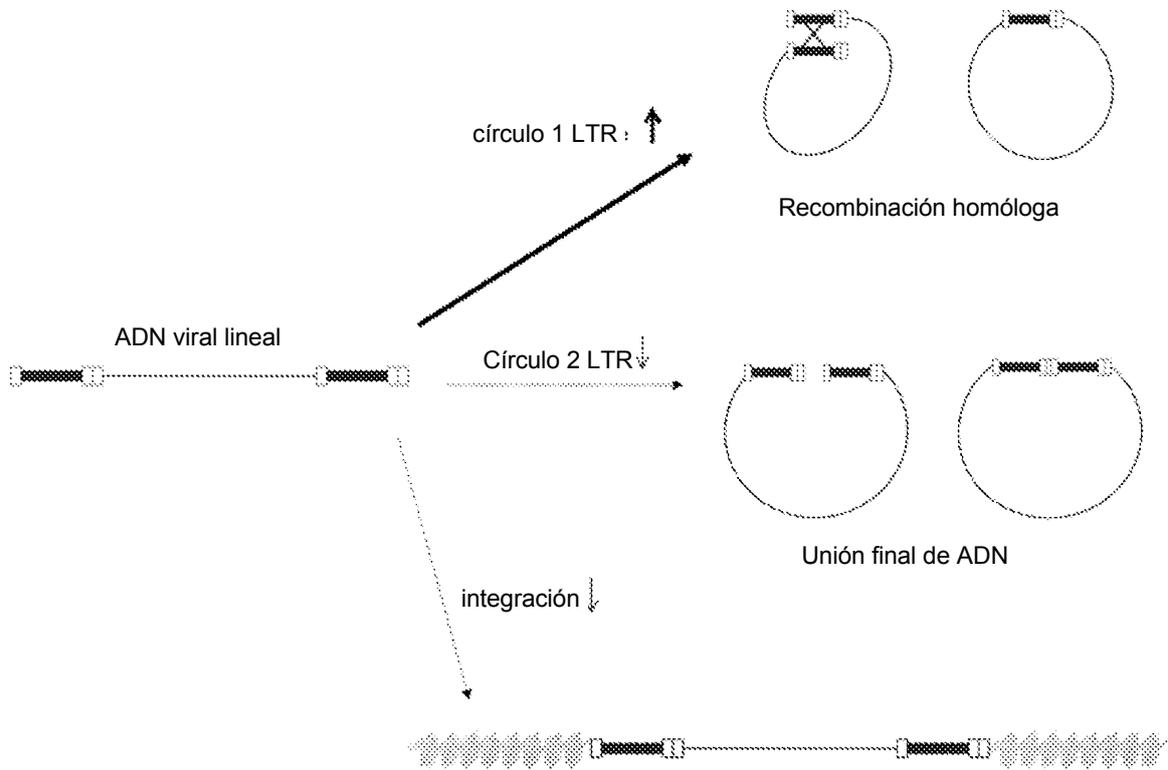


Figura 20A

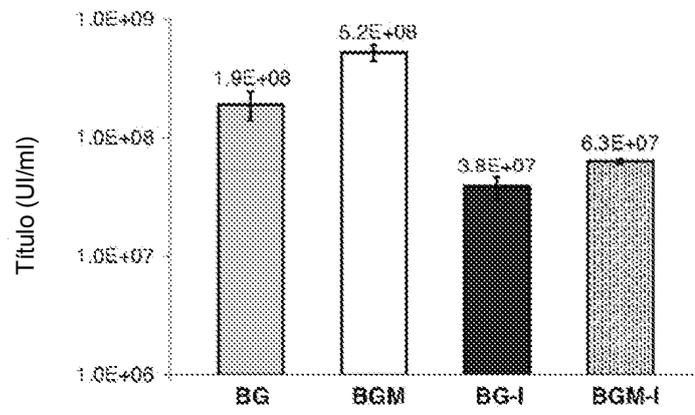


Figura 20B

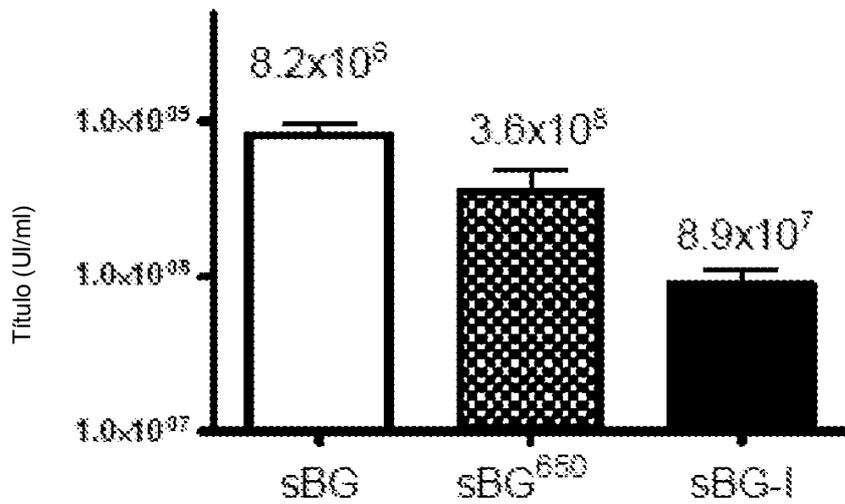


Figura 20C

Vector	Clones de copia única	Núcleo de aislador PCR +	PCR + de cHS4 de 1,2kb
sBG ^{1C}	14	14/14	NA
sBG ^{2C}	24	18/24	NA
sBG ⁴⁰⁰	35	35/35	NA
sBG ⁸⁰⁰	12	12/12	NA
sBG-I	18	18/18	18
sBG ^{400S}	18	18/18	NA
sBG ^{800S}	12	12/12	NA
sBG ^{1200S}	6	6/6	NA

Figura 20D

InsF	aatgatatctctagaggacagcccccc
Ins400R	aatgatatccctgcaggcattcaaggccag
Ins800R	aatgatatcaccatcaaacatgcaggctca
Núcleo1F	cgggatcccagctcacggggacagcccccc
Núcleo1R	ggaattccgatatcaagcttttccccgatccc
Núcleo2F	ggaattccgatatcgagctcacggggacagcccccc
Núcleo2R	cggggtaccccgaagcttttccccgatcccc
3' 400 F	actggatatcatgtgtctgagcctgcatgttt
3' 400 R	tgactccggaagccccatcctcactgactccgtcc
EspaciadorF1	ggaattccgcttgccaacgacat
EspaciadorR1	ccatcgatcacaccctgtttctcc
EspaciadorR2	ccatcgatcgctggcgttctcgc
EspaciadorR3	ccatcgatttcgactcaatccgcc

Figura 20E

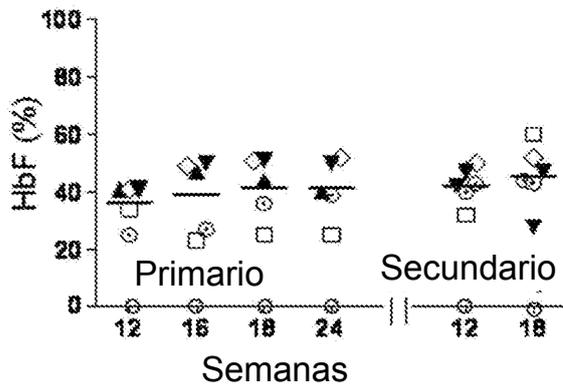


Figura 21A

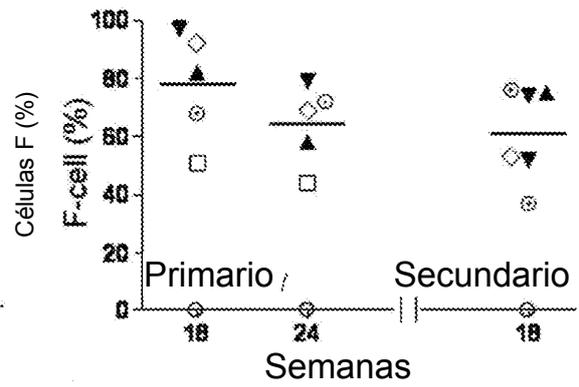


Figura 21B

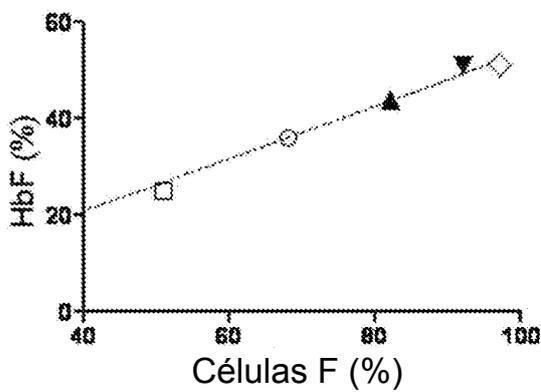


Figura 21C

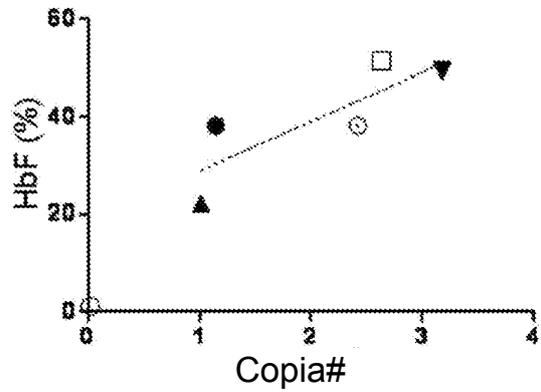


Figura 21D

Tipo de ratón	No.	WBC, 10 ⁹ /μL	RBC, 10 ⁹ /μL	Hb, g/dL	MCV, fL	MCH, pg	RDW, %	Plt, 10 ⁹ /μL	Reticulocitos, %
BERK	5	56.8 ± 5.4	5.3 ± 0.4	6.8 ± 0.5	48.2 ± 1.05	10.7 ± 0.5	35.3 ± 1.6	733 ± 80	60.8 ± 5.0
G ^b G pri	5	10.6 ± 3.1	9.4 ± 0.8	10.0 ± 0.6	40.7 ± 1.3	10.4 ± 0.6	27.6 ± 1.1	733 ± 82	15.8 ± 3.2
Mock pri	10	29.7 ± 1.4	5.8 ± 0.4	7.6 ± 0.7	48.5 ± 1.8	10.7 ± 0.2	32.0 ± 0.9	921 ± 50	40.0 ± 3.0
<i>P</i>		.001	.007	.03	.001	.9	.009	.06	.006
G ^b G sec	6	6.8 ± 1.4	8.9 ± 0.4	10.1 ± 0.5	40.5 ± 1.6	11.4 ± 0.5	28.3 ± 1.4	658 ± 33	13.8 ± 2.9
Mock Sec	1	31.7	5.2	6.4	47.6	12.2	32.1	923	49

