

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 951**

51 Int. Cl.:

| | |
|--------------------|-----------|
| A61K 35/28 | (2015.01) |
| C12N 5/0789 | (2010.01) |
| A61K 48/00 | (2006.01) |
| C12N 15/867 | (2006.01) |
| C12N 7/00 | (2006.01) |
| C12N 15/86 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2014 PCT/IB2014/065594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15059674**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2014 E 14806726 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3060670**

54 Título: **Método**

30 Prioridad:

24.10.2013 GB 201318830
21.05.2014 GB 201409067

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2020

73 Titular/es:

OSPEDALE SAN RAFFAELE S.R.L. (50.0%)
Via Olgettina 60
20132 Milano, IT y
FONDAZIONE TELETHON (50.0%)

72 Inventor/es:

NALDINI, LUIGI;
GENTNER, BERNHARD, RUDOLF;
ZONARI, ERIKA y
BOCCALATTE, FRANCESCO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 747 951 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a células madre hematopoyéticas (HSC) y a células progenitoras hematopoyéticas. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos mejorados para la modificación genética de las HSC. La presente invención también se refiere a métodos mejorados para el uso de células madre y progenitoras hematopoyéticas modificadas genéticamente en terapia génica.

Antecedentes de la invención

15 El sistema hematopoyético es una jerarquía compleja de células de diferentes linajes celulares maduros. Estos incluyen células del sistema inmunitario que ofrecen protección contra los patógenos, células que transportan oxígeno a través del organismo y células que participan en la curación de las heridas. Todas estas células maduras se derivan de un conjunto de células madre hematopoyéticas (HSC) que son capaces de autorrenovarse y diferenciarse en cualquier linaje de células sanguíneas.

20 Como las HSC tienen la capacidad de reponer todo el sistema hematopoyético, pueden usarse para los trasplantes, por ejemplo, tras ataques hematotóxicos tales como radioterapia o quimioterapia, o para el reemplazo de células leucémicas.

25 El trasplante de células hematopoyéticas (HCT) es una terapia curativa para varios trastornos hereditarios y adquiridos. Sin embargo, el HCT alogénico está limitado por la escasa disponibilidad de donantes compatibles y la mortalidad asociada con el procedimiento alogénico, que se relaciona principalmente con la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) y las complicaciones infecciosas provocadas por el estado profundo y duradero de la disfunción inmunitaria.

30 Los enfoques de terapia génica basados en el trasplante de HSC autólogas modificadas genéticamente ofrecen una seguridad y eficacia potencialmente mejoradas frente al HCT alogénico. Son de particular relevancia para los pacientes que carecen de un donante compatible.

35 El concepto de terapia génica con células madre se basa en la modificación genética de un número relativamente pequeño de células madre. Estas persisten a largo plazo en el organismo al someterse a la autorrenovación, y generan grandes cantidades de progenie "corregida" genéticamente. Esto garantiza un suministro continuo de células corregidas para el resto de la vida del paciente. Las HSC son dianas particularmente atractivas para la terapia génica, ya que su modificación genética se transmitirá a todos los linajes de células sanguíneas a medida que se vayan diferenciando. Además, las HSC pueden obtenerse de manera fácil y segura, por ejemplo, de médula ósea, sangre periférica movilizada y sangre del cordón umbilical.

La modificación genética eficiente a largo plazo de las HSC y su progenie requiere una tecnología que permita una integración estable del ADN corrector en el genoma, sin afectar a la función de las HSC.

45 El beneficio a largo plazo requiere el trasplante de un número suficientemente alto de HSC modificadas, que pueden repoblar la médula ósea condicionada, dando lugar a células sanguíneas corregidas de todos los linajes hematopoyéticos. Por lo tanto, las HSC autólogas ponen el procedimiento de trasplante a disposición de todos los pacientes, evitan los problemas de compatibilidad inmunológica que conducen a la EICH y permiten regímenes de acondicionamiento mínimamente inmunosupresores, reduciendo así drásticamente las complicaciones infecciosas.

50 Los ensayos de terapia génica de HSC basados en lentivirus han demostrado su potencial terapéutico para curar enfermedades genéticas. Sin embargo, siguen existiendo dificultades con los métodos empleados para la modificación genética de las HSC.

55 Los protocolos actuales de terapia génica de HSC (por ejemplo, Cartier N *et al. Science* 2009;326:818-823; Cavazzana-Calvo M *et al. Nature* 2010;467:318-322; Biffi A *et al. Science* 2013;341: 1233158; Aiuti A *et al. Science*. 2013;341:1233151) usan un cultivo *ex vivo* de 2 a 4 días durante el proceso de modificación genética de las HSC. Los tiempos de cultivo más largos generalmente producen niveles de transducción más altos. Sin embargo, el cultivo *ex vivo* impacta negativamente en la función de las HSC, y este efecto negativo se correlaciona claramente con la duración del cultivo (Guenechea G *et al. Blood* 1999;93:1097-1105; Xu R *et al. Transfusion* 2001;41:213-218; Mazurier F *et al. Blood* 2004;103:545-552; Ahmed *et al. Blood* 2004;103:2079-2087; Glimm H *et al. Exp. Hematol.* 2005;33:20-25; Kallinikou K *et al. Br. J. Haematol.* 2012;158:778-787). Aunque se han hecho algunos progresos hacia la mejora de la expansión *ex vivo* de las HSC (Zhang C. C. *et al. Blood* 2008;111:3415-3423; Boitano A. E. *et al. Science* 2010;329:1345-1348; Delaney C *et al. Nat. Med.* 2010;16:232-236; Himburg H. A. *et al. Nat. Med.* 2010;16:475-482; Csaszar E *et al. Cell Stem Cell* 2012;10:218-229; Walasek M. A. *et al. Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012;1266:138-150), los protocolos resultantes presentan varios desafíos para la traducción clínica, ofrecen resultados variables y, a menudo,

poco reproducibles, y todavía necesitan demostrarse en entornos clínicos relevantes. Por consiguiente, el cultivo *ex vivo* en el contexto de la terapia génica de HSC debe ser lo más breve posible.

- 5 Por consiguiente, existe la necesidad de idear protocolos mejorados que permitan una modificación genética eficiente de las células madre hematopoyéticas al tiempo que se reduzca al mínimo el tiempo de cultivo. Además, los protocolos mejorados deben ser adecuados para su uso clínico.

Sumario de la invención

- 10 De manera inesperada, los presentes inventores han demostrado que las HSC CD34+CD38⁻ experimentan una transducción más eficiente cuando están presentes con una alta pureza. Los presentes inventores han desarrollado un protocolo para purificar y transducir estas células de manera adecuada para un uso clínico.

- 15 También han encontrado que la prostaglandina E2 y sus derivados aumentan la eficiencia de la transferencia génica a HSC CD34⁺ y CD34⁺CD38⁻.

Estos hallazgos inesperados dan como resultado una mayor eficiencia de la transducción que permite la reducción de la cantidad de vector aplicada y la reducción al mínimo del cultivo *ex vivo*.

- 20 Continuando con estos hallazgos, los presentes inventores desarrollaron un protocolo innovador que se basa en el trasplante conjunto de células repobladas a largo plazo altamente purificadas, transducidas, (por ejemplo, células que expresan CD34, pero no CD38) con células progenitoras no manipuladas (por ejemplo, células que expresan CD38). Este protocolo puede mejorar la seguridad y la eficacia de la terapia génica mediante:

- 25
 1. el aumento de la eficiencia de la transducción;
 2. la reducción del número de células necesarias para ser transducidas, lo que produce la necesidad de infundir una menor carga de integración en el sujeto;
 3. la garantía de una rápida recuperación hematológica.

- 30 Además, también han desarrollado un protocolo innovador que se basa en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas transducidas.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método para preparar una población de células terapéuticas y una población de células de soporte para uso clínico a partir de una población inicial de células que comprenden células madre hematopoyéticas, comprendiendo dicho método separar una población de células que no expresan sustancialmente CD38, pero que expresan CD34, de la población inicial de células, y transducir la población de células separada con un vector, obteniéndose la población de células terapéuticas que tenga el fenotipo CD34+CD38⁻; y en el que las células que expresan CD38 separadas o una parte de las mismas se conservan para formar una población de células de soporte que tengan el fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38⁺.

40 También se desvela en el presente documento un método para preparar una población de células terapéuticas para uso clínico a partir de una población inicial de células que comprenda células madre hematopoyéticas, comprendiendo dicho método separar una población de células que no expresan sustancialmente CD38, pero que expresan CD34, de la población inicial de células, y transducir la población de células separadas con un vector, preferentemente, un vector vírico, para obtenerse la población de células terapéuticas.

45 En una realización de la presente invención, el método comprende las etapas de:

- 50
 - a. separar células que expresan CD38 de una población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas;

- b. separar las células que expresan CD34 de la población de células que no expresan CD38 obtenida en la etapa (a);

- 55
 - c. transducir la población de células que expresan CD34 obtenida en la etapa (b) con un vector para obtener la población de células terapéuticas.

En una realización de la divulgación, el método comprende las etapas de:

- 60
 - a. poner en contacto una población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas con un agente reactivo a CD38;

- b. separar las células reactivas a CD38 de las células no reactivas a CD38;

- 65
 - c. poner en contacto las células CD38 no reactivas obtenidas en la etapa (b) con un agente reactivo a CD34;

d. separar las células reactivas a CD34 de las células no reactivas a CD34, en el que las células reactivas a CD34 forman la población de células de transducción;

5 e. transducir la población de células de transducción con un vector para obtener la población de células terapéuticas.

En una realización, el vector comprende un nucleótido de interés o es en sí mismo un nucleótido de interés.

10 En una realización de la presente invención, la etapa de transducir una población de células con un vector comprende cultivar las células durante aproximadamente 44 h o más. La "etapa de transducir una población de células con un vector" debe entenderse como las fases de estimulación previa y de exposición al vector. Por ejemplo, la población de células puede cultivarse durante aproximadamente 44-66 h, 44-60 h, 44-54 h o 44-48 h durante la etapa de transducción con un vector. En una realización, la población de células se cultiva durante aproximadamente 66, 60, 15 54, 48 o 44 h durante la etapa de transducción con un vector.

En otra realización de la presente invención, la etapa de transducción de una población de células con un vector comprende cultivar las células (es decir, durante la estimulación previa y el contacto con el vector) durante menos de aproximadamente 44 h. Por ejemplo, la población de células puede cultivarse durante aproximadamente 12-42 h, 12-36 h, 12-24 h o 12-18 h durante la etapa de transducción con un vector. En una realización, la población de células se 20 cultiva durante aproximadamente 42, 36, 30, 24, 18 o 12 h durante la etapa de transducción con un vector. Preferentemente, la población de células se cultiva durante aproximadamente 24 h durante la etapa de transducción con un vector.

25 En una realización de la presente invención, la prostaglandina E2 o un derivado de la misma se usa en los métodos de la invención para aumentar la eficiencia de la transducción.

La prostaglandina E2 o un derivado de la prostaglandina E2 (por ejemplo, 16,16-dimetil-prostaglandina E2 (dmPGE2) se puede añadir a la población de células durante la etapa de transducción con un vector, preferentemente, durante 30 la fase de estimulación previa de esta etapa. La prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se pueden añadir al comienzo de la fase de estimulación previa o durante la fase de estimulación previa. Por ejemplo, la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se pueden añadir aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 h antes de la exposición de la población de células al vector. Preferentemente, la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se añade a la población de células durante la fase de estimulación previa, 35 aproximadamente 2 h antes de la exposición de las células al vector. En otra realización, la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se añade a la población de células al mismo tiempo que tiene lugar la exposición al vector.

40 En una realización de la presente invención, la población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas se obtiene de una muestra de tejido.

En otra realización, la población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas se obtiene de sangre periférica movilizada, médula ósea o sangre del cordón umbilical.

45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de células terapéuticas preparada de acuerdo con un método de la invención.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de células de soporte preparada de acuerdo con un método de la invención.

50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende la población de células terapéuticas o la población de células de soporte de la divulgación, preferentemente, en presencia de un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 En otro aspecto, la invención proporciona una población de células terapéuticas para su uso en medicina, en la que la población de células terapéuticas tiene el fenotipo CD34+CD38⁻ y se prepara de acuerdo con un método de la invención, y en la que la población de células terapéuticas se administra en combinación con una población de células de soporte que tiene el fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38⁺, y se prepara de acuerdo con un método de la invención.

60 En otro aspecto, la invención proporciona una población de células de soporte para su uso en medicina, en la que la población de células de soporte tiene el fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38⁺, y se prepara de acuerdo con un método de la invención, y en la que la población de células de soporte se administra en combinación con la población de células terapéuticas que tiene el fenotipo CD34+CD38⁻ y se prepara de acuerdo con un método de la invención.

65 En una realización, la población de células terapéuticas se administra a un sujeto antes de la administración de la

población de células de soporte.

En otra realización, la población de células terapéuticas se administra a un sujeto contemporánea o simultáneamente a la administración de la población de células de soporte.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que comprende las poblaciones de células terapéuticas y de soporte de la divulgación.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento que comprende administrar la población de células terapéuticas de la divulgación a un sujeto que lo necesite.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento que comprende administrar la población de células terapéuticas de la divulgación y la población de células de soporte de la divulgación a un sujeto que lo necesite.

15 Preferentemente, el tratamiento es un tratamiento mediante terapia génica.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de células progenitoras hematopoyéticas para su uso en terapia génica, en la que la población de células progenitoras hematopoyéticas ha sido transducida con un nucleótido de interés.

20 La etapa de transducción con un nucleótido de interés puede, por ejemplo, utilizar cualquiera de los métodos de transducción celular descritos en el presente documento.