Figura 21E

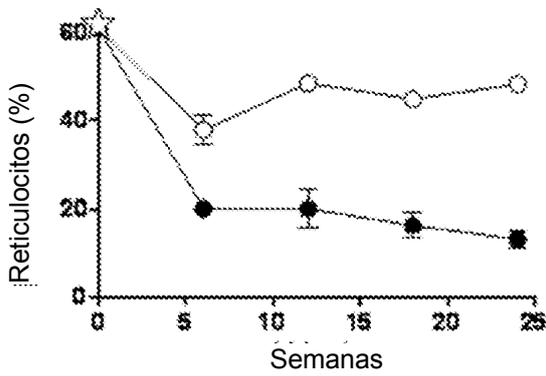


Figura 22A

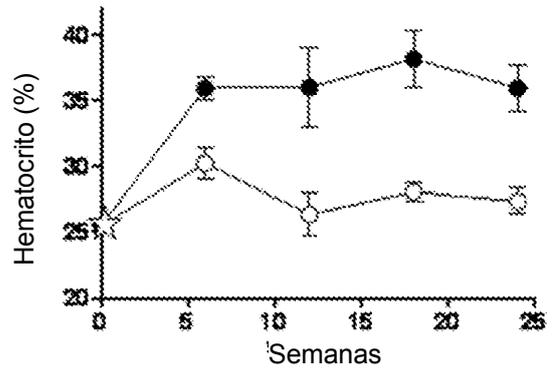


Figura 22B

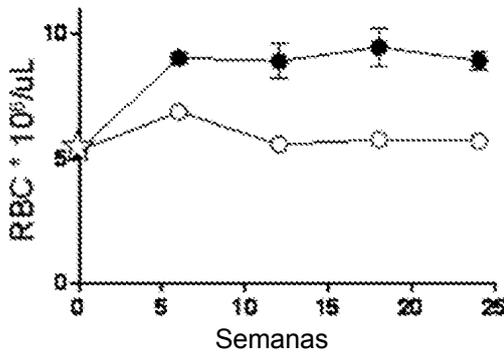


Figura 22C

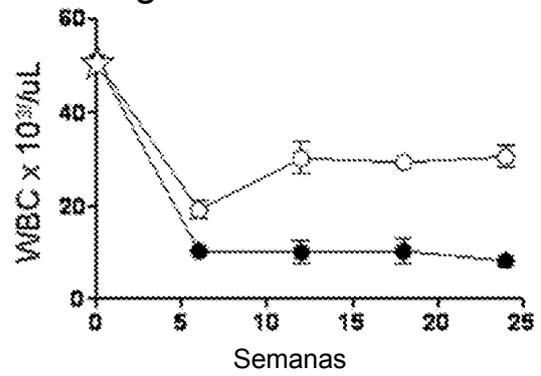


Figura 22D

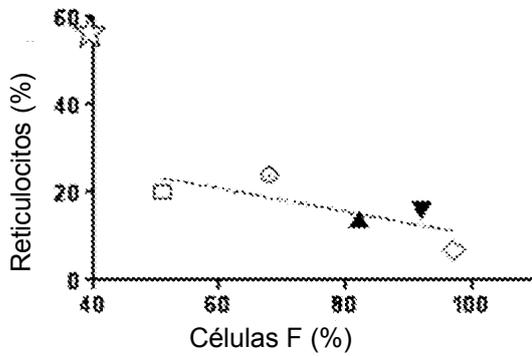


Figura 22E

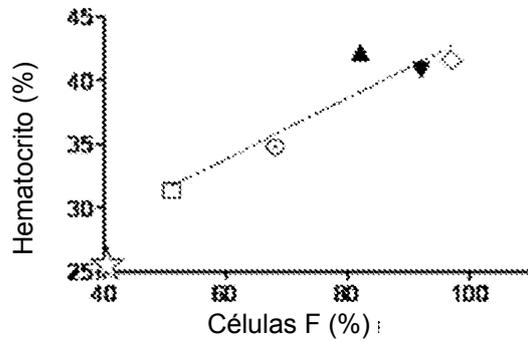


Figura 22F

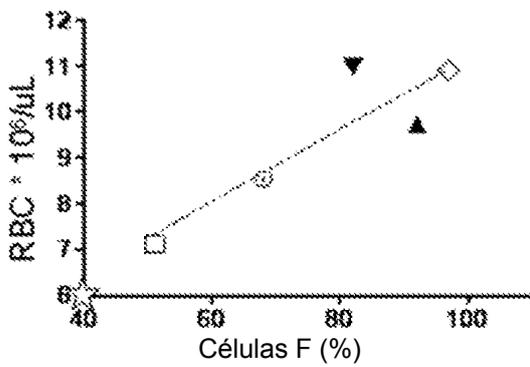


Figura 22G

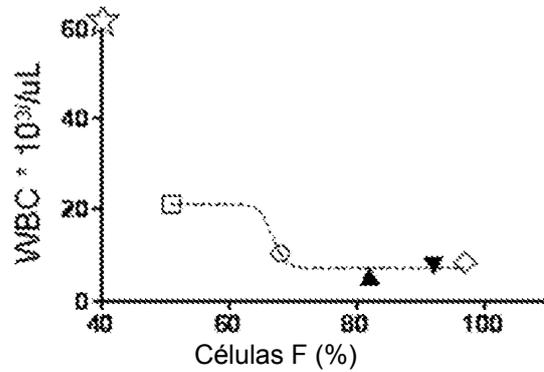


Figura 22H

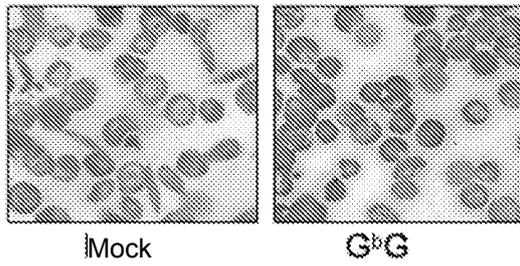


Figura 22A

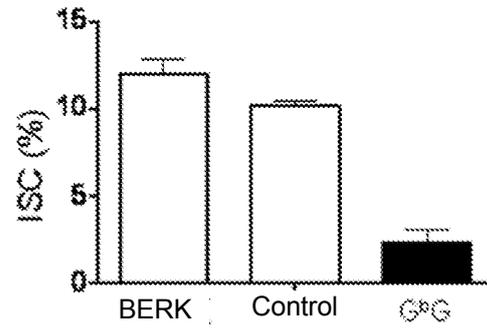


Figura 22B

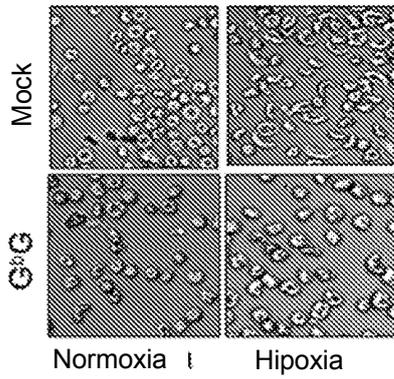


Figura 22C

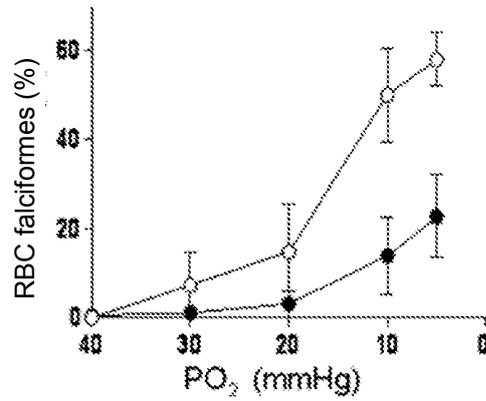


Figura 22D

Capacidad de deformación de RBC (EI)

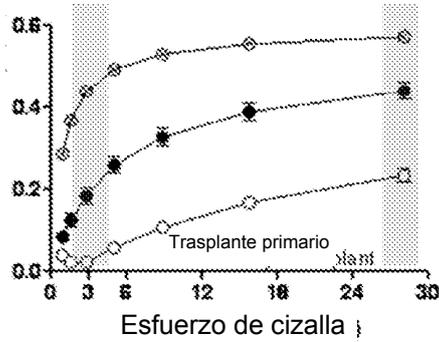


Figura 22E

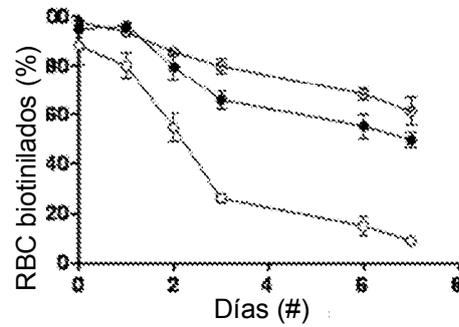


Figura 22F

	Riñón	Hígado	Bazo	Médula ósea
Ratones Control, n=5	Atrofia focal tubular (1/5), congestión leve (3/5)	2 - liver infarction (1/5), 3 - liver infarction (1/5), E-M hematopoesis (2/5)	Weight 500 ± 60 mg, severe erythroid hyperplasia (5/5)	Severe erythroid hyperplasia (5/5)
Ratones G ^b G, n = 5	Riñón Normal (5/6)	Hígado normal (6/5)	Weight 256 ± 51 mg, mild erythroid hyperplasia (5/5), mild congestion (5/5)	Mild erythroid hyperplasia (5/5)