25 En otro aspecto, la invención proporciona una población de células progenitoras hematopoyéticas para su uso en terapia génica, en la que dichas células se han separado de una población de células que comprende células madre y células progenitoras hematopoyéticas, y luego se han transducido con un nucleótido de interés, en la que la población de células progenitoras hematopoyéticas tiene un fenotipo seleccionado del grupo que consiste en CD34+CD38^{int}, CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y CD34+CD38+, y en la que la población de células progenitoras transducidas se administra en combinación con una población de células madre hematopoyéticas.

30 Por lo tanto, la población de células progenitoras hematopoyéticas puede, por ejemplo, no comprender células del fenotipo CD34+CD38⁻.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de terapia génica que comprende administrar una población de células progenitoras hematopoyéticas a un sujeto que lo necesite, en la que la población de células progenitoras hematopoyéticas ha sido transducida con un nucleótido de interés.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para controlar la duración de la expresión transgénica en un paciente, en el que la duración de la expresión transgénica se controla administrando selectivamente células madre y/o progenitoras hematopoyéticas transducidas basándose en nivel de expresión de CD38. Se puede lograr una mayor duración de la expresión transgénica administrando células con niveles reducidos de expresión de CD38.

45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de prostaglandina E2 o un derivado de prostaglandina E2 para aumentar la eficiencia de la transferencia génica cuando se transducen células madre o progenitoras hematopoyéticas con un vector, preferentemente, un vector vírico.

En una realización, el derivado de prostaglandina E2 es 16,16-dimetil-prostaglandina E2.

50 La prostaglandina E2 o un derivado de la prostaglandina E2 (por ejemplo, 16,16-dimetil-prostaglandina E2 (dmPGE2) se puede añadir a la población de células durante la fase de estimulación previa. En una realización, la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se añade al comienzo de la fase de estimulación previa. En otra realización, la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se añade durante la fase de estimulación previa.

55 Por ejemplo, la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se pueden añadir aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 h antes de la exposición de la población de células al vector. Preferentemente, la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se añade a la población de células durante la fase de estimulación previa, aproximadamente 2 h antes de la exposición de las células al vector.

60 En otra realización, la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se añade a la población de células al mismo tiempo que tiene lugar la exposición al vector.

65 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para transducir una población de células con un vector, preferentemente, un vector lentivírico, en la que la etapa de transducir una población de células con un vector comprende cultivar las células durante aproximadamente 44 h o más. La "etapa de transducir una población de células con un vector" debe entenderse como las fases de estimulación previa y de exposición al vector. Por ejemplo, la

población de células puede cultivarse durante aproximadamente 44-66 h, 44-60 h, 44-54 h o 44-48 h durante la etapa de transducción con un vector. En una realización, la población de células se cultiva durante aproximadamente 66, 60, 54, 48 o 44 h durante la etapa de transducción con un vector.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para transducir una población de células con un vector, preferentemente, un vector lentivírico, en la que la etapa de transducción de una población de células con un vector comprende cultivar las células (es decir, durante la estimulación previa y el contacto con el vector) durante menos de aproximadamente 44 h. Por ejemplo, la población de células puede cultivarse durante aproximadamente 12-42 h, 12-36 h, 12-24 h o 12-18 h durante la etapa de transducción con un vector. En una realización, la población de células se cultiva durante aproximadamente 42, 36, 30, 24, 18 o 12 h durante la etapa de transducción con un vector. Preferentemente, la población de células se cultiva durante aproximadamente 24 h durante la etapa de transducción con un vector.

15 Se apreciará que las etapas del método de preparación de la población de células terapéuticas descrito en el presente documento se pueden llevar a cabo en un orden diferente. Así pues, el método de preparación de la población de células terapéuticas puede comprender las etapas de:

- a. separar células que expresan CD34 de una población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas;
- 20 b. separar las células que expresan CD38 de la población de células que expresan CD34 obtenida en la etapa (a);
- c. transducir la población de células que no expresa CD38 obtenida en la etapa (b) con un vector para obtener la población de células terapéuticas.

25 Las células o parte de las mismas obtenidas en la etapa (b) que expresan CD38 pueden conservarse para formar una población de células de soporte.

30 La presente solicitud se refiere a los usos de una población de células de soporte. En un aspecto de la presente invención, la población de células de soporte a la que se hace referencia en el presente documento puede reemplazarse por la población de células de soporte definida anteriormente.

35 Como alternativa, las células o parte de las mismas obtenidas en la etapa (b) que expresan CD38 pueden transducirse con un vector. Dichas células transducidas podrían usarse en terapia (por ejemplo, administradas a un sujeto). Este enfoque puede permitir la administración transitoria de un gen (por ejemplo, un gen terapéutico) a un sujeto (tal como para su uso en la terapia génica del cáncer).

Descripción de los dibujos

40 Figura 1

(A) Se descongelaron células CD34+ de sangre del cordón umbilical o médula ósea adulta (Lonza), se estimularon previamente con SCF, FLT3L, TPO e IL6 durante 12 h, se tiñeron con anticuerpos anti-CD34, anti-CD133 y anti-CD38, y se clasifican por FACS en las subpoblaciones indicadas en el eje x de los gráficos de barras. El protocolo de CLASIFICACIÓN-VL abarca la transducción con un vector lentivírico (PGK.GFP, 10⁸ UT/ml) 12 h tras la clasificación, mientras que en el protocolo del VL-CLASIFICACIÓN, se transducen células CD34+ en masa con vectores lentivíricos tras 24 h de estimulación previa, seguida de la clasificación al día siguiente. Las eficiencias de transducción se midieron mediante análisis de número de copias del vector (NCV) tras 14 días de cultivo *in vitro* en condiciones de diferenciación (ensayo de formación de colonias o cultivo líquido) o mediante análisis de citometría de flujo tras 7 días de cultivo (gráfico de barras verde, panel inferior izquierdo). En el caso de la médula ósea, el NCV se determinó tanto en el crecimiento total de la colonia como en las colonias mieloides y eritroides por separado al extraer colonias individuales bajo guía microscópica.

55 (B) Se descongelaron células CD34+ de 4 donantes de sangre del cordón umbilical (Lonza) y se dividieron en 2 grupos: Células en masa: células CD34+; Células madre: células CD34+ CD38⁻ clasificadas obtenidas de la masa (ventana de análisis de CD38: 10 % más inferior; anticuerpo CD38: IB2-PEVio770, Miltenyi). Se dispusieron ambos grupos en cultivo a una densidad de 10⁶ células/ml en medio libre de suero StemSpan (SFEM) complementado con 100 ng/ml de SCF, FLT3L a 100 ng/ml, TPO a 50 ng/ml, IL-6 a 50 ng/ml y se prestimularon durante 18 h. La transducción se realizó con un vector lentivírico PGK.GFP a 10⁸ UT/ml. Se inyectaron las células a ratones NSG de 8 semanas de vida, irradiados subletalmente (células en masa: 1,26 x 10⁵ células/ratón; n = 6; Células madre: 1,8 x 10⁴ células/ratón; n = 6). Se evaluó el número de copias del vector mediante qPCR realizada en células nucleadas de sangre periférica a los 3 meses del trasplante, usando cebadores específicos para células humanas.

65 (C) NCV realizado a las 20 semanas después del trasplante en la médula ósea de los ratones hematoquímicos descritos en (B). El mayor nivel de transferencia génica a las células CD34+ CD38⁻ con

respecto al total de células CD34+ se mantiene a largo plazo en los xenoinjertos derivados de las respectivas poblaciones iniciales.

Figura 2

5 Se recogió sangre del cordón umbilical total (40 ml) de la vena umbilical después del parto por cesárea, de acuerdo con los protocolos aprobados en Ospedale san Raffaele. Se aislaron células mononucleares (2×10^8) mediante Ficoll y se marcaron con un cóctel de anticuerpos de linaje y CD38 (Miltenyi, Cat 130-092-263). Se unieron células marcadas positivamente (10^8) a microperlas magnéticas y se separaron mediante una columna LD (Miltenyi). Se incubó el flujo continuo (10^8 células Lin⁻/CD38⁻) con microperlas CD34 (Miltenyi), y se enriquecieron las células CD34+CD38⁻ en una columna de MS. Para permitir el seguimiento de la producción hematopoyética de las subpoblaciones de CD38⁺ y CD38⁻ en ratones NSG, se clasificaron por FACS las fracciones Lin⁺/CD38⁺ (primera columna) y CD34+CD38⁻ (segunda columna) para CD34 (produciendo células CD34+CD38⁺ y CD34+CD38⁻ altamente puras, respectivamente).
10 La repetición del análisis muestra la separación basada en perlas en células CD38⁻/_{baja} y CD38⁺. Estas fracciones se marcaron diferencialmente con un vector lentivírico que expresaba GFP y OFP, se mezclaron en una proporción de 1:5 (CD34+38⁻: CD34+38⁺) y se inyectaron en n = 4 ratones NSG. Se siguió el quimerismo de GFP/OFP durante 28 semanas.
15

Figura 3

20 Modelización del trasplante conjunto de células madre/progenitoras en ratones NSG: médula ósea CD38⁻ frente a CD38^{alta}. Se clasificaron células madre y progenitoras hematopoyéticas de médula ósea adultas CD34+CD38⁻ (+/-) y CD34+CD38^{alta} (+/alta), se estimularon previamente en SFEM StemSpan que contenía SCF (300 ng/ml), Flt3L (300 ng/ml), TPO (100 ng/ml), IL6 (60 ng/ml) y dmPGE2 (10 μM) durante 16 h y se transdujeron con un VL de GFP (+/-) o VL de OFP (+/alta). Tras 24 h de transducción, se inyectaron las células en ratones NSG irradiados subletalmente, de 8 semanas de vida, de la siguiente manera:
25

- Grupo 1: 27.000 células CD34+CD38⁻ por ratón (n = 3);
- Grupo 2: 248.000 células CD34+CD38^{alta} por ratón (n = 3);
- Grupo 3: 27.000 células CD34+CD38⁻ y 248.000 células CD34+CD38^{alta} por ratón (n = 3)

30 Se monitorizaron el injerto (grupo 1, 2, 3) y el quimerismo (grupo 3) con el tiempo en la sangre periférica, y se analizaron los órganos hematopoyéticos 18 semanas después del trasplante.

Figura 4

35 (A) Modelización del trasplante conjunto de células madre/progenitoras en ratones NSG: sangre periférica movilizada CD38⁻ frente a CD38^{intm1} frente a CD38^{intm2} frente a CD38^{alta}. Se clasificó la SPM CD34+ en 4 subconjuntos con niveles crecientes de expresión de CD38 (CD34+/CD38⁻; CD34+/CD38^{int1}; CD34+/CD38^{int2}; CD34+/CD38^{alta}), se estimularon previamente estos subconjuntos en SFEM StemSpan que contiene SCF (300 ng/ml), Flt3L (300 ng/ml), TPO (100 ng/ml), IL6 (60 ng/ml) y dmPGE2 (10 μM) durante 16 h y se transdujeron los subconjuntos con los siguientes vectores lentivíricos: CD34⁺/CD38⁻: GreenFP.LV; CD34⁺/CD38^{int1}: CherryFP.LV; CD34⁺/CD38^{int2}: CyanFP.LV; OrangeFP.LV CD34⁺/CD38^{alta}. Tras 24 h de transducción, se inyectaron las células en ratones NSG irradiados subletalmente, de 8 semanas de vida, de la siguiente manera:
40

- Grupo 1: 129.000 células CD34+/CD38⁻ por ratón (n = 6);
- Grupo 2: 869.000 células progenitoras (suma de células CD34+/CD38^{int1} CD34+/CD38^{int2} y CD34+/CD38^{alta}, contribuyendo cada población en un 33 % a la mezcla de células progenitoras) por ratón (n = 7);
- Grupo 3: una mezcla de 129.000 CD34⁺/CD38⁻ y 869.000 células progenitoras agrupadas por ratón (n = 6).

45 Se monitorizaron el injerto (grupo 1, 2, 3) y el quimerismo (grupo 3) con el tiempo en la sangre periférica.

50 (B) Se clasificaron las células CD34⁺ de sangre periférica movilizadas con G-CSF de acuerdo con los niveles de expresión de CD38, y se marcaron diversas fracciones con 4 vectores lentivíricos que expresaban diferentes proteínas de fluorescencia, como se describe en la Figura 4 (A) anterior. Se agruparon las fracciones marcadas diferencialmente (correspondientes al Grupo 3 de la Figura 4 (A)) y se inyectaron en ratones NSG irradiados subletalmente de 8 semanas de vida. N = 2 donantes de células de sangre periférica movilizadas (CD34+) adquiridas en Stem Cell Technologies), 2 experimentos independientes.
55

60 Se muestra la contribución relativa de las subfracciones CD38 al injerto humano a lo largo del tiempo (n = 10 ratones por punto de tiempo, 6 del Experimento 1 y 4 del Experimento 2; media+/- ETM).
Experimento 1: Grupo 3, una mezcla de 129.000 CD34+CD38⁻ (0-12 %) y 869.000 células progenitoras agrupadas CD34+CD38^{baja-int-alta} (12-100 %) por ratón (n = 6).
Experimento 2: Grupo 3, una mezcla de 149.000 CD34+CD38⁻ (0-12 %) y 1.320.000 células progenitoras agrupadas CD34+CD38^{baja-int-alta} (12-100 %) por ratón (n = 4).
65

Figura 5

(A) El efecto de dmPGE2 en las células CD34+ de sangre del cordón umbilical (*in vitro*).

Se descongelaron células CD34+ de n = 4 donantes de sangre del cordón umbilical (Lonza) y se pusieron en cultivo en medio de expansión libre de suero StemSpan (SFEM) complementado con 100 ng/ml de SCF, FLT3L a 100 ng/ml, TPO a 50 ng/ml, IL6 a 50 ng/ml durante 18 h (estimulación previa), en presencia o ausencia de dmPGE2 10 μ M. Tras la estimulación previa, las células se incubaron con 10⁸ UT/ml de un vector lentivírico durante 24 h. Las células se cultivaron luego *in vitro* (n = 5 repeticiones) durante 14 días en IMDM + FCS al 10 % antes de que se midiera el número de copias del vector (NCV) mediante qPCR como se describe en Gentner, B. *et al.* (2009) *Nat. Métodos* 6: 63-6. La estimulación previa de dmPGE2 dio produjo un aumento del 50 % en la transferencia de genes.

(B) El efecto de dmPGE2 sobre LAS células madre de sangre periférica CD34+ movilizadas por G-CSF (*in vitro*). N = 6 transducciones de 3 donantes de sangre periférica movilizada. Se descongelaron las células, se volvieron a suspender en medio de cultivo comercial libre de suero (por ejemplo, Cell-Gro) a una densidad de 10⁶ células/ml en presencia de las siguientes citocinas: SCF a 300 ng/ml, FLT3L a 300 ng/ml, TPO a 100 ng/ml, IL-3 a 60 ng/ml, y se estimularon previamente durante 18 h, en ausencia (control, Ctrl) o presencia de dmPGE2. La transducción se realizó con vectores lentivíricos (3 lotes diferentes) a 10⁸ UT/ml durante 12-24 h. Se evaluó el número de copias del vector mediante qPCR tras 14 días de cultivo *in vitro* en IMDM y FCS al 10 %. Se muestra el NCV relativo (normalizado con respecto al grupo de control).

(C) El efecto del momento de la estimulación de dmPGE2 sobre la transductividad de HSPC humanas por vectores lentivíricos.

El efecto parece maximizarse cuando se añade dmPGE2 2 h antes de la exposición al VL (t = -2 h: aumento del 100 % en el NCV), mientras que la adición de dmPGE2 en el momento de la descongelación (t = -16 h) produjo un aumento de ~ 50 % del NCV, similar a los experimentos mostrados en (A) y (B). Este experimento se realizó con 1 donante de sangre de cordón umbilical y 1 donante de sangre periférica movilizada, se muestra el NCV relativo (normalizado con respecto a su respectivo control).

(D) El aumento del número de copias del vector obtenido mediante la estimulación de dmPGE2 *ex vivo* se mantiene a largo plazo en la progenie de las células CD34+ derivadas de la sangre del cordón umbilical después del xenotrasplante.

Se descongelaron las células CD34+ de sangre del cordón umbilical y se colocaron en cultivo (10⁶ células/ml) en medio libre de suero StemSpan (SFEM) complementado con 100 ng/ml de SCF, FLT3L a 100 ng/ml, TPO a 50 ng/ml, IL-6 a 50 ng/ml durante 18 h (estimulación previa) y posteriormente se transdujeron con un vector lentivírico a 10⁸ UT/ml durante 24 h. Se inyectaron células en ratones NSG de 8 semanas irradiados subletalmente (1,5-3 x 10⁵ células por ratón) y se analizó el número de copias del vector (NCV) en la sangre o médula ósea agrupadas de cada grupo de ratones en los puntos de tiempo indicados usando cebadores específicos para células humanas. Se muestran 3 experimentos replicados. Gráfico izquierdo: Las células se transdujeron con un VL PGK.TRAIL, y se añadió dmPGE2 10 μ M (grupo de dmPGE2, n = 5 ratones) o DMSO (grupo de Ctrl, n = 5 ratones) directamente tras la descongelación (t = -16 h con respecto a la adición del vector). Gráfico intermedio: Las células se transdujeron con un VL PGK.TRAIL, y se añadió dmPGE2 10 μ M (grupo de dmPGE2 n = 5) o DMSO (grupo de Ctrl; n = 8) 120 minutos antes de la adición del vector (t = -2 h). Gráfico intermedio: Las células se transdujeron con un VL PGK.OFP, y se añadió dmPGE2 10 μ M (grupo de dmPGE2 n = 5) o DMSO (grupo de Ctrl; n = 5) 120 minutos antes de la adición del vector (t = -2 h). En los tres experimentos, el beneficio en la transducción observado *in vitro* se mantuvo estable a largo plazo, hasta 18 semanas después del xenotrasplante.

(E-G) El aumento en el número de copias del vector obtenido mediante la estimulación de dmPGE2 *ex vivo* se mantiene a largo plazo en la progenie de células CD34+ de fuentes adultas (tales como la sangre periférica movilizada) solo cuando se usan condiciones de cultivo específicas, es decir, cuando se reduce el tiempo total de cultivo a menos de 44 h.

Se descongelaron células CD34+ de la sangre periférica movilizada (SPm) con G-CSF y se colocaron en cultivo (10⁶ células/ml) en medio CellGro complementado con SCF (300 ng/ml), FLT3L (300 ng/ml), TPO (100 ng/ml) y IL-3 (60 ng/ml). Las células se transdujeron con vectores lentivíricos de tercera generación codificantes de gp91phox (vectores adecuados para la terapia génica de la enfermedad granulomatosa crónica) a una dosis de 10⁸ UT/ml. Los diferentes protocolos usados para la transducción *ex vivo* de células de SPm CD34+ se ilustran en (E), y difieren en términos de la presencia (P1, P2, P3) o ausencia (P0, P4) de dmPGE2, El momento de la adición de dmPGE2 (tras la descongelación: P1, P2; 120 min antes de la transducción: P3) y la duración del cultivo (24 h: P2, P4 frente a 44 h: P0, P1, P3).

(F) Se descongelaron 10 x 10⁶ células de SPm CD34+ del donante 1, se dividieron en 4 partes iguales y se transdujeron con el VL SP146/gp91.cogp91^{phox}.126T de una producción de grado industrial (Molmed Spa) de acuerdo con P0, P1, P2 o P3. Se inyectó la excrecencia de 5 x 10⁵ células puestas en cultivo en el momento cero por ratón (números reales: P0 3,66 x 10⁵ por ratón; P1: 4,66 x 10⁵ por ratón; P2: 3,0 x 10⁵ por ratón; P3: 4,86 x 10⁵ por ratón). Los ratones fueron sacrificados a las 20 semanas del trasplante. Se lavó abundantemente

la médula ósea y se agrupó de los ratones pertenecientes al mismo grupo (P0, P1, P2: n = 5 por grupo; P3: n = 3 por grupo) y se agotó para las células del ratón. Se sometieron células humanas enriquecidas a un análisis del número de copias de vector (NCV) usando cebadores específicos para células humanas (5 réplicas técnicas). Las estadísticas se realizaron mediante ANOVA unidireccional con corrección posterior a la prueba de Bonferroni, y demostraron un aumento de ~50 % en el NCV en las células repobladas a largo plazo en la condición P2.

Se realizó un experimento por duplicado usando células de SPm CD34+ de un segundo donante (G). Se descongelaron 15×10^6 células de SPm CD34+, se dividieron en 4 partes iguales y se transdujeron con el VL SP146/gp91.gp91^{PhoxTGT.126T} (un vector adecuado para la terapia génica de CGD) procedente de una producción de grado de laboratorio de acuerdo con los protocolos P0, P1 (44 h -/+ dmPGE2) o P4, P2 (24 h -/+ dmPGE2). Se inyectó la excrecencia de 9×10^5 células puestas en cultivo en el momento cero por ratón (números reales: P0 10×10^5 por ratón; P1: $8,2 \times 10^5$ por ratón; P4: $4,5 \times 10^5$ por ratón; P2: $5,3 \times 10^5$ por ratón). Se analizó el NCV en células de médula ósea de cada ratón individual 13 semanas después del trasplante usando un ensayo de qPCR específico para células humanas. En línea con el primer experimento, la condición P1 no produjo una ganancia sostenida en la eficiencia de la transducción mediada por dmPGE2 en células repobladas a largo plazo de fuentes adultas, en marcado contraste con las células progenitoras de SPM CD34+, en las que el protocolo P1 produjo un aumento del NCV usando lecturas *in vitro* (véase la Figura 5B), y en contraste con la sangre del cordón umbilical, en la que dmPGE2 asociado con el protocolo de cultivo "convencional" conduce a un aumento del NCV en la repoblación a largo plazo células (Figura 5D). Inesperadamente, se descubrió que el acortamiento del protocolo de cultivo de las células de SPM CD34+ a 24 h (P2) no solo rescató el efecto potenciador de la transducción de dmPGE2 en células repobladas a largo plazo, sino que también aumentó la transducción muy por encima de los niveles alcanzados mediante un protocolo convencional de 44 h. Las posibles explicaciones incluyen

- un efecto dependiente del tiempo de exposición de dmPGE2 en HSC (pero no en las progenitoras), en el que la ventana de permisividad a la transducción con el VI está limitada a 16-24 h (en línea con esta hipótesis: aunque no sea estadísticamente significativo, el protocolo P3 en el que se pospuso la exposición a dmPGE2 con respecto a P1 puede sugerir algún aumento en el NCV; véase la Figura 5F)
- la existencia de especies de HSC funcionalmente diferentes, una que es sensible a la estimulación de dmPGE₂, pero que pierde potencial de injerto tras 24 h en cultivo, y una que es insensible a dmPGE2, pero que mantiene mejor el potencial de injerto en cultivo, por lo que predomina en cultivos más largos.

Figura 6

El uso de dmPGE2 aumenta la transferencia génica a HSC CD34+, CD34+ CD38- y células progenitoras CD34+ CD38+ de médula ósea adulta.

Los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente manera: Las células CD34+ de N = 3 donantes de médula ósea (Lonza) se descongelaron y se pusieron en cultivo en medio de expansión libre de suero StemSpan (SFEM) en las siguientes condiciones: estimulación previa en SCF a 300 ng/ml, FLT3L a 300 ng/ml, TPO a 100 ng/ml, IL3 a 60 ng/ml durante 18 h. Las células se dividieron en 3 grupos: CD34+ en masa, CD34+CD38-, CD34+CD38+ (clasificadas por FACS en un citómetro Mo-Flow tras marcar con el anticuerpo CD38-APC de BD Bioscience). Luego se añadió dmPGE2 (10 μ M) o DMSO a los cultivos, y se estimularon previamente las células durante otras 16 h antes de que fueran transducidas con un vector lentivírico que expresaba GFP (VL.PGK.GFP) a 10^8 UT/ml. Se realizaron ensayos de cultivo *in vitro*, bien en forma de cultivo líquido durante 14 días en IMDM+ FCS al 10 % (izquierda) o ensayo de células formadoras de colonias (CFC) (derecha; sembradas a 800 células/ml de MethoCult, crecimiento de colonias analizado tras 14 d). El número de copias del vector se evaluó mediante qPCR como se describe en Gentner B *et al.* Nat. Methods 2009;6:63-66.

Figura 7

Modelización de la administración conjunta de células madre CD34+ CD38- cultivadas/transducidas con células progenitoras CD34+CD38^{int/+} no cultivadas.

Se obtuvieron células sanguíneas periféricas movilizadas con G-CSF por leucaféresis, se enriquecieron en células CD34+, se clasificaron en una fracción de células madre CD38- más primitiva (percentil de CD38 del 0-7 %) y una fracción de células progenitoras CD38^{int/+} (percentil de CD38 del 13-100 %) mediante FACS (clasificador MoFlo XDP y anticuerpo CD38 PE-Vio770 Miltenyi). Se congelaron múltiples alícuotas de cada fracción.

(A) Se descongeló la fracción CD34+ CD38- (Madre), se volvió a suspender en medio de expansión sin suero StemSpan (SFEM) complementado con SCF a 300 ng/ml, FLT3L a 300 ng/ml, TPO a 100 ng/ml, IL-3 a 60 ng/ml y dmPGE2 10 μ M a una densidad de 10^6 células/ml. Las células se estimularon previamente durante 20 h (recuadro gris del esquema) y se transdujeron con un vector lentivírico PGK.GFP (10^8 UT/ml) durante 24 h (recuadro rojo) como se muestra en el esquema. Después se mezclaron células madre cultivadas/modificadas genéticamente con progenitoras CD34+CD38^{int/+} recién descongeladas en una proporción de 1:8, y se inyectaron en ratones NSG irradiados subletalmente de 8 semanas de vida (47.400 CD34+CD38-/327.000 células progenitoras no cultivadas por ratón, n = 6). La eficiencia de transducción del compartimento de células madre fue del 95 % *in vivo*, medida en ratones NSG trasplantados exclusivamente con células madre CD34+CD38- (n = 6). El gráfico de la izquierda muestra el porcentaje de células GFP+ en el injerto humano (círculos rellenos) en los puntos de tiempo indicados como un marcador sustituto para las células derivadas de

células CD34⁺CD38⁻ cultivadas, y el porcentaje de células GFP⁻ (círculos sin rellenar) como marcador sustituto de células derivadas del injerto de células progenitoras no cultivadas. A las 24 semanas del trasplante de médula ósea, un punto de tiempo que refleja la hematopoyesis derivada de HSC, Aproximadamente el 60 % del injerto era GFP⁺ y, por lo tanto, derivaba de la fracción de células madre CD34⁺ CD38⁻. Esta cifra fue similar para todos los linajes (gráfico de la derecha), incluyendo los linfocitos B (CD19⁺), células mieloides (CD33⁺) y HSPC CD34⁺. Por otro lado, el 30-40 % del injerto a largo plazo parece derivarse de progenitoras CD34⁺CD38^{int/+}, una fracción inesperadamente alta en comparación con los estudios descritos en la Figura 4. Además, pasaron 15 semanas antes de que se alcanzara el equilibrio entre la contribución de las células madre y progenitoras (Figura 7A), a diferencia de las 9 semanas en los estudios descritos en la Figura 4B.