Figura 22G

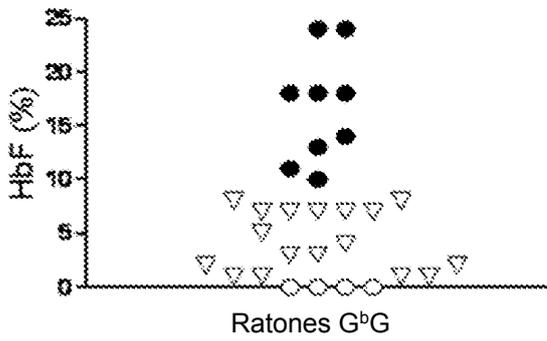


Figura 24A

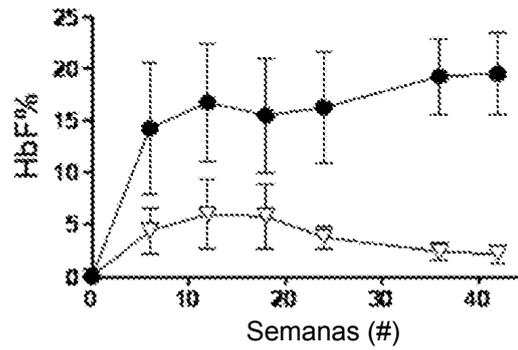


Figura 24B

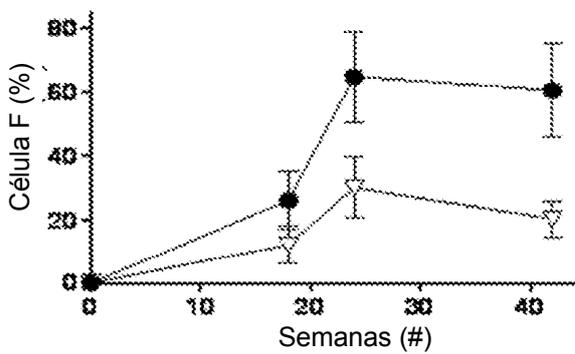


Figura 24C

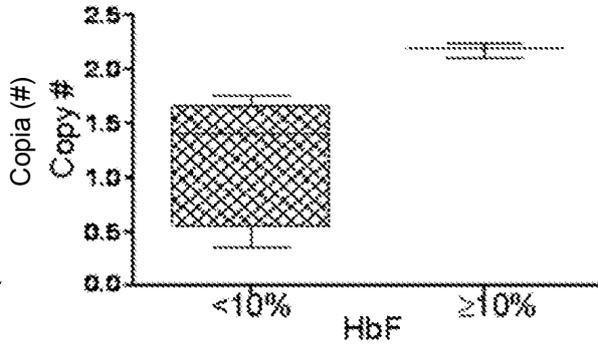


Figura 24D

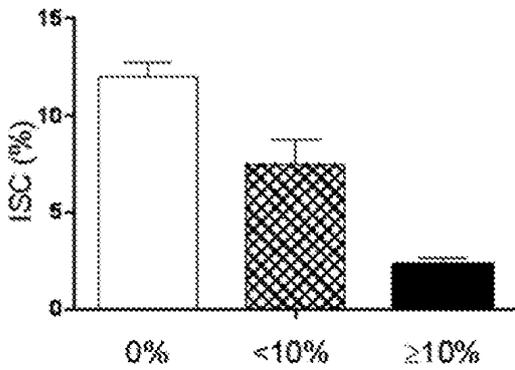


Figura 24E

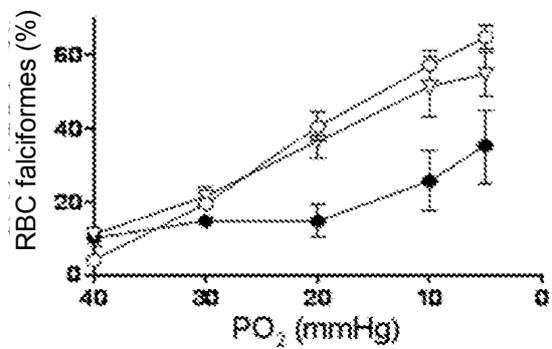


Figura 24F

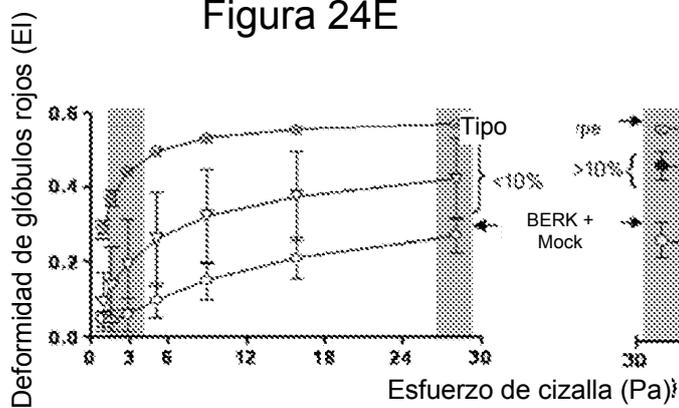


Figura 24G

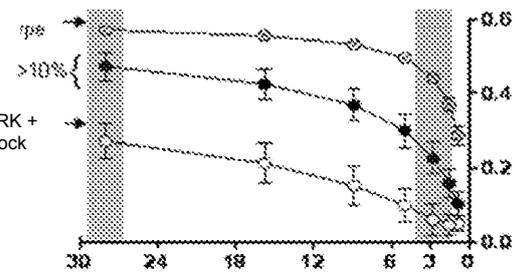


Figura 24H

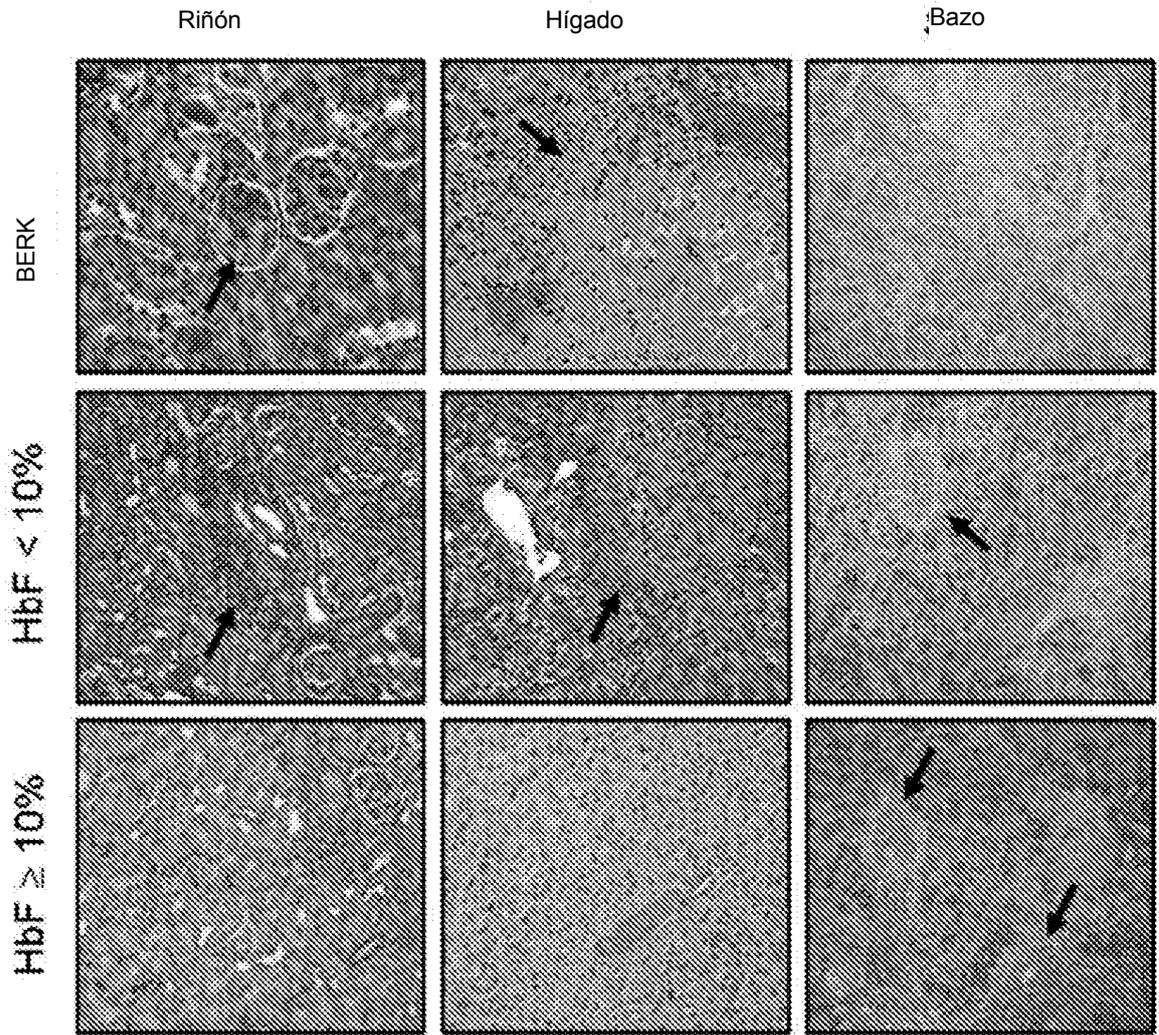


Figura 25A

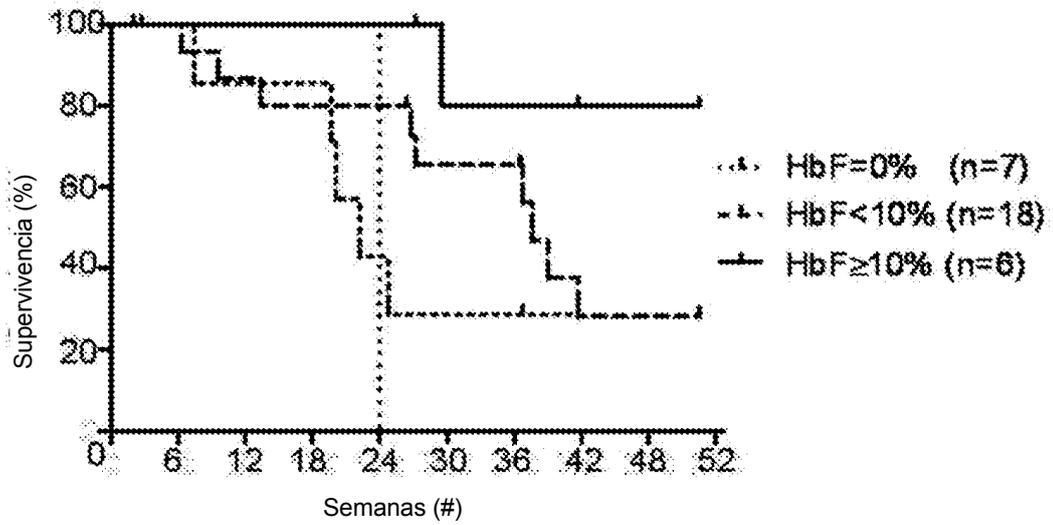


Figura 25B

Punto de tiempos/tipo de ratón	n	WBC, 10 ⁶ /µL	RBC, 10 ⁶ /µL	Hb, g/dL	MCV, fL	MCH, pg	RDW, %	PLT, 10 ⁶ /µL	Reticulocitos, %
Semanas 12									
Control	6	21.7 ± 3.6	6.1 ± 0.7	7.9 ± 0.7	46.2 ± 2.9	16.5 ± 0.2	27.0 ± 1.4	609 ± 66	53.2 ± 3.9
OPG-10	14	32.3 ± 4.6	7.4 ± 0.3	7.9 ± 0.4	41.7 ± 0.7	10.7 ± 0.3	29.1 ± 0.5	737 ± 36	29.2 ± 2.5
P _{ns}		.6	.16	.96	.19	.001	.2	.3	.001
Semanas 18									
Control	4	32.3 ± 4.6	5.6 ± 0.1	6.6 ± 0.2	46.9 ± 1.3	12.2 ± 0.3	31.4 ± 0.9	602 ± 51	54.5 ± 2.3
OPG-10	8	12.6 ± 1.4	7.7 ± 0.4	8.0 ± 0.4	40.2 ± 1.5	11.7 ± 0.6	28.6 ± 0.6	798 ± 67	20 ± 4.1
P _{ns}		.01	.002	.001	.06	.57	.07	.67	.0001
Semanas 24									
Control	4	34.1 ± 9.4	5.0 ± 0.3	7.4 ± 0.3	48.7 ± 2.4	16.2 ± 0.3	30.1 ± 1.9	789 ± 100	50.6 ± 1.9
OPG-10	5	13.4 ± 1.1	6.1 ± 0.5	6.3 ± 0.6	40.9 ± 1.2	11.3 ± 0.2	29.6 ± 1.1	764 ± 61	21.2 ± 1.9
P _{ns}		.07	.006	.04	.1	.002	.9	.6	.001

Figura 25C

Tipo de ratón	n	Patología			
		Riñón	Hígado	Bazo	Médula ósea
B6BK/mock	7	Mesangial proliferation (6/7), E-M hematuriosis (2/7), focal ischemic lesion (2/7), cystic kidney dilation (1/7), congestion (2/7)	E-M nephropathy (1/7), 1 = liver infarction (2/7), 3 = liver infarction (4/7)	Weight 870 ± 71 mg, severe erythroid hyperplasia (6/7), moderate erythroid hyperplasia (1/7), proliferation of lymphoid follicles (2/7)	Severe erythroid hyperplasia (6/7), moderate erythroid hyperplasia (1/7)
OPG-10	4	Focal segmental lesion (1/4), focal tubular atrophy (1/4), congestion (3/4)	1 = liver infarction (2/4), 2 = liver infarction (1/4), hemosiderosis (1/4)	Weight 717 ± 160 mg, severe erythroid hyperplasia (1/4), moderate erythroid hyperplasia (2/4), mild erythroid hyperplasia (1/4), occasional lymphoid follicles (2/4)	Mild erythroid hyperplasia (1/3), moderate erythroid hyperplasia (2/3)
OPG-10	4	Mild congestion (1/4), focal tubular atrophy (1/4), normal kidney (2/4)	Normal liver (4/4)	Weight 880 ± 65 mg, mild erythroid hyperplasia (4/4), multiple lymphoid follicles (4/4), congestion (3/4)	Mild erythroid hyperplasia (2/3)

Figura 25D

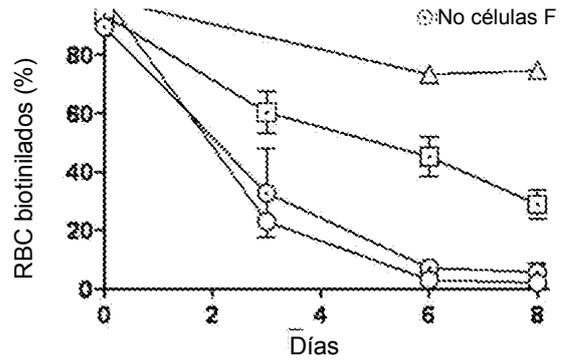
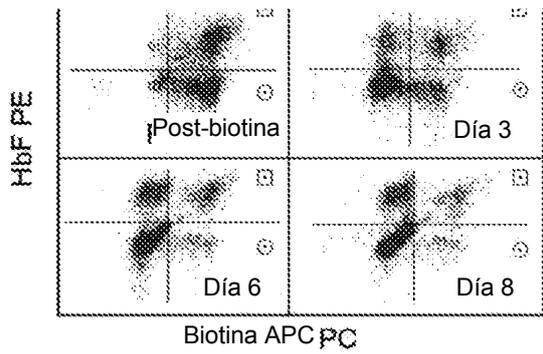