(B) Con el fin de mejorar el protocolo de terapia génica basado en la infusión de HSC modificadas con genes altamente enriquecidas y el soporte de células progenitoras no cultivadas, los presentes inventores modelizaron la proporción de las células madre con respecto a las células progenitoras (1: 5 frente a 1:10) y las condiciones de cultivo (tiempo de cultivo reducido a 24 h, evitando las citocinas de células progenitoras tales como IL3) para permitir un mejor mantenimiento de las funciones de HSC en las células CD34⁺CD38⁻. Se descongelaron células CD34⁺CD38⁻ (Madre) del mismo donante que en (A), se volvieron a suspender en medio CellGro complementado con SCF a 300 ng/ml, FLT3L a 300 ng/ml, TPO a 100 ng/ml y dmPGE2 10 μM a 10⁶/ml y se estimularon previamente durante 16 h (recuadro gris del esquema). La transducción se realizó con un vector lentivírico PGK.GFP a 10⁸ UT/ml durante 8 h (recuadro rojo) como se muestra en el esquema. se mezclaron células madre cultivadas/modificadas genéticamente con progenitoras CD34⁺CD38^{int/+} recién descongeladas en una proporción de 1:5 (46.500 CD34⁺CD38⁻/232.500 células progenitoras no cultivadas por ratón, n = 5) o 1:10 (46.500 CD34⁺CD38⁻/465.000 células progenitoras no cultivadas por ratón, n = 5) y se inyectaron en ratones NSG irradiados subletalmente, de 8 semanas de vida. Los gráficos superiores muestran el porcentaje de células GFP⁺ en el injerto humano (círculos rellenos) en los puntos de tiempo indicados como un marcador sustituto para las células derivadas de células CD34⁺CD38⁻ cultivadas, y el porcentaje de células GFP (círculos sin rellenar) como un marcador sustituto para células derivadas del injerto de células progenitoras no cultivadas. Se observó una contribución mucho más rápida de las células madre CD34⁺CD38⁻ transducidas, alcanzando hasta el 70 % ya a las 12 semanas (en comparación con el 40 % en la Figura 7A). La fracción de células GFP⁺ fue similar en linajes hematopoyéticos de corta duración (células CD33⁺ o CD34⁺) independientemente de la proporción de células madre/progenitoras de 1:5 o 1:10 (gráficos inferiores). Estos datos respaldan la noción de que un tiempo de cultivo corto es fundamental para obtener HSC modificadas genéticamente altamente funcionales.

Figura 8

Adaptación de la persistencia de células modificadas por genes durante la terapia génica.

(A) La expresión transgénica estable a largo plazo se logra administrando células CD34⁺CD38⁻ transducidas con células progenitoras CD34⁺CD38^{int/+} no transducidas. Dicho enfoque puede ser adecuado para tratar trastornos genéticos hereditarios.

(B) La expresión transgénica transitoria a corto plazo se logra mediante la administración de células progenitoras CD34⁺CD38^{int/+} transducidas con células CD34⁺CD38⁻ no transducidas.

(C) La expresión transitoria a medio plazo se logra administrando células CD34⁺CD38^{int/baja} transducidas con células CD34⁺CD38⁻ no transducidas.

Los enfoques mostrados en (B) y (C) pueden ser adecuados para dirigirse a los tumores.

Estas cifras muestran datos de 2 experimentos independientes (donante 1: n = 21 ratones; donante 2: n = 12 ratones).

Figura 9

Impacto del tiempo de cultivo *ex vivo* en el injerto de fracciones de HSPC (B y C: HSPC CD34⁺ total; D: HSPC CD34⁺CD38⁻; E: células progenitoras CD34⁺CD38^{int/+})

(A) Esquema de las condiciones de cultivo *ex vivo* probadas. Todos los experimentos se realizaron en células madre de sangre periférica movilizada con G-CSF (SPm) recogidas por leucaféresis. Las células se descongelaron y se sembraron en cultivo (10⁶ células/ml) en medio sin suero complementado con SCF a 300 ng/ml, FLT3L a 300 ng/ml, TPO a 100 ng/ml, IL-3 a 60 ng/ml durante 24 h (convencional) o 16 h (corto), como se indica en el esquema mediante los recuadros grises. La transducción se realizó con vectores lentivíricos de tercera generación a 10⁸ UT/ml durante 20 h (convencional) u 8 h (protocolo corto) como se indica mediante los recuadros rojos (recuadros más oscuros). Se inyectó un número equivalente de células (de acuerdo con el número de entrada al comienzo del cultivo *ex vivo*) en ratones NSG irradiados subletalmente de 8 semanas de edad, y el injerto se controló durante un tiempo adicional. Las estadísticas se realizaron por ANOVA bidireccional con la prueba posterior de Bonferroni.

(B) (Izquierda) Injerto humano CD45⁺ en sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) de ratones NSG en el

punto de tiempo indicado después del xenotrasplante con células de SPm CD34⁺ transducidas con SP146/gp91.cogp91^{phox}.126TLV manipuladas de acuerdo con el protocolo convencional o el protocolo corto (n = 5 ratones por grupo cada uno inyectado con el crecimiento de 5 x10⁵ células SPm CD34⁺). (Derecha) Se normalizaron los niveles de injerto con el número real de células CD34⁺ que se inyectaron en cada ratón. Este número fue menor para el protocolo de cultivo corto, ya que las células tuvieron menos tiempo para proliferar *in vitro*.

(C) Un experimento replicado similar al descrito en (B) confirmó que las células CD34⁺ cultivadas durante un período más corto (24 h frente a 44 h) tuvieron un potencial de repoblación significativamente mayor.

(D) Injerto humano CD45⁺ GFP⁺ en sangre periférica (SP) y médula ósea aspirada (MOasp) de ratones NSG en los puntos de tiempo indicados después del xenotrasplante con células progenitoras tempranas y células madre de SPm CD34⁺CD38⁻ transducidas con el VL PGK.GFP manipuladas de acuerdo con el protocolo corto (n = 6 ratones, 4,7 x 10⁴ células por ratón) o el protocolo convencional (n = 6 ratones, 4,7 x 10⁴ células por ratón). El nivel de CD38⁻ se definió como el 7 % de las células CD34⁺ clasificadas de acuerdo con el nivel de tinción de CD38 cuando se incubaron con un anticuerpo anti-CD38 (IB6-PE-Vio770, Miltenyi) y comenzando desde las células de expresión de CD38 más baja (intervalo del 0-7 %, siendo el 0 la más baja y el 100 % la expresión más alta).

(E) Injerto de CD45⁺ humanas en sangre periférica (SP) y médula ósea aspirada (MOasp) de ratones NSG en el punto de tiempo indicado después del xenotrasplante con células progenitoras de SPm CD34⁺CD38^{int/+} transducidas con el VL PGK.GFP, manipuladas de acuerdo con el protocolo convencional (n = 4 ratones) o el protocolo corto (n = 5 ratones). Además, n = 5 ratones fueron xenotrasplantados con células progenitoras CD34⁺CD38^{int/+} recién descongeladas (no cultivadas). Los ratones recibieron la inyección del equivalente de 5 x 10⁵ células de SPm CD34⁺CD38^{int/+}. El nivel de CD38^{int/+} se definió como el 87 % de las células CD34⁺ clasificadas de acuerdo con el nivel de tinción de CD38 cuando se incubaron con un anticuerpo anti-CD38 (IB6-PE-Vio770, Miltenyi) y comenzando por las células de expresión de CD38 más alta (intervalo del 13-100 %, siendo el 0 la más baja y el 100 % la expresión más alta).

Figura 10

Esquema de los posibles protocolos de transducción que se usarán para aplicaciones clínicas de terapia génica. Los protocolos A, B, C y D son los protocolos preferidos.

Descripción detallada de la invención

Ahora se describirán diversas características y realizaciones preferidas de la presente invención a modo de ejemplos no limitantes.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto habitual en la materia. Dichas técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos) "Current Protocols in Molecular Biology", Capítulos 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, NY; B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn (1996) "DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques", John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee (1990) "In Situ Hybridization: Principles and Practice"; Oxford University Press; M. J. Gait (ed.) (1984) "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach", IRL Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg (1992) "Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology", Academic Press.

En el presente documento se desvela un método para preparar una población de células terapéuticas para su uso clínico en el que dichas células expresan CD34, pero no expresan sustancialmente CD38. Las células se preparan a partir de una población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas. El método comprende separar una población de células que no expresan sustancialmente CD38, pero que expresan CD34 de la población inicial de células, y transducir la población de células separada con un vector, preferentemente, un vector vírico, para obtenerse la población de células terapéuticas. Preferentemente, el vector comprende un nucleótido de interés.

Una población de células terapéuticas debe entenderse como una población de células que da lugar a un efecto terapéutico cuando se administra a un sujeto. El efecto terapéutico puede ser mejorar o curar sustancialmente una enfermedad o un trastorno en un sujeto, o reducir o prevenir sustancialmente la futura presentación de una enfermedad o de un trastorno. Por ejemplo, puede ser posible identificar un trastorno genético heredado a través de la secuenciación del genoma, y prevenir el trastorno que se presenta a través de la administración de la población de células terapéuticas. La población de células terapéuticas puede comprender un gen que sea útil en terapia génica.

Por "uso clínico" se debe entender que la población de células terapéuticas se prepara en una forma que puede administrarse a un sujeto animal, preferentemente, un sujeto humano.

Células madre hematopoyéticas

Una célula madre puede diferenciarse en muchos tipos de células. Una célula que puede diferenciarse en todos los tipos de células se conoce como totipotente. En los mamíferos, solo el cigoto y las primeras células embrionarias son totipotentes. Las células madre se encuentran en la mayoría, si no todos, los organismos multicelulares. Se caracterizan por la capacidad para renovarse a través de la división celular mitótica y diferenciarse en una amplia gama de tipos de células especializadas. Los dos tipos generales de células madre de mamíferos son las células madre embrionarias que se aíslan de la masa celular interna de los blastocistos y las células madre adultas que se encuentran en los tejidos adultos. En un embrión en desarrollo, las células madre pueden diferenciarse en todos los tejidos embrionarios especializados. En organismos adultos, las células madre y las células progenitoras actúan como un sistema de reparación para el cuerpo, reponiendo células especializadas, pero también manteniendo el recambio normal de los órganos regenerativos, tales como la sangre, la piel o los tejidos intestinales.

Las células madre hematopoyéticas (HSC) son células madre multipotentes que se pueden encontrar, por ejemplo, en la sangre periférica, la médula ósea y la sangre del cordón umbilical. Las HSC son capaces de autorrenovarse y diferenciarse en cualquier linaje de células sanguíneas. Son capaces de volver a colonizar todo el sistema inmunitario, y los linajes eritroides y mieloides de todos los tejidos hematopoyéticos (tales como la médula ósea, el bazo y el timo). Proporcionan la producción a lo largo de toda la vida de todos los linajes de células hematopoyéticas.

Las células progenitoras hematopoyéticas tienen la capacidad de diferenciarse en un tipo específico de célula. Sin embargo, en contraste con las células madre, ya son mucho más específicas: son empujadas a diferenciarse en su célula "diana". Una diferencia entre las células madre y las células progenitoras es que las células madre pueden replicarse indefinidamente, mientras que las células progenitoras solo pueden dividirse un número limitado de veces. Las células progenitoras hematopoyéticas se pueden distinguir rigurosamente de las HSC solo mediante un ensayo funcional *in vivo* (es decir, trasplante y demostración de si pueden dar lugar a todos los linajes sanguíneos durante períodos de tiempo prolongados).

Una célula diferenciada es una célula que se ha vuelto más especializada en comparación con una célula madre o una célula progenitora. La diferenciación se produce durante el desarrollo de un organismo multicelular a medida que el organismo cambia de un único cigoto a un sistema complejo de tejidos y tipos de células. La diferenciación también es un proceso común en los adultos: las células madre adultas se dividen y crean células hijas completamente diferenciadas durante la reparación de los tejidos y el recambio celular normal. La diferenciación cambia drásticamente el tamaño, la forma, el potencial de membrana, la actividad metabólica y la capacidad de respuesta a las señales de una célula. Estos cambios se deben en gran medida a modificaciones altamente controladas en la expresión génica. En otras palabras, una célula diferenciada es una célula que tiene estructuras específicas y realiza ciertas funciones debido a un proceso de desarrollo que implica la activación y desactivación de genes específicos. En este caso, una célula diferenciada incluye células diferenciadas del linaje hematopoyético tales como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK. Por ejemplo, las células diferenciadas del linaje hematopoyético se pueden distinguir de las células madre y las células progenitoras mediante la detección de moléculas de la superficie celular que no se expresan o se expresan en menor grado en las células no diferenciadas. Los ejemplos de marcadores de linaje humanos adecuados incluyen CD33, CD13, CD14, CD15 (mieloide), CD19, CD20, CD22, CD79a (B), CD36, CD71, CD235a (eritroide), CD2, CD3, CD4, CD8 (T), CD56 (NK).

45 *Fuente de HSC*

En una realización de la presente invención, la población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas se obtiene de una muestra de tejido.

50 Por ejemplo, las HSC se pueden obtener de sangre periférica adulta y fetal, sangre de cordón umbilical, médula ósea, hígado o bazo. Preferentemente, estas células se obtienen de la sangre periférica o de la médula ósea. Se pueden obtener tras la movilización de las células *in vivo* por medio del tratamiento con factor de crecimiento.

La movilización puede llevarse a cabo usando, por ejemplo, G-CSF, plerixafor o combinaciones de los mismos. Otros agentes, tales como los AINE, ligandos de CXCR2 (Grobeta) e inhibidores de la dipeptidil peptidasa también pueden ser útiles como agentes movilizadores.

60 Con la disponibilidad de los factores de crecimiento de células madre GM-CSF y G-CSF, La mayoría de los procedimientos de trasplante de células madre hematopoyéticas se realiza ahora usando células madre recogidas de la sangre periférica, en lugar de la médula ósea. La recogida de células madre de sangre periférica proporciona un injerto más grande, no requiere que el donante sea sometido a anestesia general para recoger el injerto, produce un tiempo más corto para el injerto y puede proporcionar una tasa de recaída a largo plazo más baja.

65 La médula ósea se puede recoger mediante métodos de aspiración convencionales (ya sea en estado estacionario o tras la movilización), o mediante el uso de herramientas de recogida de próxima generación (por ejemplo, tuétano de la médula).

Además, las HSC también pueden derivarse de células madre pluripotentes inducidas.

Características de las HSC

5 Las HSC normalmente son de bajo perfil de dispersión hacia adelante y de dispersión lateral según procedimientos de citometría de flujo. Algunas son metabólicamente inactivas, como lo demuestra el marcaje con rodamina, que permite la determinación de la actividad mitocondrial. Las HSC pueden comprender ciertos marcadores de superficie celular tales como CD34, CD45, CD133, CD90 y CD49f. También se pueden definir como células que carecen de la
10 expresión de los marcadores de superficie celular CD38 y CD45RA. Sin embargo, la expresión de algunos de estos marcadores depende de la etapa de desarrollo y del contexto específico del tejido de las HSC. Algunas HSC denominadas "células de población lateral" excluyen el colorante Hoechst 33342 según lo detectado mediante citometría de flujo. Así pues, las HSC tienen características descriptivas que permiten su identificación y aislamiento.

15 *Marcadores negativos*

CD38 es el único marcador negativo más establecido y útil para las HSC humanas.

20 Las HSC humanas también pueden ser negativas para los marcadores de linajes tales como CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD24, CD36, CD56, CD66b, CD271 y CD45RA. Sin embargo, Es posible que estos marcadores deban usarse en combinación para el enriquecimiento en HSC.

Por marcador negativo se debe entender que las HSC humanas carecen de la expresión de estos marcadores.

25 *Marcadores positivos*

CD34 y CD133 son los marcadores positivos más útiles para las HSC.

30 Algunas HSC también son positivas para los marcadores de linajes tales como CD90, CD49f y CD93. Sin embargo, Es posible que estos marcadores deban usarse en combinación para el enriquecimiento en HSC.

Por marcador positivo se debe entender que las HSC humanas expresan estos marcadores.

35 Por consiguiente, la población terapéutica de las células puede ser CD34+CD38-. Se pueden llevar a cabo más separaciones para obtener, por ejemplo, células CD34+CD38-CD45RA- CD90+CD49f+.

Separación de células

40 La separación de una población de células se refiere a la purificación de una población de células que presentan un fenotipo o característica específica de otras células que no presentan ese fenotipo o característica, o que lo presentan en menor medida. Por ejemplo, una población de células que no expresa un marcador específico (tal como CD38) puede separarse de una población inicial de células. Como alternativa, o además, puede separarse una población de células que expresen otro marcador (tal como CD34).

45 En una realización de la presente invención, el método comprende las etapas de:

a. separar células que expresan CD38 de una población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas;

50 b. separar las células que expresan CD34 de la población de células que no expresan CD38 obtenida en la etapa (a);

c. transducir la población de células que expresan CD34 obtenida en la etapa (b) con un vector para obtener la población de células terapéuticas.

55 La separación de una población de células que expresan un marcador específico (por ejemplo, CD38 o CD34) se puede lograr usando un agente que se una a ese marcador.

En otra realización de la divulgación, el método comprende las etapas de:

60 a. poner en contacto una población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas con un agente reactivo a CD38;

b. separar las células reactivas a CD38 de las células no reactivas a CD38;

65 c. poner en contacto las células CD38 no reactivas obtenidas en la etapa (b) con un agente reactivo a CD34;

d. separar las células reactivas a CD34 de las células no reactivas a CD34, en el que las células reactivas a CD34 forman la población de células de transducción;

5 e. transducir la población de células de transducción con un vector para obtener la población de células terapéuticas.

Un agente reactivo hacia un marcador específico, tal como CD38 o CD34, debe entenderse como un agente que se une de manera esencialmente específica a ese marcador.

10 En una realización de la presente invención, los agentes reactivos a CD38 o CD34 son anticuerpos anti-CD38 o anti-CD34, respectivamente.

15 Anticuerpos, como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse a una diana seleccionada, incluyendo Fv, ScFv, F(ab') y F(ab')₂, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos diseñados por ingeniería genética incluyendo anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados y humanizados con CDR, y anticuerpos seleccionados artificialmente producidos usando técnicas de presentación en fagos o técnicas alternativas.

20 Además, también se pueden usar alternativas a los anticuerpos clásicos en la invención, por ejemplo "avicuerpos", "avímeros", "anticalinas", "nanocuerpos" y "DARPin".

Por consiguiente, por células reactivas a CD38, por ejemplo, se entenderá aquellas células que expresan el marcador CD38 y, por lo tanto, se unen a un agente reactivo a CD38. Por el contrario, las células no reactivas a CD38 no se unen sustancialmente a un agente reactivo a CD38. Por analogía, se puede aplicar el mismo significado a las células reactivas y no reactivas a CD34.

Los agentes reactivos a marcadores específicos pueden marcarse para que puedan identificarse usando cualquiera de una serie de técnicas conocidas en la técnica. El agente reactivo puede estar marcado inherentemente, o puede modificarse conjugando un marcador al mismo. Mediante la conjugación, debe entenderse que el agente reactivo y el marcador se unen operativamente. Esto significa que el agente reactivo y el marcador están unidos entre sí de una manera que permite que ambos lleven a cabo su función (por ejemplo, unirse a un marcador, permitir la identificación fluorescente o permitir la separación cuando se coloca en un campo magnético) esencialmente sin obstáculos. Los métodos adecuados de conjugación son bien conocidos en la técnica y serían fácilmente identificables por el experto.

35 Un marcador puede permitir, por ejemplo, al agente marcado y a cualquier célula a la que esté unido purificarse de su entorno (por ejemplo, el agente reactivo puede estar marcado con una perla magnética o un marcador de afinidad, tal como avidina), detectado o ambos. Los marcadores detectables adecuados para su uso como marcador incluyen fluoróforos (por ejemplo, proteínas fluorescentes verde, cereza, azul cian y naranja) y marcadores peptídicos (por ejemplo, un marcador His, marcador Myc, Marcador FLAG y marcador HA).

En una realización de la presente invención, los anticuerpos anti-CD38 y/o anti-CD34 se conjugan con perlas magnéticas.

45 En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 y/o anti-CD34 se conjugan con marcadores detectables.

En otra realización, los marcadores detectables son fluoróforos.

50 En la técnica, se conoce una serie de técnicas para separar una población de células que expresan un marcador específico. Estas incluyen tecnologías de separación basadas en perlas magnéticas (por ejemplo, separación basada en perlas magnéticas de circuito cerrado), citometría de flujo, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), purificación de marcadores de afinidad (por ejemplo, usando columnas o perlas de afinidad, tales como columnas de biotina para separar los agentes marcados con avidina) y las técnicas basadas en microscopía.

55 En una realización, las células que expresan CD38 y/o las células que expresan CD34 se separan usando separación basada en perlas magnéticas o citometría de flujo.

En otra realización, las células reactivas a CD38 y/o las células reactivas a CD34 se separan usando separación basada en perlas magnéticas o citometría de flujo.

60 También puede ser posible realizar la separación usando una combinación de diferentes técnicas, tal como un etapa de separación basada en perlas magnéticas seguida de la clasificación de la población de células resultante para uno o más marcadores adicionales (positivos o negativos) mediante citometría de flujo.

65 Se puede realizar una separación de grado clínico, por ejemplo, usando el sistema CliniMACS® (Miltenyi). Este es un ejemplo de una tecnología de separación basada en perlas magnéticas de circuito cerrado.

También se prevé que las propiedades de exclusión del colorante (por ejemplo, población lateral o marcaje con rodamina) o la actividad enzimática (por ejemplo, actividad ALDH) pueden usarse para enriquecer en HSC.

5 Cuando se usa la tecnología actual de separación basada en perlas magnéticas, se prefiere que la etapa de separación negativa (es decir, el agotamiento de las células que expresan CD38) preceda a la etapa de separación positiva (es decir, el enriquecimiento de las células que expresan CD34). Sin embargo, se prevé que es posible llevar a cabo etapas de separación tanto negativa como positiva simultáneamente con técnicas alternativas, por ejemplo, técnicas avanzadas de citometría de flujo (por ejemplo, FACS de circuito cerrado).

10 Sin embargo, también es posible llevar a cabo la etapa de separación positiva (es decir, el enriquecimiento de las células que expresan CD34) antes de la etapa de separación negativa (es decir, el agotamiento de las células que expresan CD38).

15 Las poblaciones de células de la invención pueden separarse en fracciones de acuerdo con los niveles de expresión de CD38. Los niveles de expresión de CD38 pueden cuantificarse usando técnicas adecuadas conocidas en la técnica, por ejemplo, técnicas de citometría de flujo (véase, por ejemplo, Figura 4). Por ejemplo, el nivel de expresión de CD38 puede medirse mediante la tinción de anticuerpos con el clon IB6 o reactivos similares/equivalentes.

20 La cantidad de expresión de CD38 por una célula puede estar representada por un porcentaje de nivel de expresión, siendo el 0 % la más baja y 100 % la expresión más alta.

Una población de células puede clasificarse o separarse en subpoblaciones (por ejemplo, subpoblaciones derivadas de una población CD34+) en función del nivel de expresión de CD38.

25 La población de células puede clasificarse o separarse en subpoblaciones CD38⁻, CD38^{int1} CD38^{int2} o CD38⁺ que tienen niveles crecientes de expresión de CD38 en ese orden (por ejemplo, toda la población CD34+ se clasifica de acuerdo con la expresión/intensidad de tinción de CD38). Por ejemplo (al seleccionar previamente el análisis en células CD34+), una población de células con un fenotipo CD38⁻ puede estar contenida dentro del 10 % más bajo de células, basándose en el nivel de expresión de CD38; una población de células con un fenotipo CD38^{int1} (también denominado CD38^{int/baja}) puede estar contenida dentro del siguiente 30 % más alto de células a las células CD38⁻; una población de células con un fenotipo CD38^{int2} (también denominado CD38^{+/int}) puede estar contenida dentro del 30 % más alto de células a las células CD38^{int1}; y una población de células con un fenotipo CD38⁺ (también denominado CD38^{alta}) puede estar contenida dentro del siguiente 30 % más alto de células a las células CD38^{int2}.

35 Así pues, una población de células con un fenotipo CD38⁻ puede estar, por ejemplo, contenida dentro del intervalo de aproximadamente 0-12 % de expresión de CD38, por ejemplo, el intervalo de aproximadamente 0-10 %.

40 Una población de células con un fenotipo CD38^{int1} (también conocido como CD38^{int/baja}) puede estar, por ejemplo, contenida dentro del intervalo de aproximadamente 10-40 % de expresión de CD38, por ejemplo, el intervalo de aproximadamente 12-40 % o aproximadamente 13-40 %.

45 Una población de células con un fenotipo CD38^{int2} (también conocido como CD38^{+/int}) puede estar, por ejemplo, contenida dentro del intervalo de aproximadamente 40-70 % de expresión de CD38, por ejemplo, el intervalo de aproximadamente 41-70 %.

50 Una población de células con un fenotipo CD38⁺ (también denominado CD38^{alta}) puede estar, por ejemplo, contenida dentro del intervalo de aproximadamente 70-100 % de expresión de CD38, por ejemplo, el intervalo de aproximadamente 71-100 %.

55 El experto en la materia podría seleccionar fácilmente una población de células en función del nivel de expresión de CD38 dependiendo del uso previsto, basándose en la divulgación del presente documento. De hecho, el experto en la materia apreciaría fácilmente que los niveles desvelados de expresión de CD38 pueden ajustarse ligeramente dependiendo del uso deseado.

60 En una realización preferida, la población CD38⁻ (fracción que contiene células madre) se define como aquella que tiene el intervalo de 0-10 % de expresión de CD38; la población de CD38^{int1} (fracción que contiene progenitores multipotentes con capacidad de repoblación a corto y medio plazo) se define como aquella que tiene el intervalo de 10-40 % de expresión de CD38; la población CD38^{int2} (fracción que contiene progenitores con capacidad de repoblación a corto plazo) se define como aquella que tiene el intervalo de 40-70 % de expresión de CD38; y la población CD38⁺ (células precursoras esencialmente desprovistas de una capacidad de repoblación significativa) se define como aquella que tiene el intervalo de 70-100 % de expresión de CD38.

65 Estas fracciones de células también se pueden combinar cuando sea necesario. Por ejemplo, las fracciones CD38^{int1} y CD38^{int2} pueden combinarse para formar una fracción CD38^{int} (contenida dentro del intervalo de aproximadamente 10-70 % de expresión de CD38); y los grupos CD38^{int1} CD38^{int2} y CD38⁺ pueden combinarse para formar una fracción

CD38^{baja-int-alta} (también conocida como CD38^{int/+}) (contenida dentro del intervalo de aproximadamente 10-100 % de expresión de CD38, por ejemplo, el intervalo de aproximadamente 12-100 % o aproximadamente 13-100 %).