Figura 26A

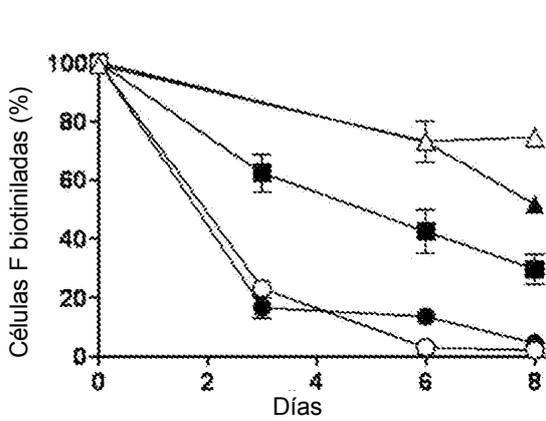


Figura 26B

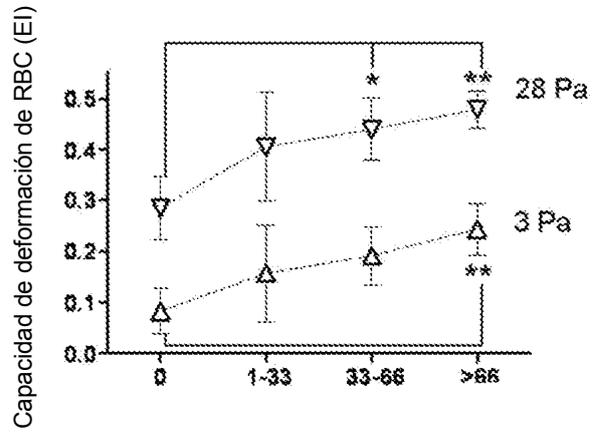


Figura 26C

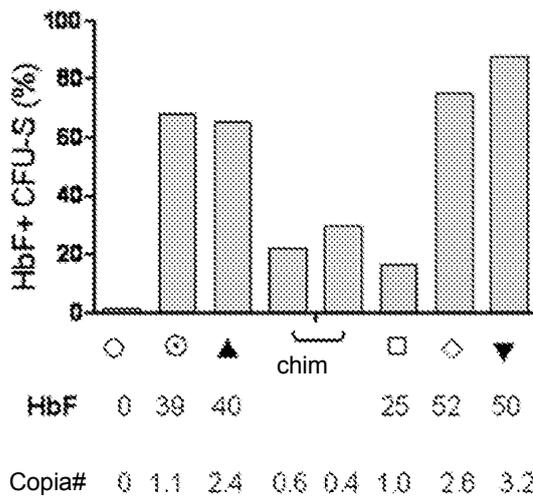


Figura 27A

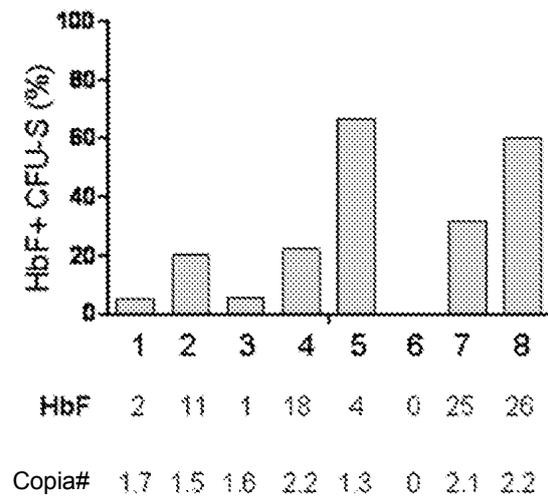


Figura 27B

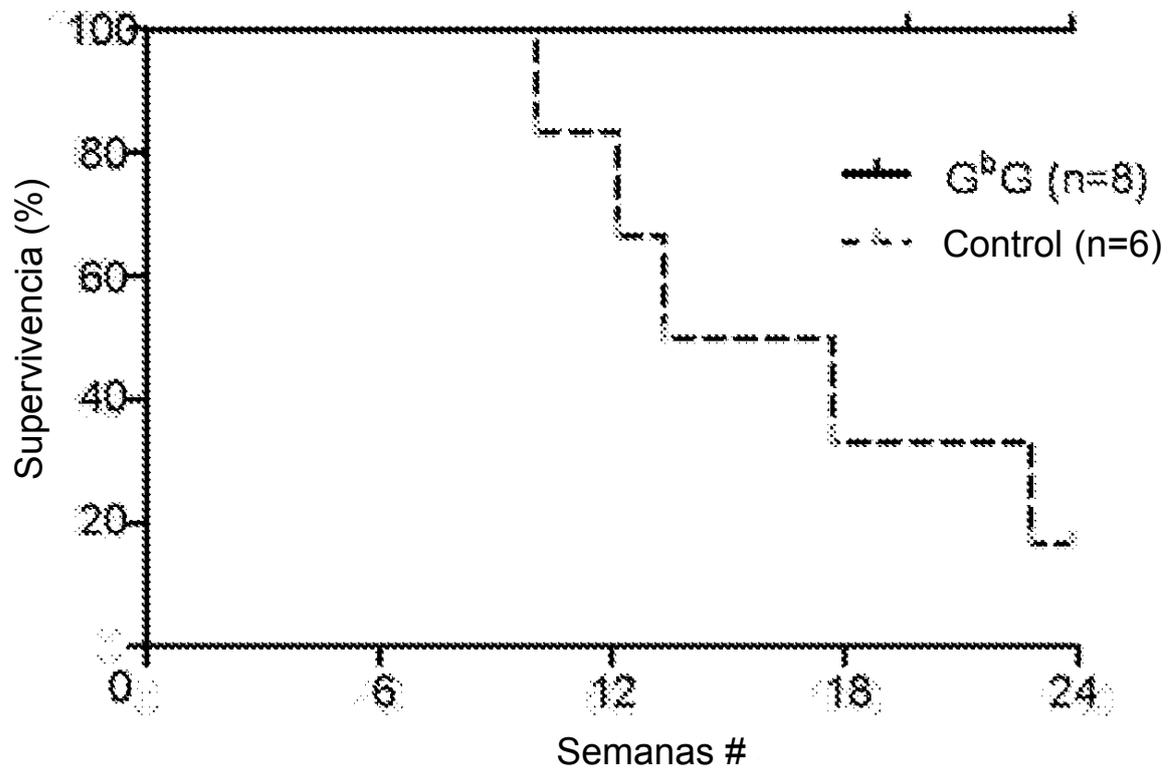


Figura 28

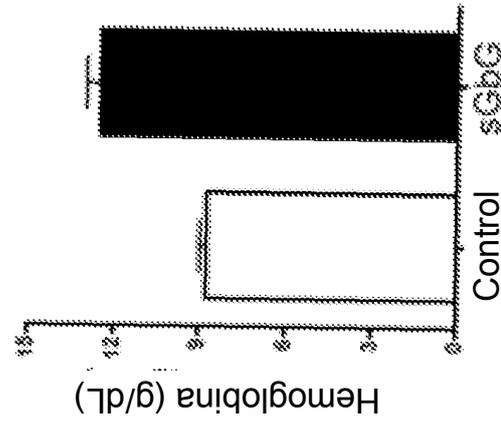


Figura 29A

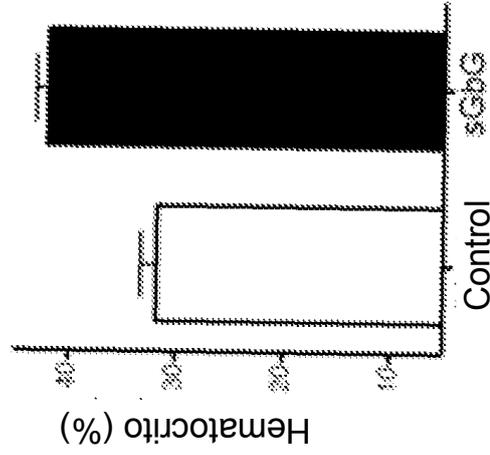


Figura 29B

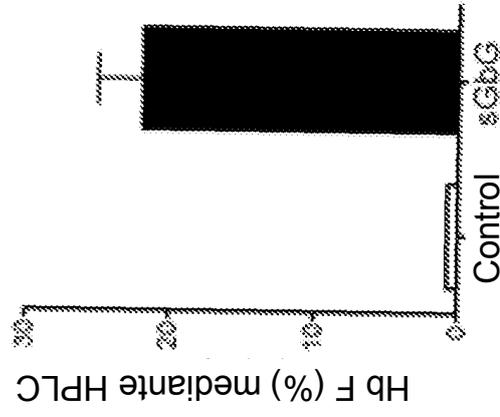


Figura 29C

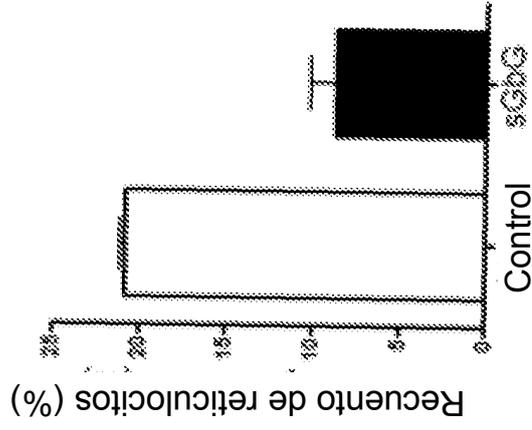
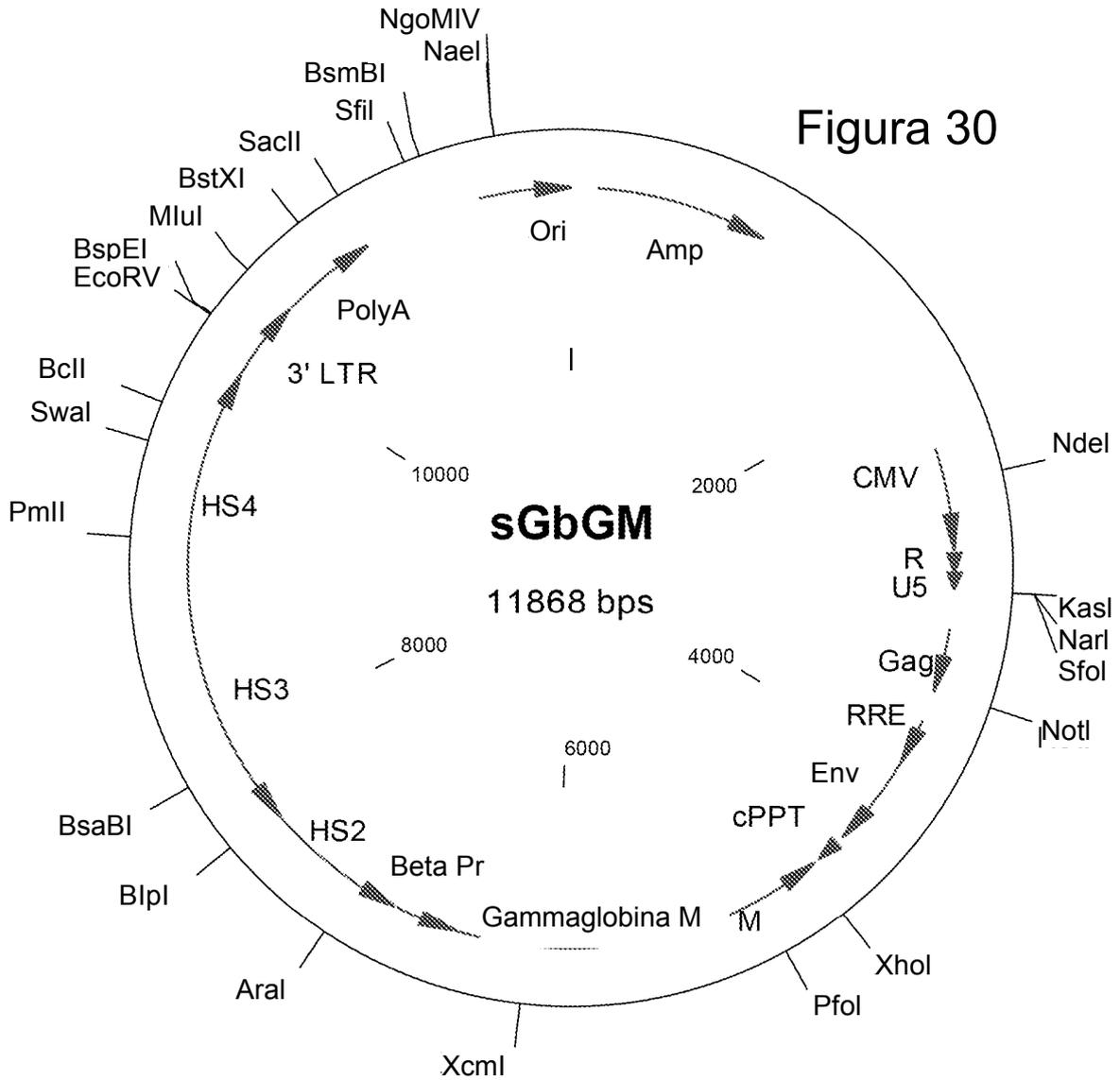


Figura 29D

Figura 30



Molécula: Gamma Globina M, ADN circular de 11868 bps

Inicio	Final	Nombre	Inicio	Final	Nombre
132	989	Amp	6513	4638	gammaglobina M
2360	2876	CMV	6830	6514	Promotor Beta
2892	2988	U5	7561	6839	HS2
2989	3071	R	8508	7562	HS3
3273	3591	Gag	8510	9908	HS4
3747	3978	RRE	9910	10310	3' LTR
3979	4446	Env	10323	10812	Poli A
4491	4608	cPPT	11411	11868	ori