Vectores

5 Un vector es una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad de un entorno a otro. De acuerdo con la presente invención, y a modo de ejemplo, algunos vectores usados en técnicas de ácidos nucleicos recombinantes permiten la transferencia de entidades, tales como un segmento de ácido nucleico (por ejemplo, un segmento de ADN heterólogo, tal como un segmento de ADNc heterólogo), a una célula diana. El vector puede servir para mantener el ácido nucleico heterólogo (ADN o ARN) dentro de la célula, facilitando la replicación del vector que comprende un segmento de ácido nucleico, o facilitando la expresión de la proteína codificada por un segmento de ácido nucleico. Los vectores pueden ser no víricos o víricos. Los ejemplos de vectores usados en técnicas de ácidos nucleicos recombinantes incluyen, pero sin limitación, plásmidos, cromosomas, cromosomas artificiales y virus. El vector también puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico desnudo (por ejemplo, ADN). En su forma más simple, el vector en sí mismo puede ser un nucleótido de interés.

Los vectores usados en la invención pueden ser, por ejemplo, vectores de plásmidos o de virus, y pueden incluir un promotor para la expresión de un polinucleótido y, opcionalmente, un regulador del promotor.

20 Los vectores que comprenden polinucleótidos usados en la invención pueden introducirse en células usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como transformación y transducción. Se conocen varias técnicas en la técnica, por ejemplo, infección con vectores víricos recombinantes, tales como vectores retrovíricos, lentivíricos, adenovíricos, víricos adenoasociados, baculovíricos y del virus del herpes simple; inyección directa de ácidos nucleicos y transformación biolística.

25 Los sistemas de administración no víricos incluyen, pero sin limitación, métodos de transfección de ADN. En este caso, la transfección incluye un proceso que usa un vector no vírico para administrar un gen a una célula diana.

30 Los métodos de transfección típicos incluyen electroporación, biolística de ADN, transfección mediada por lípidos, transfección mediada por ADN compactado, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, transfección mediada por agentes catiónicos, anfífilos faciales catiónicos (CFA) (*Nature Biotechnology* 1996 14; 556) y sus combinaciones.

Además, la invención puede emplear protocolos de dirección génica, por ejemplo, la administración de agentes modificadores del ADN.

35 Vectores víricos

En una realización, se usa un vector vírico en la presente invención.

40 En otra realización, el vector vírico es un vector retrovírico, vector adenovírico o vírico adenoasociado.

En otra realización, el vector retrovírico es un vector lentivírico.

Vectores retrovíricos y lentivíricos

45 El vector retrovírico usado en la presente invención puede derivarse o ser derivable de cualquier retrovirus adecuado. Se ha identificado una gran cantidad de retrovirus diferentes. Los ejemplos incluyen: virus de la leucemia murina (MLV), virus de la leucemia de linfocitos T humana (HTLV), virus de tumor mamario de ratón (MMTV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus del sarcoma de Fujinami (FuSV), virus de la leucemia murina de Moloney (Mo MLV), virus del osteosarcoma murino FBR (FBR MSV), virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MSV), virus de la leucemia murina de Abelson (A-MLV), virus de la mielocitosis aviar 29 (MC29) y virus de la eritroblastosis aviar (AEV). Se puede encontrar una lista detallada de retrovirus en Coffin *et al.* (1997) "Retroviruses", Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: J. M. Coffin, S. M. Hughes, H. E. Varmus, pág. 758-763.

55 Los retrovirus pueden dividirse ampliamente en dos categorías, en concreto, "simples" y "complejos". Los retrovirus pueden incluso dividirse aún más en siete grupos. Cinco de estos grupos representan retrovirus con potencial oncogénico. Los dos grupos restantes son los lentivirus y los espumavirus. En Coffin *et al.* (1997) *ibid.*, se presenta una revisión de estos retrovirus.

60 La estructura básica de los genomas de los retrovirus y los lentivirus comparten muchas características comunes, tales como una LTR de 5' y una LTR de 3', entre o dentro de las cuales se encuentra una señal de empaquetamiento para permitir que el genoma se empaquete, un sitio de unión al cebador, sitios de integración para permitir la integración en un genoma de la célula hospedadora, y los genes *gag*, *pol* y *env* que codifican los componentes de empaquetamiento - se trata de polipéptidos necesarios para el ensamblaje de las partículas víricas. Los lentivirus tienen características adicionales, tales como las secuencias *rev* y *RRE* en VIH, que permiten la exportación eficaz de las transcripciones de ARN del provirus integrado desde el núcleo al citoplasma de una célula diana infectada.

En el provirus, estos genes están flanqueados en ambos extremos por regiones denominadas repeticiones terminales largas (LTR). Las LTR son responsables de la integración y transcripción províricas. Las LTR también sirven como secuencias potenciadoras-promotoras y pueden controlar la expresión de los genes víricos.

5 Las LTR son secuencias idénticas que se pueden dividir en tres elementos, que se denominan U3, R y U5. U3 se deriva de la secuencia exclusiva del extremo 3' del ARN. R se deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN y U5 se deriva de la secuencia única para el extremo 5' del ARN. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre los diferentes retrovirus.

10 En un genoma del vector retrovítico defectuoso, *gag*, *pol* y *env* pueden estar ausentes o no ser funcionales. Las regiones R en ambos extremos del ARN son secuencias repetidas. U5 y U3 representan secuencias únicas en los extremos 5' y 3' del genoma de ARN respectivamente.

15 En un vector retrovítico típico usado en la presente invención, se puede eliminar del virus al menos parte de una o más regiones codificantes de proteínas esenciales para la replicación. Esto hace que la replicación del vector vírico sea defectuosa. También se pueden reemplazar partes del genoma vírico por un banco codificante de fracciones moduladoras candidatas unidas operativamente a una región de control reguladora y una fracción indicadora del genoma del vector para generar un vector que comprenda fracciones moduladoras candidatas que sea capaz de transducir una célula hospedadora sin división diana y/o que integre su genoma en un genoma hospedador.

20 Los vectores de lentivirus son parte de un grupo más grande de vectores retrovíricos. Se puede encontrar una lista detallada de lentivirus en Coffin *et al* (1997) "Retroviruses" Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: J. M. Coffin, S. M. Hughes, H. E. Varmus, pág. 758-763. En resumen, los lentivirus se pueden dividir en grupos de primates y no primates. Los ejemplos de lentivirus de primates incluyen, sin limitación: el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de autoinmunodeficiencia humana (SIDA) y el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV). El grupo lentivírico no primate incluye el prototipo de "virus lento", el virus visna/maedi (VMV), así como el virus relacionado con la artritis y la encefalitis caprina (CAEV), el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), y el virus de inmunodeficiencia felina (FIV) y el virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) descritos más recientemente.

30 La familia de lentivirus difiere de los retrovirus en que los lentivirus tienen la capacidad de infectar tanto a las células en división como a las que no se dividen (Lewis *et al* (1992) *EMBO J* 11(8):3053-3058, y Lewis y Emerman (1994) *J Virol* 68 (1):510-516). Por el contrario, otros retrovirus, tales como MLV, no pueden infectar células que no se dividen o que se dividen lentamente, tales como las que forman, por ejemplo, músculo, cerebro, tejido pulmonar y hepático.

35 Un vector lentivírico, como se usa en el presente documento, es un vector que comprende al menos una parte componente derivable de un lentivirus. Preferentemente, esa parte componente participa en los mecanismos biológicos mediante los que el vector infecta las células, expresa genes o se replica.

40 El vector lentivírico puede ser un vector "no primate", es decir, derivado de un virus que no infecta principalmente a primates, en especial, a seres humanos.

45 Los ejemplos de lentivirus no primates pueden ser cualquier miembro de la familia de los lentivirus que no infecta de manera natural a un primate, y pueden incluir un virus de inmunodeficiencia felina (FIV), un virus de inmunodeficiencia bovina (BIV), un virus de encefalitis por artritis caprina (CAEV), un virus Maedi visna (MVV) o un virus de anemia infecciosa equina (EIAV).

50 El vector vírico puede derivarse de EIAV. EIAV tiene la estructura genómica más sencilla de los lentivirus. Además de los genes *gag*, *pol* y *env*, EIAV codifica otros tres genes: *tat*, *Rev* y *S2*. *Tat* actúa como un activador de la transcripción de la LTR vírica (Derse y Newbold (1993) *Virology* 194 (2): 530-536 y Maury *et al.*, (1994) *Virology* 200 (2): 632-642), y *rev* regula y coordina la expresión de los genes víricos a través de elementos de respuesta a *rev* (RRE) (Martarano *et al.*, (1994) *J Virol* 68(5):3102-3111). Se cree que los mecanismos de acción de estas dos proteínas son muy similares a los mecanismos análogos en los virus de los primates (Martarano *et al.*, (1994) *J Virol* 68(5):3102-3111). La función de *S2* es desconocida. Además, se ha identificado una proteína EIAV, Ttm, que está codificada por el primer exón de *tat* cortado y empalmado a la secuencia de codificación de *env* al comienzo de la proteína transmembrana.

55 Preferentemente, el vector vírico usado en la presente invención tiene un genoma vírico mínimo.

60 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "genoma vírico mínimo" significa que el vector vírico ha sido manipulado para eliminar los elementos no esenciales y conservar los elementos esenciales a fin de proporcionar la funcionalidad necesaria para infectar, transducir y administrar una secuencia de nucleótidos de interés a una célula hospedadora diana. Se pueden encontrar más detalles de esta estrategia en el documento WO 1998/017815.

65 Sin embargo, el vector plasmídico usado para producir el genoma vírico dentro de una célula hospedadora/célula empaquetadora incluirá secuencias de control reguladoras de la transcripción unidas operativamente al genoma retrovítico para dirigir la transcripción del genoma en una célula hospedadora/célula empaquetadora. Estas secuencias

reguladoras pueden ser las secuencias naturales asociadas con la secuencia retrovítica transcrita, es decir, la región U3 5', o pueden ser un promotor heterólogo tal como otro promotor vírico, por ejemplo, el promotor CMV. Algunos genomas lentivíricos requieren secuencias adicionales para la producción eficaz de virus. Por ejemplo, en particular, en el caso del VIH, se pueden incluir las secuencias de *rev* y RRE. Sin embargo, se puede reducir o eliminar la necesidad de *rev* y RRE mediante la optimización de codones. Se pueden encontrar más detalles de esta estrategia en el documento WO 2001/079518. También se conocen secuencias alternativas que realizan la misma función que el sistema *rev*/RRE. Por ejemplo, Un análogo funcional del sistema *rev*/RRE se encuentra en el virus del mono Mason Pfizer. Este se conoce como el elemento de transporte constitutivo (CTE) y comprende una secuencia de tipo RRE en el genoma que se cree que interactúa con un factor en la célula infectada. El factor celular puede considerarse como un análogo de *rev*. Así pues, CTE puede usarse como una alternativa al sistema *rev*/RRE. Cualquier otro equivalente funcional que se conozca o esté disponible puede ser relevante para la invención. Por ejemplo, también se sabe que la proteína Rex del HTLV-I puede reemplazar funcionalmente a la proteína Rev del VIH-1. *Rev* y RRE pueden estar ausentes o no ser funcionales en el vector de uso en los métodos de la presente invención; en la alternativa, *rev* y RRE pueden estar presentes.

Los vectores de uso en los métodos de la presente invención pueden usar un vector autoinactivador (SIN) en el que se hayan eliminado las secuencias potenciadoras y promotoras víricas. Los vectores SIN pueden generarse y transducir células que no están en división *in vivo* con una eficacia similar a la de los vectores de tipo silvestre. La inactivación de la transcripción de la repetición terminal larga (LTR) en el provirus SIN debería evitar la movilización por los virus con replicación competente. Esto también debería permitir la expresión regulada de genes de promotores internos mediante la eliminación de cualquier efecto de la LTR que actúe en *cis*.

A modo de ejemplo, se han construido sistemas de vectores retrovíticos autoinactivadores eliminando los potenciadores de la transcripción o los potenciadores y promotores en la región U3 de la LTR 3'. Tras una serie de transcripción inversa e integración de vectores, estos cambios se copian en las LTR 5' y 3' que producen un provirus transcripcionalmente inactivo. Sin embargo, Cualquier promotor interno a las LTR en dichos vectores seguirá siendo transcripcionalmente activo. Esta estrategia se ha empleado para eliminar los efectos de los potenciadores y promotores en las LTR víricas en la transcripción de genes colocados internamente. Dichos efectos incluyen una mayor transcripción o una supresión de la transcripción. Esta estrategia también se puede usar para eliminar la transcripción cadena abajo de la LTR 3' en el ADN genómico. Esto es particularmente preocupante en la terapia génica humana, en la que puede ser importante prevenir la activación accidental de un oncogén endógeno. Yu *et al.*, (1986) *PNAS* 83: 3194-98; Marty *et al.*, (1990) *Biochimie* 72: 885-7; Naviaux *et al.*, (1996) *J. Virol.* 70: 5701-5; Iwakuma *et al.*, (1999) *Virol.* 261: 120-32; Deglon *et al.*, (2000) *Human Gene Therapy* 11: 179-90.

35 *Vectores lentivíricos no replicantes*

En un genoma del vector lentivírico defectuoso en la replicación, *gag*, *pol* y *env* pueden estar ausentes o no ser funcionales.

En un vector lentivírico típico usado en la presente invención, se puede eliminar del virus al menos parte de una o más regiones codificantes de proteínas esenciales para la replicación. Esto hace que la replicación del vector vírico sea defectuosa. También se pueden reemplazar partes del genoma vírico por un nucleótido de interés (NOI) para generar un vector que comprenda un NOI que sea capaz de transducir una célula hospedadora diana que no se divide y/o integrar su genoma en un genoma hospedador.

En una realización, los vectores lentivíricos son vectores no integrantes como se describe en el documento WO 2007/071994.

El vector lentivírico puede ser un vector "no primate", es decir, derivado de un virus que no infecta principalmente a primates, en especial, a seres humanos.

Vectores adenovíricos

En otra realización de la presente invención, el vector puede ser un vector de adenovirus. El adenovirus es un virus de ADN lineal, bicatenario, que no pasa a través de un ARN intermedio. Hay más de 50 serotipos humanos diferentes de adenovirus divididos en 6 subgrupos basados en la homología de secuencia genética. Las dianas naturales del adenovirus son los epitelios respiratorios y gastrointestinales, en general, dando lugar a solo síntomas leves. Los serotipos 2 y 5 (con una homología de secuencia del 95 %) se usan con mayor frecuencia en los sistemas de vectores adenovíricos y, normalmente, se asocian con infecciones del tracto respiratorio superior en los jóvenes.

Los adenovirus son icosaedros regulares sin envoltura. Un adenovirus típico comprende un virus de ADN encapsidado de 140 nm. La simetría icosaédrica del virus está se compone de 152 capsómeros: 240 hexones y 12 pentones. El núcleo de la partícula contiene el ADN dúplex lineal de 36 kb que está asociado covalentemente en los extremos 5' con la proteína terminal (TP) que actúa como un cebador para la replicación del ADN. El ADN tiene repeticiones terminales invertidas (ITR) y la longitud de estas varía con el serotipo.

El adenovirus es capaz de realizar la transducción *in vivo* e *in vitro* de una amplia selección de tipos de células de origen humano y no humano. Estas células incluyen células epiteliales de las vías respiratorias, hepatocitos, células musculares, miocitos cardíacos, sinoviocitos, células epiteliales mamarias primarias y células diferenciadas post-mitóticamente tales como las neuronas.

5 Los vectores adenovíricos también son capaces de transducir células que no se dividen. Esto es muy importante para las enfermedades, tales como la fibrosis quística, en la que las células afectadas en el epitelio pulmonar tienen una tasa de renovación lenta. De hecho, se están realizando varios ensayos que utilizan la transferencia mediada por adenovirus del transportador de fibrosis quística (CFTR) en los pulmones de pacientes adultos afectados por la fibrosis quística.

10 Los adenovirus se han usado como vectores para la terapia génica y para la expresión de genes heterólogos. El genoma grande (36 kb) puede aceptar hasta 8 kb de ADN de inserción foráneo y puede replicarse eficazmente para complementar las estirpes celulares a fin de producir títulos muy altos de hasta 10¹². El adenovirus es, por lo tanto, uno de los mejores sistemas para estudiar la expresión de genes en células primarias no replicativas.

15 La expresión de genes víricos o foráneos del genoma de los adenovirus no requiere una célula replicante. Los vectores adenovíricos entran en las células mediante endocitosis mediada por receptores. Una vez dentro de la célula, los vectores de adenovirus rara vez se integran en el cromosoma del hospedador. En cambio, funcionan episomalmente (independientemente del genoma del hospedador) como un genoma lineal en el núcleo del hospedador. Por lo tanto, el uso de adenovirus recombinante alivia los problemas asociados con la integración aleatoria en el genoma del hospedador.

Vectores de virus adenoasociados

25 El virus adenoasociado (AAV) es un sistema vectorial atractivo para su uso en la presente invención, ya que tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar a células que no se dividen. Esto lo hace útil para la administración de genes en células de mamíferos de cultivo de tejidos. AAV tiene un amplio intervalo de hospedadores para la infectividad. Los detalles relativos a la generación y al uso de los vectores rAAV se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.139.941 y la patente de EE.UU. n.º 4.797.368.

30 Los vectores de AAV recombinantes se han usado con éxito para la transducción *in vitro* e *in vivo* de genes marcadores y genes implicados en enfermedades humanas.

Vectores del virus del herpes simple

35 El virus del herpes simple (HSV) es un virus de ADN bicatenario envuelto que infecta de manera natural a las neuronas. Puede alojar grandes secciones de ADN foráneo, lo que lo hace atractivo como sistema vectorial, y se ha empleado como vector para la administración de genes a las neuronas.

40 El uso de HSV en procedimientos terapéuticos requerirá que las cepas se atenúen para que no puedan establecer un ciclo lítico. En particular, si se van a usar vectores de HSV para terapia génica en seres humanos, el polinucleótido debería insertarse preferentemente en un gen esencial. Esto se debe a que si un virus de vector se encuentra con un virus de tipo silvestre, se podría producir la transferencia de un gen heterólogo al virus de tipo silvestre mediante recombinación. Sin embargo, siempre que el polinucleótido se inserte en un gen esencial, esta transferencia mediante recombinación también eliminaría el gen esencial en el virus receptor y evitaría el "escape" del gen heterólogo a la población de virus de tipo silvestre competente para la replicación.

Nucleótido de interés

50 El vector usado en la presente invención comprende preferentemente un nucleótido de interés.

Preferentemente, el nucleótido de interés da lugar a un efecto terapéutico.

55 Los NOI adecuados incluyen, pero sin limitación, secuencias que codifican enzimas, citocinas, quimiocinas, hormonas, anticuerpos, moléculas antioxidantes, moléculas de inmunoglobulina modificadas por ingeniería genética, anticuerpos monocatenarios, proteínas de fusión, moléculas coestimulantes inmunitarias, moléculas inmunomoduladoras, ARN antisentido, microARN, ARNhc, ARNip, ribozimas, secuencias diana de miARN, un mutante transdominio negativo de una proteína diana, toxinas, toxinas condicionales, antígenos, proteínas supresoras de tumores, factores de crecimiento, factores de transcripción, proteínas de membrana, receptores de superficie, moléculas anticancerígenas, proteínas y péptidos vasoactivos, proteínas antivíricas y ribozimas, y sus derivados (tales como los derivados con un grupo indicador asociado). Los NOI también pueden codificar enzimas activadoras de profármacos.

65 Un ejemplo de un NOI es la cadena de beta-globina que puede usarse para la terapia génica de la talasemia/enfermedad de células falciformes.

Los NOI también incluyen aquellos útiles para el tratamiento de otras enfermedades que requieren corrección génica no urgente/electiva en el linaje mieloide, tales como: enfermedad granulomatosa crónica (CGD, por ejemplo, el transgén gp91phox), defectos de adhesión de leucocitos, otros trastornos de fagocitos en pacientes sin infecciones graves continuas ni síndromes de insuficiencia de médula ósea heredados (por ejemplo, anemia de Fanconi), así como inmunodeficiencias primarias (SCID).

Población de células de soporte

El inesperado hallazgo de los presentes inventores de que las HSC altamente purificadas son significativamente más transducibles por vectores, en particular, por vectores lentivíricos, les impulsó a evaluar un diseño radicalmente nuevo del protocolo de terapia génica de HSC. El nuevo protocolo comprende la separación de una población de células inicial (por ejemplo, una obtenida de sangre periférica movilizada, médula ósea o sangre del cordón umbilical) en una fracción enriquecida con HSC (la población de células terapéuticas, por ejemplo, que tiene un contenido de HSC enriquecido con respecto a las células CD34+) y una fracción que contiene progenitores (una población de células de soporte). Esta última puede congelarse sin manipulación *ex vivo*, y puede infundirse en un sujeto para aumentar la recuperación hematológica tras el acondicionamiento mieloablativo. La fracción que contiene HSC, altamente purificada, se transducirá usando el cultivo *ex vivo* "mínimo" como se describe en el presente documento, reduciendo el tiempo de cultivo y la dosis del vector con respecto al protocolo convencional de transducción de células CD34+.

Las poblaciones de células terapéuticas y/o de soporte pueden congelarse tras su preparación para facilitar el almacenamiento antes de su posterior trasplante. Como la población de células de soporte se separa en una fase temprana del método para preparar la población de células terapéuticas, se prefiere que se congele lo antes posible tras la separación, preferentemente, inmediatamente después de la separación. Los métodos para congelar células a fin de mantener su viabilidad son bien conocidos en la técnica.

Las células congeladas pueden descongelarse cuando sea necesario para su uso, por ejemplo, para la administración a un sujeto.

Transducción celular

La transducción de una población de células con un vector puede usar una fase de estimulación previa antes de una segunda fase de cultivo durante la que las células se exponen al vector. Durante la fase de estimulación previa, las células pueden cultivarse en medio de cultivo que comprende, por ejemplo, factor de células madre (SCF), ligando FLT3 (FLT3L) y trombopoyetina (TPO), y opcionalmente, IL3, IL6, IL11, M-CSF, FGF-1, IGF-2, IGFBP2, ANGPTL3 o 5.

La población de células puede, por ejemplo, ser la población de células terapéuticas como se describe en el presente documento, una población de células CD34+CD38⁻, una población de células madre hematopoyéticas o una población de células progenitoras hematopoyéticas.

Preferentemente, el vector es un vector lentivírico.

Durante los métodos descritos en el presente documento, se puede implementar el protocolo convencional o corto descrito a continuación. Sin embargo, también se apreciará que, tanto el protocolo convencional como el corto pueden implementarse durante cualquier método de transducción de una población de células con un vector (por ejemplo, un vector lentivírico). Esto proporciona aspectos adicionales a la presente invención.

La transducción de una población de células con un vector se puede llevar a cabo usando un protocolo convencional en el que las células se someten a 44 horas o más de cultivo antes de la administración a un sujeto.

Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos en los que la etapa de transducción de una población de células con un vector comprende cultivar las células durante aproximadamente 44 h o más (protocolo "convencional"). La "etapa de transducir una población de células con un vector" debe entenderse como las fases de estimulación previa y de exposición al vector.

Por ejemplo, la población de células puede cultivarse durante aproximadamente 44-66 h, 44-60 h, 44-54 h o 44-48 h durante la etapa de transducción con un vector. En una realización, la población de células se cultiva durante aproximadamente 66, 60, 54, 48 o 44 h durante la etapa de transducción con un vector.

Los presentes inventores han encontrado, sin embargo, que el tiempo de cultivo influye negativamente en la capacidad funcional del injerto tanto de las células madre como de las células progenitoras hematopoyéticas. Por consiguiente, Los presentes inventores han desarrollado protocolos cortos de transducción que equilibran la mejora en el injerto con la correspondiente reducción de la eficacia de la transducción.

Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos en los que la etapa de transducción de una población de células con un vector comprende cultivar las células durante menos de aproximadamente 44 h (protocolo "corto").

- Por ejemplo, la población de células puede cultivarse durante aproximadamente 12-42 h, 12-36 h, 12-24 h o 12-18 h durante la etapa de transducción con un vector. En una realización, la población de células se cultiva durante aproximadamente 42, 36, 30, 24, 18 o 12 h durante la etapa de transducción con un vector. Preferentemente, la población de células se cultiva durante aproximadamente 24 h durante la etapa de transducción con un vector.
- Bien en el protocolo convencional o en el corto, la fase de estimulación previa puede, por ejemplo, durar aproximadamente 12, 14, 16, 18 o 22 h. Preferentemente, la fase de estimulación previa es de aproximadamente 16 h de duración.
- Bien en el protocolo convencional o en el corto, la fase de exposición vectorial puede, por ejemplo, durar aproximadamente 8, 10, 12, 14 o 16 h. Preferentemente, la fase de exposición vectorial es de aproximadamente 8 h de duración.
- Bien en el protocolo convencional o en el corto, la etapa de transducción de una población de células con un vector puede comprender repetir las fases de estimulación previa y exposición del vector antes de la administración de las células a un sujeto. Por ejemplo, las células pueden ser estimuladas previamente, seguido de la exposición vectorial, seguida de una segunda fase de estimulación previa, seguida de una segunda fase de exposición vectorial.
- Preferentemente, el medio de cultivo celular durante la etapa de transducción de una población de células con un vector no comprende IL3.
- La prostaglandina E2 o un derivado de la prostaglandina E2 (por ejemplo, 16,16-dimetil-prostaglandina E2 (dmPGE2) se puede añadir a la población de células durante la fase de estimulación previa. La prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se pueden añadir al comienzo de la fase de estimulación previa o durante la fase de estimulación previa. Por ejemplo, la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se pueden añadir aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 h antes de la exposición de la población de células al vector. Preferentemente, la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se añade a la población de células durante la fase de estimulación previa, aproximadamente 2 h antes de la exposición de las células al vector. En otra realización, la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 se añade a la población de células al mismo tiempo que tiene lugar la exposición al vector.
- Los protocolos de transducción preferidos se exponen en el Ejemplo 8.
- Composición farmacéutica
- La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende la población de células terapéuticas y/o la población de células de soporte de la divulgación.
- Las células de la presente invención pueden formularse para la administración a sujetos con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, y potencialmente contienen albúmina sérica humana.
- El manejo del producto de terapia celular se realiza preferentemente de conformidad con los patrones internacionales FACT-JACIE para la terapia celular.
- Trasplante de células madre hematopoyéticas
- La presente invención proporciona una población de células terapéuticas para su uso en medicina, por ejemplo, para uso en terapia génica.
- El uso puede ser parte de un procedimiento de trasplante de células madre hematopoyéticas.
- El trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) es el trasplante de células madre sanguíneas derivadas de la médula ósea (en este caso, conocido como trasplante de médula ósea) o sangre. El trasplante de células madre es un procedimiento médico de los campos de la hematología y oncología, se realiza con mayor frecuencia para personas con enfermedades de la sangre o la médula ósea, o ciertos tipos de cáncer.
- Muchos receptores de los TCMH son pacientes con mieloma múltiple o leucemia que no se beneficiarían del tratamiento prolongado con, o que ya son resistentes a, la quimioterapia. Los candidatos para los TCMH incluyen casos pediátricos en los que el paciente tiene un defecto innato, tal como inmunodeficiencia combinada grave o neutropenia congénita con células madre defectuosas, y también niños o adultos con anemia aplásica que han perdido sus células madre después del nacimiento. Otras afecciones tratadas con trasplantes de células madre incluyen la enfermedad de células falciformes, el síndrome mielodisplásico, el neuroblastoma, el linfoma, el sarcoma de Ewing, el tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas y la enfermedad de Hodgkin. Más recientemente, se han desarrollado procedimientos no mieloablativos, o denominados "mini trasplante", que requieren menores dosis de

quimioterapia preparatoria y de radiación. Esto ha permitido que el TCMH se lleve a cabo en ancianos y otros pacientes que, de otro modo, se considerarían demasiado débiles para soportar un régimen de tratamiento convencional.