Figura 31

13 sep 2013

Datos de secuencia

Molécula: sGbGM, ADN circular de 11868 bps
 Nombre del archivo: Editado con sGbGM. cmp, de fecha 12 de septiembre
 Descripción: 1 a 11868 bps (completo)

```

1  caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt ttctaaatac
   gtccaccgtg aaaagccoct ttacacgcgc cttggggata aacaaataaa aagatttatg

61  attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa
   taagtttata cataggcgag tactctgtta ttgggactat ttacgaagtt attataactt

121 aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtgcgcct tattcccttt tttgcggcat
   tttccttctc atactcataa gttgtaaagg cacagcggga ataagggaaa aaacgccgta
   >>.....Amp.....>

181  tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctgggtgaa agtaaaagat gctgaagatc
   aaacggaagg acaaaaacga gtgggtcttt gcgaccactt tcattttcta cgacttctag
   >.....Amp.....>

241  agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga
   tcaaccacag tgctcaccca atgtagcttg acctagagtt gtcgccattc taggaactct
   >.....Amp.....>

301  gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagtctcg ctatgtggcg
   caaaagcggg gcttcttgca aaaggttact actcgtgaaa attcaagac gatacaccgc
   >.....Amp.....>

361  cggattattc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc
   gccataatag ggcataactg cggcccgttc tcgttgagcc agcggcgatg gtgataagag
   >.....Amp.....>

421  agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcattgacag
   tcttaactgaa ccaactcatg agtgggtcagt gtcttttcgt agaatgccta ccgtactgtc
   >.....Amp.....>

481  taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa cactcgggcc aacttacttc
   attctcttaa tacgtcacga cggatttggg actcactatt gtgacccggg ttgaatgaag
   >.....Amp.....>

541  tgacaacgat cggaggacog aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg
   actgttgcta gcctcctggc ttctctgatt ggcgaaaaaa cgtgtgtgac cccctagtac
   >.....Amp.....>

601  taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaago cataccaaac gacgagcgtg
   attgagcggg actagcaacc cttggcctcg acttacttctg gtatggtttg ctgctcgcac
   >.....Amp.....>

661  acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgactac
   tgtgggtgta cggacatcgt tacogttggt gcaacgcggt tgataattga ccgcttgatg
   >.....Amp.....>

721  ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac
   aatgagatcg aaggccggtt gtttaattac tgacctacct ccgcctatth caacgtcctg
   >.....Amp.....>

781  cacttotgcg ctcgccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg
   gtgaagacgc gagccgggaa ggccgaccga ccaataaacg actatthaga cctcggccac
   >.....Amp.....>

841  agcgtgggtc tcgoggtatc attgcagcac tggggccaga tggttaagccc tcccgtatcg
   tcgcaaccag agcgcctag taacgtcgtg accccggtct accattcggg agggcatagc
   >.....Amp.....>

```

sGbGM

Figura 31 (continuación)

```

901 tagttatcta caccagcggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg
atcaatagat gtgctgcccc tcagtcggtt gatacctact tgctttatct gtctagcgac
>.....Amp.....>

961 agataggtgc ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac
tctatccacg gagtgactaa ttogtaacca ttgacagtct ggttcaaatg agtatatatg
>.....Amp.....>>

1021 tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctagggtgaag atcctttttg
aaatctaact aaattttgaa gtaaaaatta aattttccta gatccacttc taggaaaaac

1081 ataatctcat gacccaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagacccccg
tattagagta ctggtttttag ggaattgcac tcaaaagcaa ggtgactcgc agtctggggc

1141 tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc
atcttttcta gtttcctaga agaactctag gaaaaaaga gcgcgattag acgacgaacg

1201 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgoc ggatcaagag ctaccaactc
tttgtttttt tgggtggcgat ggtcgcacc aaacaaacgg cctagttctc gatggttgag

1261 tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt
aaaaaggctt ccattgaccg aagtcgtctc gcgtctatgg tttatgacag gaagatcaca

1321 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc
tcggcatcaa tccgggtggtg aagttcttga gacatcgtgg cgyatgtatg gagcgaagc

1381 taatcctggt accagtggtc gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact
attagacaa tggtcaccga cgcaggtcac cgtattcag cacagaatgg cccaactga

1441 caagacgata gttaccgat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac
gttctgctat caatggccta ttccgcgtcg ccagcccgac ttgccccca agcacgtgtg

1501 agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag
tcgggtcgaa cctcgccttc tggatgtggc ttgactctat gyatgtcgca ctcgatactc

1561 aaagcggcac gcttccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggctc
tttcgcggtg cgaagggtt ccctctttc gcctgtccat aggcattcg ccgtcccagc

1621 gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcttg
cttgtcctct cgcgtgctcc ctogaagtc cccctttgcg gaccatagaa atatcaggac

1681 tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggcgga
agcccaaagc ggtggagact gaactcgcag ctaaaaacac tacgagcagt cccccgcct

1741 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt
cggatacctt tttgcggtcg ttgcgcggga aaaatgccaa ggaccggaaa acgaccggaa

1801 ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attacgcct
aacgagtgta caagaaagga cgcaataggg gactaagaca cctattggca taatggogga

1861 ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg
aactcactcg actatggcga gcggcgtcgg cttgctggct cgcgtcgtc agtactcgc

1921 aggaagcggg agagcggcca atacgcaaac gcctctccc gcgcggttg ccgattcatt
tccttcgcct tctcgggggt tatgcgtttg gcggagagg gcgcgcaacc gyctaagtaa

1981 aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta
ttacgtcgac cgtgctgtcc aaagggtcga cctttcgccc gtcaactcgc ttgcgttaat

2041 atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggttttaca ctttatgett ccggctcgtg
tacactcaat cgagtgagta atccgtgggg tccgaaatgt gaaatacga ggccgagcat
    
```

sGbGM

Figura 31 (continuación)

```

2101  tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt
acaacacacc ttaacactcg cctattgtta aagtgtgtcc tttgtcgata ctggtactaa

2161  acgccaaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaaacaaa gctggagctg caagcttggc
tgcggttcgc gcgttaattg ggagtgtatt cccttgtttt cgacctcgac gttcgaaccg

2221  cattgcatac gttgtatcca tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaacat
gtaacgtagt caacataggt atagtattat acatgtaaat ataaccgagt acagggttga

2281  taccgccatg ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat
atggcgggtac aactgtaact aataactgat caataattat cattagttaa tgccccagta

2341  tagttcatag cccatatacg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggccccgctg
atcaagtatc gggatatata ctcaaggcgc aatgtattga atgccattta ccggggcggac
>>.....CMV.....>

2401  gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa
cgactggcgg gttgctgggg ggggtaact gcagttatta ctgcatacaa gggatatcatt
>.....CMV.....>

2461  cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa actgcccact
ggggttatcc ctgaaaggta actgcagta cccacctcat aaatgccatt tgacgggtga
>.....CMV.....>

2521  tggcagtaca tcaagtgtat       NdeI      
catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta
acogtcatgt agttcacata gtatacgggt catgcggggg ataactgcag ttactgccat
>.....CMV.....>

2581  aatggccccg ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt
ttaccggggc gaccgtaata cgggtcatgt actggaatac cctgaaagga tgaaccgtca
>.....CMV.....>

2641  acatctacgt attagtcatc gctattacca tgggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg
tgtagatgca taatcagtag cgataatggt accactacgc caaaaccgtc atgtagttac
>.....CMV.....>

2701  ggcggtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg
ccgcacctat cgccaaactg agtgccccta aaggttcaga gytggggtaa ctgcagttac
>.....CMV.....>

2761  ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc
cctcaacaaa aaccgtgggt ttagttgccc tgaaaggttt tacagcattg ttgaggcggg
>.....CMV.....>

2821  cattgacgca aatgggcggg aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt
gtaactgcgt ttaccggcca tccgcacatg ccaccctcca gatataatcg tctcgagcaa
>.....CMV.....>

2881  tagtgaaccg gggctctctc ggttagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact
atcacttggc ccagagaga ccaatctggt ctgactcgg accctcgaga gaccgattga
>>.....US.....>

2941  agggaacca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc
tcccttgggt gacgaattcg gagttatttc gaacggaact cacgaagttc atcacacagc
>.....US.....>>
>>....R....>

3001  ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa
ggcagacaac aactgagac cattgatctc tagggagtct gggaaaatca gtcacacctt
>.....P.....>

```

sGbGM

Figura 31 (continuación)

	<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 5px;"> <div style="border-bottom: 1px solid black; padding: 2px 5px;">SfiI</div> <div style="border-bottom: 1px solid black; padding: 2px 5px;">NarI</div> <div style="border-bottom: 1px solid black; padding: 2px 5px;">KasI</div> </div>					
3061	aatctctagc	agtggcgccc	gaacagggac	ttgaaagcga	aagggaaacc	agaggagctc
	ttagagatcg	tcaccgggg	cttgtccctg	aactttcgtc	ttccccttgg	tctcctcgag
	>.....R.....>>					
3121	tctcgacgca	ggactcggct	tgctgaagcg	cgcacggcaa	gaggcgaggg	gggcgactg
	agagctgcgt	cctgagccga	acgaattcgc	gcgtgccgtt	ctccgctccc	cgccgctgac
3181	gtgagtacgc	caaaaatttt	gactagcgga	ggctagaagg	agagagatgg	gtgagagagc
	cactcatgcg	gttttaaaa	ctgatcgcc	ccgatcttcc	tctctctacc	cacgctctcg
3241	gtcagtatta	agcgggggag	aattagatcg	cgatgggaaa	aaattcgggt	aaggccaggg
	cagtcataat	tcgccccctc	ttaatctagc	gtacccttt	tttaagccaa	ttccggctcc
	>>.....Gag.....>					
3301	ggaaagaaaa	aatataaatt	aaaacatata	gtatgggcaa	gcagggagct	agaacgattc
	cctttctttt	ttatatttaa	ttttgtatat	catacccggt	cgccccctga	tcttgctaag
	>.....Gag.....>					
3361	gcagttaatc	ctggcctggt	agaaacatca	gaaggctgta	gacaaatact	gggacagcta
	cgcaatttag	gaccggacaa	tctttgtagt	cttccgacat	ctgtttatga	ccctgtcgat
	>.....Gag.....>					
3421	caaccatccc	ttcagacagg	atcagaagaa	cttagatcat	tatataatac	agtagcaacc
	gttggtaggg	aagtctgtcc	tagtcttctt	gaatctagta	atatattatg	tcctcgttgg
	>.....Gag.....>					
3481	ctctattgtg	tgcatcaaag	gatagagata	aaagacacca	aggaagcttt	agacaagata
	gagataacac	acgtagtttc	ctatctctat	tttctgtggg	tccttcgaaa	tctgttctat
	>.....Gag.....>					
3541	gaggaagagc	aaaacaaaag	taagaccacc	gcacagcaag	cgcccgctga	tcttcagacc
	ctccttctcg	ttttgttttc	attctgggtg	cggtgcgttc	gccggcgact	agaagtctgg
	>.....Gag.....>>					
3601	tggaggagga	gatatgaggg	acaattggag	aagtgaatta	tataaatata	aagtagtaaa
	acctcctcct	ctatactccc	tgtaaaccct	ttcacttaat	atattttatat	ttcatcattt
3661	aattgaacca	ttaggagttag	caccaccaa	ggcaaagaga	agagtgggtc	agagagaaaa
	ttacttgggt	aatcctcatc	gtgggtgggt	ccgtttctct	tctcaccacg	tctctctttt
3721	aagagcagtg	ggaataggag	ctttgttctt	tgggttcttg	ggagcagcag	gaagcactat
	ttctcgtcac	ccttatcctc	gaacaagga	acccaagaac	cctcgtcgtc	cttcgtgata
	>>.....RRE.....>					
3781	ggcgcgagcg	tcaatgacgc	tgacgggtaca	ggccagacaa	ttattgtctg	gtatagtgca
	cccgcgtcgc	agttactggg	actgccatgt	ccggtctggt	aataacagac	catatcacgt
	>.....RRE.....>					
3841	gcagcagaac	aatttgctga	gggctattga	ggcgcaacag	catctgttgc	aactcacagt
	cgctcgtctg	ttaaagcact	cccgataact	ccgcgttgtc	gtagacaacg	ttgagtgtca
	>.....RRE.....>					
3901	ctggggcatc	aagcagctcc	aggcaagaat	cctggctgtg	gaaagatacc	taaaggatca
	gaccccgtag	ttcgtcgagg	tcogttctta	ggaccgacac	ctttctatgg	atttccatgt
	>.....RRE.....>					

sGbGM

Figura 31 (continuación)

```

3961 acagctcctg gggatttggg gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg
    tgtcagaggac ccctaaaccc caacgagacc ttttgagtaa acgtggtgac gacacggaac
    >.....KRE.....>
    >>.....Env.....>

4021 gaatgctagt tggagtaata aatctctgga acagatttgg aatcacacga cctggatgga
    cttacgatca acctcattat ttagagacct tgtctaaacc ttagtgtgct ggacctacct
    >.....Env.....>

4081 gtgggacaga gaaattaaca attacacaag cttaatacac tccttaattg aagaatcgca
    caccctgtct ctttaattgt taatgtgttc gaattatgtg aggaattaac ttcttagcgt
    >.....Env.....>

4141 aaaccagcaa gaaaagaatg aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagtttgtg
    tttggtcgtt cttttcttac ttgttcttaa taacctaat ctatttaccg gttcaaacac
    >.....Env.....>

4201 gaattggttt aacataacaa attggctgtg gtatataaaa ttattcataa tgatagtagg
    cttaaccaaa ttgtattgtt taaccgacac catatatttt aataagtatt actatcatcc
    >.....Env.....>

4261 aggcttggta ggtttaagaa tagtttttgc tgtactttct atagtgaata gagttaggca
    tcogaacct ccaaattctt atcaaaaacg acatgaaaga tatcacttat ctcaatccgt
    >.....Env.....>

4321 gggatattca ccattatcgt ttcagacca ctocccaacc ccgaggggac ccgacaggcc
    ccctataagt ggtaatagca aagtctgggt ggagggttgg ggctcccctg ggctgtccgg
    >.....Env.....>

4381 cgaaggaata gaagaagaag gtggagagag agacagagac agatccattc gattagtga
    gcttccctat cttcttcttc cacctctctc tctgtctctg tctaggtaag ctaatcactt
    >.....Env.....>

4441 cggatctcga cggtatcgat agcgggacaa atggcagtat tcatccacaa ttttaaaaga
    gcttagagct gccatagcta tcgcctgtt tacctgcata agtaggtgtt aaaattttct
    >...>> Env
    >>..cPPT..>

4501 aaagggggga ttgggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat agcaacagac
    tttccccctt aaccccccat gtcacgtccc ctttcttctc atctgtatta tctgtgtctg
    >.....cPPT.....>

4561 atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg ggtttattac
    tatgtttgat ttcttaattg ttttgtttaa tgbtttaag ttttaaaagc ccaaataatg
    >.....cPPT.....>>

4621 agggacagca gagatccagt ttggatcgtc gacatgcctg gtgaattcac tagtggatcg
    tccctgtcgt ctctaggta aacctagcag ctgtagcggc cacttaagtg atcacctagc
    <<.....gamma Globin M.....<

    XhoI
4681 ctctcgaggg gatcctctag agtcgagctc gcgaggatca tcaccgggtg tagccggagc
    gagagctccc ctaggagatc tcagctcgag cgtccttagt agtgccacg atogggctcg
    <.....gamma Globin M.....<

4741 cagaagcacc ataagggaca tgataaggga gccagcagac ctctgatctc ttctgaatg
    gtcttcgtgg tattccctgt actattccct cgtcgtctg gagactagag aaggacttac
    <.....gamma Globin M.....<

4801 ctaatcttaa acatcctgag gaagaatggg acttccattt ggggtgggac tatgataggg
    gattagaatt ttaggactc cttcttaccg tgaaggtaaa ccccaccggg atactatccc
    <.....gamma Globin M.....<
    
```

sGbGM

Figura 31 (continuación)

4861 taataagaca gtagtgaata tcaagctaca aaaagccccc tttcaaatto ttctcagtec
attattctgt catcacttat agttcagatg ttttcggggg aaagttaaag aagagtcagg
<.....gamma Globin M.....<

4921 taacttttca tactaagccc agtccttcca aagcagactg tgaaagagtg atagttccgg
attgaaaagt atgattcggg tcaggaaggt ttcgtctgac accttctcac tatcaaggcc
<.....gamma Globin M.....<

4981 gagactagca cgggctagcc gagcttgaa cactttccct tcattaagaa ccctccttgc
ctctgatcgt ggccgatcgg ctcgaaacct gtgaaaggga agtaattctt ggtaggaagc
<.....gamma Globin M.....<

5041 tactcagctg caatcaatcc agccccagg tcttcaactga accttttccc atctcttcca
atgagtcgac gttagttagg tcgggggtcc agaagtgact tggaaaaggg tagagaaggt
<.....gamma Globin M.....<

5101 aaacatctgt ttctgagaag tccgttccca tagaggcttt tcttcccacc ggatttctcc
ttttagaca aagactcttc aggacaggat atctccagaa agaagggtgg cctaaagagg
<.....gamma Globin M.....<

5161 tacaccatth actcccactt gcagaactcc cgtgtacaag tgtctttact gcttttattt
atgtggtaa tgaggggtgaa cgtcttgagg gcacatgttc acagaaatga cgaaaataaa
<.....gamma Globin M.....<

5221 gctcaacaaa atgcacatct catataaaaa taaatgagga gcatgcacac accacaaaca
cgagttgitt tacgtgtaga gtatattttt atttactcct cgtacgtgtg tgggtgtttgt
<.....gamma Globin M.....<

5281 caaacaggca tgcagaaata cacatacaca ctccctcaa tataaacctt ttgtggctca
gtttgtccgt acgtctttat gtgtatgtgt gaagggagtt atatttggga aacaccgagt
<.....gamma Globin M.....<

5341 tatatttaaa aagatgtaaa aaaaagagct gaagaaaatc atgtgtgatc tctcagcaga
atataaattt ttctacattt ttttctcga cttcttttag tacacactag agagtcgtct
<.....gamma Globin M.....<

5401 atagatttat tatttgtatt gcttgcagaa taaagcctat ccttgaaagc tctgaatcat
tatctaaata ataaacataa cgaacgtctt atttcggata ggaactttcg agacttagta
<.....gamma Globin M.....<

5461 gggcaagagg ctcagtggtt tctggaggac agggcactgg ccaactgcagt caccatcttc
cccgttctcc gagtcacat agacctctg tccgtgacc ggtgacgtca gtggtagaag
<.....gamma Globin M.....<

5521 tgccaggag cctgcacctc aggggtgaat tctttgcaa agtgaatggc cagcacgggtg
acggctcttc ggacgtggag tcccactta agaaacggtt tcaactaccg gtcgtgccac
<.....gamma Globin M.....<

5581 accagcacgt tgcccaggag ctgtgggagg aagataagag gtatgaacat gattagcaaa
tggctgtgca acgggtcttc gacacctcc tctattctc catacttgta ctaatcgttt
<.....gamma Globin M.....<

5641 agggcctagc ttggactcag aataatccag cttatccca accataaaat aaaagcagaa
tcccggatcg aacctgagtc ttattaggtc ggaatagggt tggattttta ttttcgtctt
<.....gamma Globin M.....<

5701 tggtagctgg attgtagctg ctattagcaa tatgaaacct cttacatcag ttacaattta
accatcgacc taacatcgac gataatcgtt ataacttga gaatgtagtc aatgttaaat
<.....gamma Globin M.....<

PfoI

sGbGM

Figura 31 (continuación)

```

5761  tatgcagaaa  tatttatatg  cagaaatatt  gctattgcct  taaccagaa  attatcactg
      atacgtcttt  ataaatatac  gtctttataa  cgataacgga  attgggtctt  taatagtac
      <.....gamma Globin M.....>

5821  ttattcttta  gaatggtgca  aagaggcatg  atacattgta  tcattattgc  cctgaaagaa
      aataagaaat  cttaccacgt  ttctccgtac  tatgtaacat  agtaataacg  ggactttctt
      <.....gamma Globin M.....>

5881  agagattagg  gaaagtatta  gaaataagat  aaacaaaaaa  gtatattaa  agaagaaagc
      tctcataatc  ctttcataat  ctttattcta  tttgtttttt  catataattt  tcttctttcg
      <.....gamma Globin M.....>

5941  attttttaaa  attacaaatg  caaaattacc  ctgatttggt  caatatgtgt  accctgttac
      taaaaaattt  taatgtttac  gttttaatgg  gactaaacca  gttatacaca  tgggacaatg
      <.....gamma Globin M.....>

6001  ttctcccctt  cctatgacat  gaacttaacc  atagaaaaga  aggggaaaga  aaacatcaag
      aagaggggaa  ggatactgta  ctggaattgg  tatcttttct  tcccctttct  tttgtagtcc
      <.....gamma Globin M.....>

6061  ggtcccatag  actcaccttg  aagtctctcg  gatccacatg  cagcttgtca  cagtgcagtt
      ccagggatc  tgagtggaac  ttcaagagtc  ctagggtgac  gtcgaacagt  gtcacgtcaa
      <.....gamma Globin M.....>

6121  cactcagctg  ggcaaagggt  ccoctgagat  catccagggt  ctttatggca  tctccaagc
      gtgagtcgac  cegtttccac  gggaactcta  gtagggtccac  gaaataccgt  agagggttcc
      <.....gamma Globin M.....>
                                     Xmi
6181  aagtcagcac  ettcttgcca  tgtgccttga  ctttgggggt  gcccatgatg  gcagaggcag
      ttcagtcgtg  gaagaacggg  acacggaact  gaaaccccaa  cgggtactac  cgtctccgtc
      <.....gamma Globin M.....>

6241  aggacaggtt  gccaaagctg  tcaaagaacc  tctgggtcca  tgggtagaca  accaggagcc
      tctgtccaa  cggtttcgac  agtttcttgg  agaccaggt  acccatctgt  tggctctcgg
      <.....gamma Globin M.....>

6301  tgtgagattg  acaagaacag  tttgacagtc  agaaggtgcc  acaaatcctg  agaagcaacc
      acactctaac  tgttcttgtc  aaactgtcag  tcttccacgg  tgtttaggac  tcttcgttgg
      <.....gamma Globin M.....>

6361  tggacttttg  ccaggcacag  ggtccttctt  tccctccctt  gtctgtgtca  ccagagccta
      acctgaaaac  ggtccgtgtc  ccaggaagga  aggyagggaa  caggaccagt  gytctcggat
      <.....gamma Globin M.....>

6421  ccttcccagg  gtttctcttc  cagcatcttc  cacattcacc  ttgtccaca  ggcttgtgat
      ggaaggggcc  caagaggag  gtcgtagaag  gtgtaagtgg  aacaggtgt  ccgaacacta
      <.....gamma Globin M.....>

6481  agtagccttg  tctctctctg  tgaatgacc  catgggtgtc  gtttgaggtt  gctagtgaac
      tcatcggaac  aggaggagac  actttactgg  gtaccacaga  caaactccaa  cgatcacttg
      <.....gamma Globin M.....><<
                                     <<.....Beta Pr.....>>

6541  acagttgtgt  cagaagcaaa  tgtaagcaat  agatggctct  gccctgactt  ttatgccag
      tgtcaacaca  gtcttcgttt  acattcgta  tctaccgaga  cgggactgaa  aatacgggtc
      <.....Beta Pr.....>

6601  ccoctggctc  tgcctccct  gctcctggga  gtagattggc  caaccctagg  gtgtggctcc
      gggaccgagg  acgggagggg  cgaggacct  catctaaccg  gttgggatcc  cacaccgagg
      <.....Beta Pr.....>
    
```

sGbGM

Figura 31 (continuación)

```

6661 acagggtgag gtctaagtga tgacagccgt acctgtcctt ggctcttctg gcaactggctt
    tgtcccactc cagattcact actgtcggca tggacaggaa ccgagaagac cgtgaccgaa
    <.....Beta Pr.....>

6721 aggagttgga ettcaaacc tcagccctcc ctctaagata tatctcttgg ccccatacca
    tctcaacct gaagtttggg agtcgggagg gagattctat atagagaacc ggggtatgg
    <.....Beta Pr.....>

6781 tcagtacaaa ttgctactaa aaacatcctc ctttgcaagt gtatttacga cggtatcgat
    agtcatgttt aacgatgatt tttgtaggag gaaacgttca cataaatgct gccatagcta
    <.....Beta Pr.....><<
                                                    HS2 <<

6841 gtatgtgagc atgtgtcctc taacagcaca ggccttttgc cacctagctg tccaggggtg
    catacactcg tacacaggag attgtcgtgt ccgaaaacg gtggatcgac aggtccccac
    <.....HS2.....>

6901 ccttaaaatg gcaaacaagg tttgtttct tttcctgttt tcatgecttc ctcttccata
    ggaattttac cgtttgttcc aaacaaaaga aaaggacaaa agtacggaag gagaaggat
    <.....HS2.....>

6961 tccttgtttc atattaatac atgtgtatag atcctaaaaa tctatacaca tgtattaata
    aggaacaaag tataattatg tacacatata taggattttt agatagtgtg acataattat
    <.....HS2.....>

7021 aagcctgatt ctgccgcttc taggtataga ggcacactgc aagataaata tttgattcac
    ttcggactaa gacggcgaag atccatatct ccgggtggac ttctatttat aaactaagt
    <.....HS2.....>
                                     Aar1
7081 aataactaat cattctatgg caattgataa caacaatat atatatatat atatataac
    ttattgatta gtaagatacc gttactatt gttgtttata tatatatata tatatatatg
    <.....HS2.....>

7141 gtatatgtgt atatatatat atatatatat atattcagga aataatatat tctagaatat
    catatacaca tatatatata tatatatata tataagtctt ttattatata agatcttata
    <.....HS2.....>

7201 gtcacattct gtctcaggca tccattttct ttatgatgcc gtttgagggt gagttttagt
    cagtgtgaaga cagagtcctg aggtaaaaga aatactacgg caaactccac ctcaaaaatca
    <.....HS2.....>

7261 caggtggta cgttctcctt ttttttgcca tctgccctgt aagcatcctg ctggggacc
    gtccaccagt cgaagaggaa aaaaaacggt agacgggaca ttcgtaggac gaccctggg
    <.....HS2.....>

7321 agataggagt catcactcta ggctgagaac atctgggcac acaccctaag cctcagcatg
    tctatcctca gtatgagat ccgactcttg tagaccctg tgtgggattc ggagtcgtac
    <.....HS2.....>

7381 actcatcatg actcagcatt gctgtgcttg agccagaagg tttgctttag aggttacaca
    tgagtagtac tgagtcgtaa cgacacgaac tcggtcttcc aaacgaatct tccaatgtgt
    <.....HS2.....>

7441 gaaccagaag ggggggggtg ggcactgacc ccgacagggg cctggccaga actgctcatg
    cttggctctc cgcaccacc ccgtgactgg ggctgtcccc ggaccggtct tgacgagtac
    <.....HS2.....>

7501 cttggactat gggaggtcac taatggagac acacagaaat gtaacaggaa ctaagggaat
    gaacctgata cctccagtg attacctctg tgtgtcttta cattgtcctt gattccctta
    <.....HS2.....>
    
```

sGbGM

Figura 31 (continuación)

7561 tcoggtgccc tgcttaggag cttaatcttt aatgaaagct aagctttcat taaaaaagt
 aggccacggg acgaatcctc gaattagaaa ttactttcga ttcgaaagta atttttttca
 < RS2
 <<.....RS3.....<

7621 ctaaccagct gcattcgaact ttgactgcag cagctgggta gaaggttcta ctggaggagg
 gattggtoga cgtaagctga aactgaogtc gtcgaccaat cttccaagat gacctcctcc
 <.....RS3.....<

7681 gtcccagccc attgctaaat taacatcagg ctctgagact ggcagtatat ctctaacagt
 cagggtcggg taacgattta attgtagtcc gagactctga ccgtcatata gagattgtca
 <.....RS3.....<

7741 ggttgatgct atcttctgga acttgcoctgc tacattgaga ccaactgacco atacatagga
 ccaactacga tagaagacct tgaacggacg atgtaactct ggtgactggg tatgtatcct
 <.....RS3.....<

7801 agcccatagc tctgtcctga actgttaggo cactggtcca gagagtgtgc atctcctttg
 tcgggtatcg agacaggact tgacaatccg gtgaccaggt ctctcacacg tagaggaaac
 <.....RS3.....<

7861 atctcataa taaccctatg agatagacac aattattact cttactttat agatgatgat
 taggagtatt attgggatac tctatctgtg ttaataatga gaatgaaata tctactacta
 <.....RS3.....<

7921 cctgaaaaca taggagtcaa ggcacttgc cctagctggg ggtatagggg agcagtccca
 ggacttttgt atcctcagtt ccgtgaaocg ggatogacco ccatatcccc tcgtcagggt
 <.....RS3.....<

7981 tgtagtagta gaatgaaaaa tgctgetatg ctgtgcctcc cccacctttc ccatgtctgc
 acatcatcat cttacttttt acgacgatac gacacggagg ggggtgaaag ggtacagacg
 <.....RS3.....<

8041 cctctactca tggctatct ctctggctc ctgggagtea tggactccac ccagcaccac
 ggagatgagt accagataga gaggacogag gaccctcagt acctgaggtg ggtcgtgggt
 <.....RS3.....<

8101 caacctgacc taaccaocta tctgagcctg ccagcctata acccatctgg gcctgatag
 gttggactgg attggtggat agactoggac ggtcggatat tgggtagacc cgggactatc
 <.....RS3.....<

8161 ctggtggcca gcctgacco caccocacco tccttggaac ctctgataga cacatctggc
 gaccaccggt cgggactggg gtggggggg agggaccttg gagactatct gtgtagaccg
 <.....RS3.....<

8221 acaccagctc gaaagtcac cgtgaggggc ttgtgtttgc tgagtcaaaa ttcttgaaa
 tgtggtcgag cgtttcagtg gcactcccag aacacaaaacg actcagtttt aaggaacttt
 <.....RS3.....<

8281 tccaagtcof tagagactcc tgctccocaaa tttacagtca tagacttctt catggctgtc
 aggttcagga atctctgagg acgaggggtt aatgtcagat atctgaagaa gtaccgacag
 <.....RS3.....<

8341 tcctttatcc acagaatgat tcctttgctt cattgccccca tccatctgat cctcctcatc
 aggaaatagg tgtcttacta aggaaaocgaa gtaacgggggt aggtagacta ggaggagttag
 <.....RS3.....<

8401 agtgcagcac agggcccatg agcagtagct gcagagtctc acataggtct ggcactgcct
 tcacgtcgtg tcccgggtac tcgtcatoga cgtctcagag tgtatccaga ccgtgacgga
 <.....RS3.....<

sGbGM

Figura 31 (continuación)

```

8461 ctgacatgtc cgaccttagg caaatgcttg actcttctga gctcggatcc cttgagctca
gactgtacag gctggaatcc gtttacgaac tgagaagact cgagcctagg gaactcgagt
<.....HS3.....<<
>>..HS4....>

8521 ggagggtcaag gctgcagtga gacatgatct tggcactgca ctccagcctg gacagcagag
cctccagttc cgacgtcact ctgtactaga acggtgacgt gaggtcggac ctgtcgtctc
>.....HS4.....>

8581 tgaaaccttg cctcacgaaa cagaatacaa aaacaaacaa acaaaaaact gctccgcaat
actttggaac ggagtgcctt gtcttatggt tttgtttggt tgttttttga cgaggcgtaa
>.....HS4.....>

8641 ggccttcctt gatgctctac cacataggto tgggtacttt gtacacatta tctcattgct
cgogaaggaa ctacgagatg gtgtatccag acccatgaaa catgtgtaat agagtaacga
>.....HS4.....>

8701 gttcataatt gttagattaa ttttgtaata ttgatattat tcttagaaaag ctgaggcctc
caagtattaa caatctaatt aaaacattat aactataata aggatcttcc gactccggag
>.....HS4.....>

8761 aagatgataa cttttatfff ctggacttgt aatagcttcc tcttgtattc accatgttgt
ttctactatt gaaaataaaa gacctgaaca ttatcgaaaag agaacataag tggtaacaac
>.....HS4.....>

8821 aactttctta gagtagtaac aatataaagt tattgtgagt ttttgcaaac acagcaaaaca
ttgaaagaat ctcatcattg ttatatttca ataacactca aaaacgtttg tgtcgtttgt
>.....HS4.....>

8881 caacgaccca tatagacatt gatgtgaaat tgtctattgt caatttatgg gaaaacaagt
gttgctgggt atatctgtaa ctacacttta acagataaca gttaaatacc cttttgttca
>.....HS4.....>

8941 atgtactttt tctactaagc cattgaaaca ggaataacag aacaagattg aaagaataca
tacatgaaaa agatgattcg gtaactttgt ctttattgtc ttgttctaac tttcttatgt
>.....HS4.....>

9001 ttttccgaaa ttacttgagt attatacaaa gacaagcacg tggacctggg aggagggtta
aaaaggcttt aatgaactca taatatgttt ctgttcgtgc acctggacc cctctccaat
>.....HS4.....>

9061 ttgtccatga ctgggtgtg gagacaaatg caggtttata atagatggga tggcatctag
aacaggctact gaccacacac ctctgtttac gtccaaatat tatctacct accgtagatc
>.....HS4.....>

9121 cgcaatgact ttgcatcac ttttagagag ctcttggggg cccaggtaca caagagggga
gcgttactga aacggtagtg aaaatctctc gagaaccccc ggggtcatgt gttctccctc
>.....HS4.....>

9181 cgcagggtat atgtagacat ctattctttt ttcttagtgt gagaataaga atagccatga
gcgtccata tacatctgta gagtaagaaa aagaatcaca ctcttattct tatcggctact
>.....HS4.....>

9241 cctgagttta tagacaatga gcccttttct ctctccact cagcagctat gagatggctt
ggactcaaat atctgttact cgggaaaaga gagaggggtga gtcgtcgata ctctaccgaa
>.....HS4.....>

9301 gccctgcctc tctactaggc tgactcactc caaggcccag caatgggcag ggctctgtca
cgggacggag agatgatccg actgagttag gttccgggtc gttaccgctc ccgagacagt
>.....HS4.....>

```

sGbGM

Figura 31 (continuación)

9361 gggctttgat agcactatct gcagagccag ggccgagaag gggtaggactc cagagactct
cccgaacta tcgtgataga cgtctcggtc cggctcttc cccacctgag gtctctgaga
>.....RS4.....>

9421 cctcccatt cccgagcagg gtttgcttat ttatgcattt Swal aaatgatata tttattttaa
gggagggtaa gggctcgtcc caaacgaata aatacgtaaa tttactatat aaataaaatt
>.....RS4.....>

9481 aagaaataac aggagactgc ccagccctgg ctgtgacatg gaaactatgt agaataattt
ttctttattg tcctctgacg ggtcgggacc gacactgtac ctttgatata tcttataaaa
>.....RS4.....>

9541 gggttccatt ttttttccct tctttcagtt agaggaaaag gggctcactg cacatacact
cccaggtaa aaaaaaagga agaaagtcaa tctccttttc cccgagtgac gtgtatgtga
>.....RS4.....>

9601 agacagaaag tcaggagctt tgaatccaag BclI cctgatcatt tccatgtcat actgagaaag
tctgtctttc agtccctgaa acttaggttc ggactagtaa aggtacagta tgactctttc
>.....RS4.....>

9661 tccccacct tctctgagcc tcagtttctc tttttataag taggagtctg gagtaaatga
aggggtggga agagactcgg agtcaaagag aaaaatattc atcctcagac ctcatctact
>.....RS4.....>

9721 tttccaatgg ctctcatttc aatacaaaat ttcogtttat taaatgcag agcttctggt
aaaggttacc gagagtaaag ttatgtttta aaggcaata atttacgtac tgaagacaa
>.....RS4.....>

9781 actccaagac tgagaaggaa attgaacctg agactcattg actggcaaga tgtccccaga
tgaggttctg actcttccct taacttggac tctgagtaac tgaccgttct acaggggtct
>.....RS4.....>

9841 ggctctcatt cagcaataaa attctcacct tcaccaggc ccaactgagtg tcagatttgc
ccgagagtaa gtcgttattt taagagtggga agtgggtccg ggtgactcac agtctaaacg
>.....RS4.....>

9901 atgcggatcc actagttcta gagcggccgg ggtcgacgaa ttcgagctcg gtacctttaa
tacgcttagg tgatcaagat ctgcgccgcc ccagctgctt aagctcgagc catggaaatt
>..RS4..>>
>>.....3' LTR.....>

9961 gaccaatgac ttacaaggca gctgtagatc ttagccactt tttaaaagaa aaggggggac
ctggttactg aatgttccgt cgacatctag aatcgggtgaa aaattttctt tccccctg
>.....3' LTR.....>

10021 tgaagggtct aattcactcc caacgaagac aagatcgcta EcoRV cggatatctc cggatttatt
accttcccga ttaagtgagg gttgctctcg tctagcgtat cgtatagag gcctaaataa
>.....3' LTR.....>

10081 tgtgaaatth gtgatgctat tgctttatth gaccggctctg ctttttgctt gtactgggtc
acactttaaa cactacgata acgaaataaa ctggccagac gaaaaacgaa catgaccag
>.....3' LTR.....>

10141 tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagggga acccactgct
agagaccaat ctggctctaga ctggaccct cgagagaccg attgatccct tgggtgacga
>.....3' LTR.....>

sGbGM

Figura 31 (continuación)

10201 taagcctcaa taaagcttg^c cttgagt^c tcaagtagtg tgtgcccgct tgtt^cgtgtga
 attcggagtt atttcgaacg gaactcacga agttcatcac acacgggcag acaacacact
 >.....3' LTR.....>

10261 ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcaacgc MluI
 gagaccattg atctctaggg agtctgggaa aatcagtcac accttttaga gatcgttgcg
 >.....3' LTR.....>

10321 gtccatctgt tgtttgcccc tcccccgctc cttccttgac cctggaaggt gccactccca
 caggtagaca acaaacgggg agggggcagc gaaggaactg ggaccttcca cggtgagggg
 >>.....PolyA.....>

10381 ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg catcgcattg tctgagtagg tgtcattcta
 gacaggaag gattatttta ctcccttaac gtacgtaac agactcatcc acagtaagat
 >.....PolyA.....>

10441 ttctgggggg tgggggtgggg cagcacagca agggggagga ttggaagac aatagcaggc
 aagaccccc accccacccc gtcgtgtcgt tccccctct aaccttctg ttatogtccg
 >.....PolyA.....>

10501 atgctgggga tgggggtgggc tctatgggta cccaggtgct gaagaattga cccggttcct
 taagaccct acgccaccgc agatacccat ggtccaoga cttcttaact gggccaagga
 >.....PolyA.....>

10561 cctggggccag aaagaagcag gcacatcccc ttctctgtga cacaccctgt BstXI
 ggaccocggtc tttcttcgct cgtgtagggg aagagacact gtgtgggaca ggtgcgggga
 >.....PolyA.....>

10621 ggttcttagt tccagcccca ctcataggac actcatagct caggagggct ccgccttcaa
 ccaagaatca aggtcggggg gagtatctg tgagtatoga gtccctccga ggcggaagt
 >.....PolyA.....>

10681 tcccaccgc taaagtaact ggagcggctc ctccctcct catcagccca ccaaaccaaa
 aggggtggcg atttcatgaa cctcgcaga gaggagggga gtagtgggt ggtttggtt
 >.....PolyA.....>

10741 cctagcctcc aagagtggga agaaattaa gcaagatagg ctattaagtg cagagggaga
 ggatcggagg ttctaccct tctttaatt cgttctatcc gataattcac gtctcctct
 >.....PolyA.....>

10801 SacII
 gaaaatgcct ccnnnnccgc gggtagtagt tcatgtoatc ttattattca gtatttataa
 cttttacgga ggnnnnngcg cccatcatca agtacagtag aataataagt cataaatatt
 >...PolyA...>

10861 cttgcaaaga aatgaatata agagagtgag aggaacttgt ttattgcagc ttataatggt
 gaacgtttct ttacttatag tctctcactc tccttgaaca aataacgtcg aatattacca

10921 tacaataaaa gcaatagcat cacaaattc acaaataaag catttttttc actgcattct
 atgtttattt cgttatcgta gtgtttaaag tgtttatttc gtaaaaaaag tgacgtaaga

10981 agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggctcta gctatccgc
 tcaacaccaa acaggtttga gtagttacat agaatagtag agaccgagat cgatagggcg

11041 ccctaactcc gcccatccc ccctaactc cgcccagtc cgcctattct cgcctccatg
 gggattgagg cgggtagggc ggggattgag gcgggtcaag gcgggtaaga ggcggggatc

11101 gctgactaat tttttttatt tatgcagagg SfiI
 cgactgatta aaaaaataa atacgtctcc ggcctccgcy gacccggaga ctcgataagg

sGbGM

Figura 31 (continuación)

```

11161  agaagtagtg  aggaggcttt  ttggaggcc  taggcttttg  BsmBI  cgtcgagacg  tacccaattc
      tttcatcac  tctccgaaa  aaacctccg  atccgaaaac  gcagctctgc  atgggttaag

11221  gccctatagt  gagtcgtatt  acgcgcgctc  actggccgtc  gttttacaac  gtcgtgactg
      cgggatatca  ctcagcataa  tgcgcgcgag  tgaccggcag  caaaatgttg  cagcactgac

11281  ggaaaaccct  ggcgttaccc  aacttaatcg  ccttgcaagca  catccccctt  tcgccagctg
      cttttggga  ccgcaatggg  ttgaattagc  ggaacgtcgt  gtagggggaa  agcggtcgac

11341  gcgtaatagc  gaagaggccc  gcaccgatcg  cccttcccaa  cagttgcgca  gcctgaatgg
      cgattatcg  cttctccggg  cgtggctagc  ggaagggtt  gtcaacgcgt  cggacttacc

11401  cgaatggcgc  gacgcgcct  gtacggcgc  attaagcgcg  ggggtgtgg  tggttacgcg
      gcttaccgcg  ctgcgcggga  catgcgcgcg  taattcgcgc  cggccacacc  accaatgcgc
      >>.....ori.....>

11461  cagcgtgacc  gctacacttg  ccagcgcct  agcgcgcgct  ctttcgctt  tcttcccttc
      gtgcactgg  cgatgtgaac  ggtcgcggga  tcgcgggcga  ggaaagcgaa  agaagggaa
      >.....ori.....>

      NaeI
      NgcMIV
11521  ctttctcgc  acgttcgccc  gctttccccc  tcaagctcta  aatcgggggc  tccctttagg
      gaaagagcgg  tgcaagcggc  cgaaggggc  agttcgagat  ttagcccccg  agggaaatcc
      >.....ori.....>

11581  gttccgattt  agtgctttac  ggcacctcga  cccccaaaaa  cttgattagg  gtgatggttc
      caaggctaaa  tcacgaaatg  ccgtggagct  ggggtttttt  gaactaatcc  cactaccaag
      >.....ori.....>

11641  acgtagtggg  ccacgcctt  gatagacggt  ttttcgcctt  ttgacgttgg  agtccacggt
      tgcacacccc  ggtagcggga  ctatctgcc  aaaagcggga  aactgcaacc  tcaggtgcaa
      >.....ori.....>

11701  ctttaatagt  ggactcttgt  tccaaactgg  aacaacactc  aaccctatct  cggctctattc
      gaaattatca  cctgagaaca  aggtttgacc  ttgttgtag  ttgggataga  gccagataag
      >.....ori.....>

11761  ttttgattta  taagggattt  tgccgatttc  ggcctattgg  ttaaaaaatg  agctgattta
      aaaactaaat  attccctaaa  acggctaaag  cgggataacc  aattttttac  tcgactaaat
      >.....ori.....>

11821  acaaaaattt  aacgcgaatt  ttaacaaaat  attaacgttt  acaatttc
      tgtttttaaa  ttgcgcttaa  aattgtttta  taattgcaaa  tgttaaag
      >.....ori.....>>

```

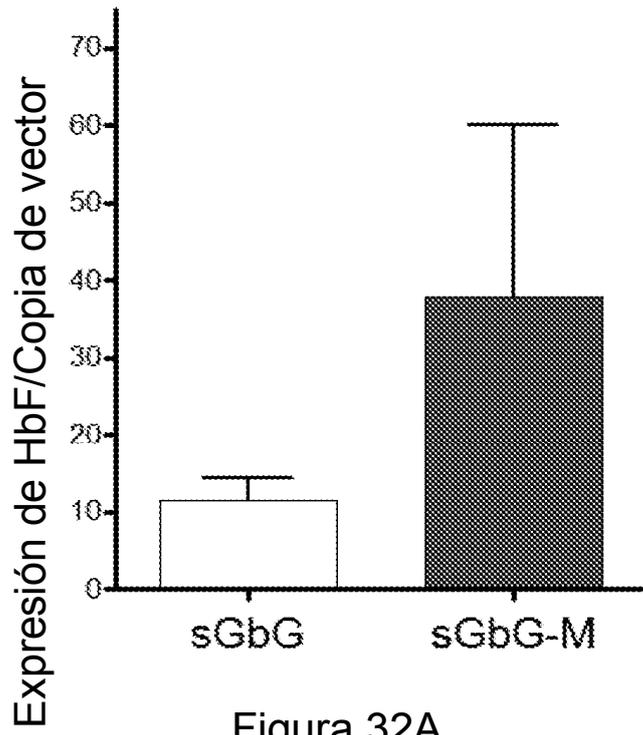


Figura 32A

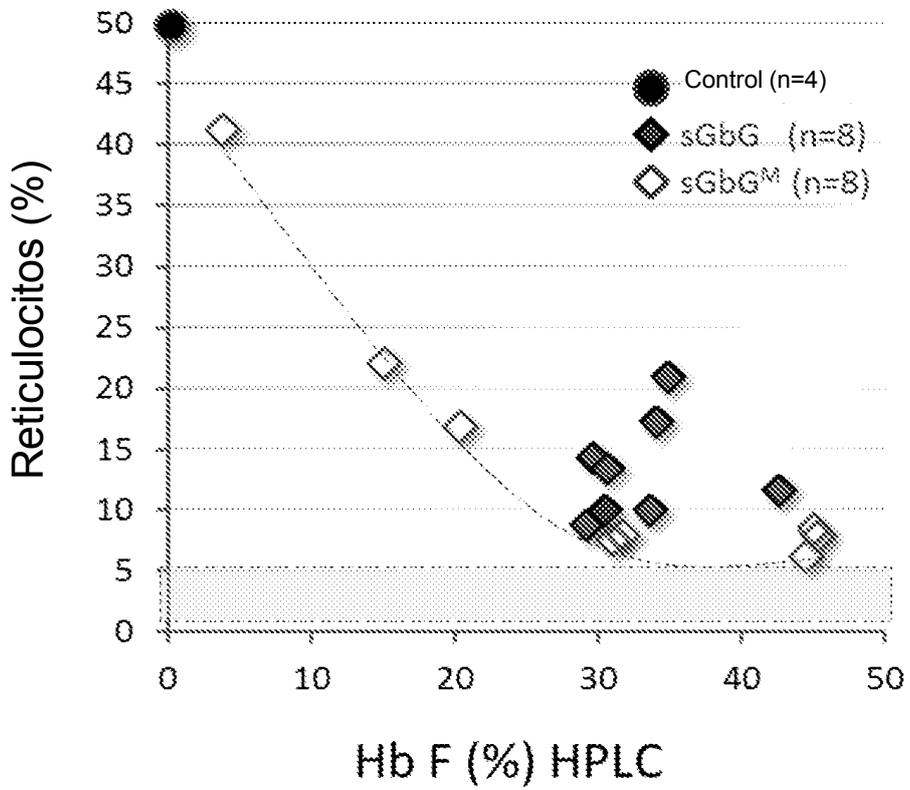


Figura 32B

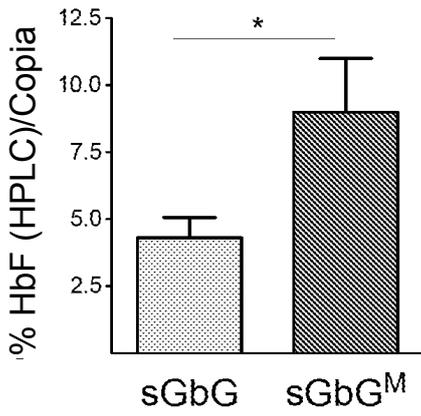


Figura 33A

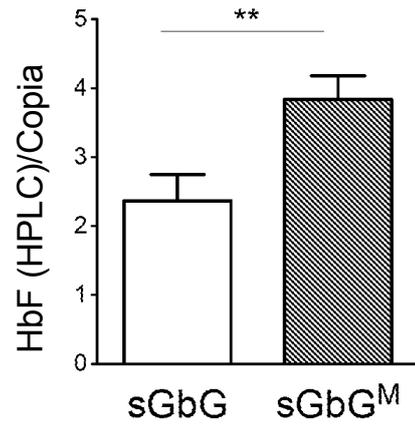


Figura 33B

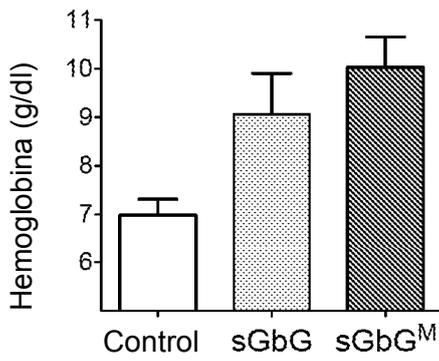


Figura 33C

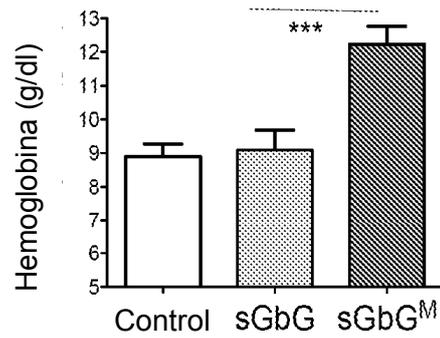


Figura 33D

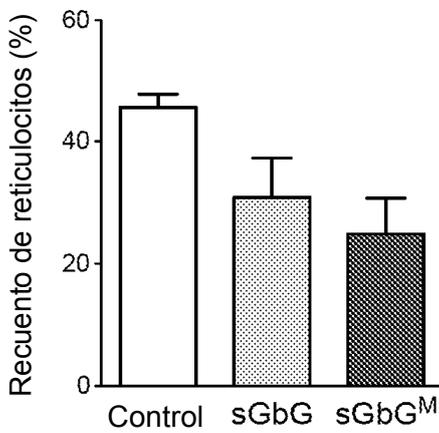


Figura 33E

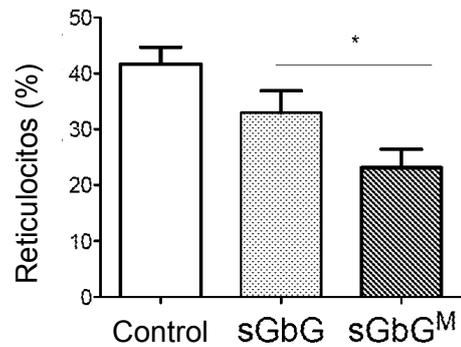


Figura 33F