5 En una realización, la población de células terapéuticas y/o la población de células de soporte de la invención se administra como parte de un procedimiento de trasplante de células madre autólogas.

En otra realización, la población de células terapéuticas y/o la población de células de soporte de la invención se administra como parte de un procedimiento de trasplante alogénico de células madre.

10 Mediante el procedimiento de trasplante de células madre autólogas, debe entenderse que la población inicial de células (a partir de la que se derivan las poblaciones de células terapéuticas y/o de soporte) se obtiene del mismo sujeto a quien se administran las poblaciones de células terapéuticas y/o de soporte. Tal como se ha analizado anteriormente, los procedimientos de trasplante autólogo son ventajosos, ya que evitan los problemas asociados con la incompatibilidad inmunológica y están disponibles para los sujetos independientemente de la disponibilidad de un donante genéticamente compatible.

15 Mediante el procedimiento del trasplante alogénico de células madre, debe entenderse que la población inicial de células (a partir de la que se derivan las poblaciones de células terapéuticas y/o de soporte) se obtiene de un sujeto diferente a quien se administran las poblaciones de células terapéuticas y/o de soporte. Preferentemente, el donante estará asociado genéticamente con el sujeto a quien se administran las células para reducir al mínimo el riesgo de incompatibilidad inmunológica.

20 En una realización de la presente invención, la población de células terapéuticas se administra a un sujeto antes de la administración de la población de células de soporte.

25 La población de células terapéuticas puede administrarse a un sujeto, por ejemplo, aproximadamente 1-72, 12-60 o 24-48 h antes de la administración de la población de células de soporte, tal como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60 o 72 h antes de la administración de la población de células de soporte.

30 En otra realización, la población de células terapéuticas se administra a un sujeto contemporánea o simultáneamente a la administración de la población de células de soporte.

35 Las dosis adecuadas de poblaciones de células terapéuticas y de soporte son tales que sean terapéutica y/o profilácticamente eficaces. La dosis que se administrará puede depender del sujeto y de la afección que se vayan a tratar, y puede ser determinada fácilmente por un experto.

40 Una posible dosis de células CD34+CD38+ dentro de la población de células de soporte puede ser de aproximadamente 4-5 millones de células/kg. Esta dosis debe garantizar un injerto oportuno a corto plazo después del acondicionamiento mieloablativo.

45 Por consiguiente, como la población de células de soporte de la invención no está enriquecida en células CD34+, una posible dosis diana de la población de células de soporte puede ser de aproximadamente 50-1.000 millones de células nucleadas CD38+/kg, tal como aproximadamente 100 millones de células/kg (suponiendo una concentración de células CD34+ del 5 %). Por ejemplo, una posible dosis de células derivadas de sangre periférica movilizada puede ser de aproximadamente 100-500 millones de células/kg, mientras que una posible dosis de células derivadas de la médula ósea puede ser de aproximadamente 50-200 millones de células/kg.

50 Una posible dosis de la población de células terapéuticas puede ser de aproximadamente 0,1-2 millones de células/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,5-1 millón de células/kg.

55 La proporción global de las poblaciones de células terapéuticas con respecto a las de células de soporte depende del contexto clínico y de la forma en que se prepare la población de células de soporte. En un caso en el que la población de células de soporte se prepara mediante selección de CD38 (por ejemplo, de leucaféresis o extracción de médula ósea) sin enriquecimiento previo de CD34, la proporción global de población de células terapéuticas con respecto a la de células de soporte puede ser de aproximadamente 1:100-1:1000, por ejemplo, aproximadamente 1:500 o 1:100. Es preferible dosificar la población de células de soporte en función del número absoluto de células CD34+ contenidas dentro (independientemente de si se ha realizado o no el enriquecimiento previo de CD34+).

60 En una realización, cuando el sujeto se ha sometido a un acondicionamiento mieloablativo, las dosis de células pueden ajustarse de modo que el número de células CD34+ administradas en la población de células de soporte sea de aproximadamente 5-15 veces, preferentemente de 5-10 veces el número de células CD34+ administradas en la población de células terapéuticas. Así pues, por ejemplo, la proporción de las células CD34+CD38- con respecto a las células progenitoras CD34+CD38+ no cultivadas administradas a un sujeto puede ser de aproximadamente 1:10 o 1:5.

65 La población de células de soporte que se administrará puede comprender un número absoluto mínimo de aproximadamente 2,5-3 millones de células CD34+/kg de peso del paciente.

Cuando un sujeto no se ha sometido a un acondicionamiento mieloablativo, puede administrarse solo la población de células terapéuticas al sujeto (es decir, la población de células de soporte puede no ser necesaria).

5 Las poblaciones de células terapéuticas y/o de soporte de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de los trastornos enumerados en el documento WO 1998/005635. Para facilitar la referencia, a continuación, se proporciona parte de esa lista: cáncer, inflamación o enfermedad inflamatoria, trastornos dermatológicos, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación y respuesta de fase aguda, caquexia, anorexia, infección aguda, infección por VIH, estados de choque, reacciones de injerto frente a hospedador, enfermedad autoinmunitaria, lesión por reperfusión, meningitis, migraña y antitrombosis dependiente de aspirina; crecimiento, invasión y diseminación tumoral, angiogénesis, metástasis, tumor maligno, ascitis y derrame pleural maligno; isquemia cerebral, cardiopatía isquémica, artrosis, artritis reumatoide, osteoporosis, asma, esclerosis múltiple, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, apoplejía, vasculitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; periodontitis, gingivitis; psoriasis, dermatitis atópica, úlceras crónicas, epidermolisis ampollosa; ulceración de la córnea, retinopatía y cicatrización de heridas quirúrgicas; rinitis, conjuntivitis alérgica, eccema, anafilaxia; restenosis, insuficiencia cardíaca congestiva, endometriosis, aterosclerosis o endosclerosis.

Además, o como alternativa, las poblaciones de células terapéuticas y/o de soporte de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de los trastornos enumerados en el documento WO 1998/007859. Para facilitar la referencia, a continuación, se proporciona parte de esa lista: actividad de proliferación/diferenciación de citocinas y células; actividad inmunosupresora o inmunestimulante (por ejemplo, para tratar la inmunodeficiencia, incluyendo la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana; regulación del crecimiento de los linfocitos; tratamiento del cáncer y muchas enfermedades autoinmunitarias, y prevención del rechazo de trasplantes o inducción de inmunidad tumoral); regulación de la hematopoyesis, por ejemplo, tratamiento de enfermedades mieloides o linfoides; potenciación del crecimiento de hueso, cartilago, tendón, ligamento y tejido nervioso, por ejemplo, para la curación de heridas, tratamiento de quemaduras, úlceras, y enfermedad periodontal y neurodegeneración; inhibición o activación de la hormona estimulante de folículos (modulación de la fertilidad); actividad quimiotáctica/quimiocinética (por ejemplo, para movilizar tipos de células específicas a sitios de lesión o infección); actividad hemostática y trombolítica (por ejemplo, para tratar la hemofilia y el accidente cerebrovascular); actividad antiinflamatoria (para tratar, por ejemplo, el choque séptico o la enfermedad de Crohn); como agentes antimicrobianos; moduladores de, por ejemplo, el metabolismo o el comportamiento; como analgésicos; tratamiento de trastornos de deficiencia específicos; en el tratamiento de, por ejemplo, la psoriasis, en medicina humana o veterinaria.

Además, o como alternativa, las poblaciones de células terapéuticas y/o de soporte de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de los trastornos enumerados en el documento WO 1998/009985. Para facilitar la referencia, a continuación, se proporciona parte de esa lista: actividad inhibidora de macrófagos y/o inhibidora de linfocitos T y, por lo tanto, actividad antiinflamatoria; actividad antinmunitaria, es decir, efectos inhibidores contra una respuesta inmunitaria celular y/o humoral, incluyendo una respuesta no asociada con la inflamación; Inhibición de la capacidad de los macrófagos y de los linfocitos T para adherirse a los componentes de la matriz extracelular y a la fibronectina, así como la expresión del receptor fas regulado por aumento en los linfocitos T; Inhibición de la reacción inmunitaria no deseada y de la inflamación, incluyendo la artritis, incluyendo la artritis reumatoide, inflamación asociada con la hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedades del colágeno y otras enfermedades autoinmunitarias, inflamación asociada con la aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad cardíaca aterosclerótica, lesión por reperfusión, paro cardíaco, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome de dificultad respiratoria u otras enfermedades cardiopulmonares, inflamación asociada con la úlcera péptica, colitis ulcerosa y otras enfermedades del tracto gastrointestinal, fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas, tiroiditis u otras enfermedades glandulares, glomerulonefritis u otras enfermedades renales y urológicas, otitis u otras enfermedades otorrinolaringológicas, dermatitis u otras enfermedades dérmicas, enfermedades periodontales u otras enfermedades dentales, orquitis o epididimoorquitis, infertilidad, trauma orquidal u otras enfermedades testiculares relacionadas con el sistema inmunitario, disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, aborto habitual, eclampsia, preeclampsia y otras enfermedades ginecológicas inmunitarias y/o inflamatorias, uveítis posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, coriorretinitis, uveorretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, por ejemplo, retinitis o edema macular cistoide, oftalmia del simpático, escleritis, retinitis pigmentosa, componentes inmunitarios e inflamatorios de la enfermedad degenerativa del fundus, componentes inflamatorios del trauma ocular, inflamación ocular causada por infección, vítreo-retinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrización excesiva, por ejemplo, tras una operación de filtración de glaucoma, reacción inmunitaria y/o inflamatoria contra implantes oculares y otras enfermedades oftálmicas relacionadas con el sistema inmunitario e inflamatorias, inflamación asociada con enfermedades o afecciones o trastornos autoinmunitarias, en los que, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en cualquier otro órgano, sería beneficiosa la supresión inmunitaria y/o inflamatoria, enfermedad de Parkinson, complicaciones y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, complejo de demencia relacionado con el SIDA, encefalopatía relacionada con el VIH, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades degenerativas, afecciones o trastornos del SNC, componentes inflamatorios de apoplejías, síndrome post-polio, componentes inmunitarios e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomielitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillain-Barré, Sydenham chora, miastenia grave, pseudo-tumor cerebral, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica,

componentes inflamatorios de la compresión del SNC o traumatismo del SNC o infecciones del SNC, componentes inflamatorios de atrofas y distrofias musculares, y enfermedades, afecciones o trastornos del sistema nervioso central y periférico relacionados con el sistema inmunitario o inflamatorios, inflamación postraumática, choque séptico, enfermedades infecciosas, complicaciones inflamatorias o efectos secundarios de la cirugía, trasplante de médula ósea u otras complicaciones y/o efectos secundarios del trasplante, complicaciones y efectos secundarios inflamatorios e/o inmunitarios de la terapia génica, por ejemplo, debido a infección con un vehículo vírico, o inflamación asociada con el SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, para tratar o mejorar enfermedades proliferativas de monocitos o leucocitos, por ejemplo, leucemia, mediante la reducción de la cantidad de monocitos o linfocitos, para la prevención y/o el tratamiento del rechazo del injerto en casos de trasplante de células naturales o artificiales, tejidos y órganos tales como la córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido de piel natural o artificial.

Kit

15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que comprende las poblaciones de células terapéuticas y de soporte de la divulgación.

Las poblaciones de células terapéuticas y de soporte pueden proporcionarse en recipientes adecuados.

20 El kit también puede incluir instrucciones de uso.

Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

25 En el presente documento se desvela una población de células progenitoras hematopoyéticas para su uso en terapia génica, en la que la población de células progenitoras hematopoyéticas ha sido transducida con un nucleótido de interés.

30 Como han demostrado los presentes inventores, dichas células progenitoras proporcionan injerto a corto plazo. Por consiguiente, dicha terapia génica proporcionaría un efecto no permanente en el sujeto. Por ejemplo, el efecto puede limitarse a 1-6 meses tras la administración de las células progenitoras hematopoyéticas transducidas. Una ventaja de este enfoque sería una mejor seguridad y tolerabilidad, debido a la naturaleza autolimitada de la intervención terapéutica.

35 Por consiguiente, podemos adaptar la persistencia de las células modificadas por genes (véase el Ejemplo 3). Por ejemplo, se prevé que se puedan administrar diferentes poblaciones de células para el tratamiento de diferentes afecciones dependiendo del período de tiempo durante el que se desea la expresión del nucleótido de interés, tales como:

- 40 1. Largo plazo: Células CD34+CD38⁻ (por ejemplo, percentil del 0-10 %) para la cura de enfermedades genéticas hereditarias;
2. Medio plazo: células CD34+CD38^{int/baja} (por ejemplo, percentil del 12-40 %) para una duración del tratamiento de aproximadamente 3-4 meses (por ejemplo, para la administración dirigida al microambiente de proteínas anticancerígenas);
- 45 3. Corto plazo: células CD34+CD38^{+/int} (por ejemplo, percentil del 41-70 %) para una duración del tratamiento de aproximadamente 1-2 meses (por ejemplo, para la administración dirigida al microambiente de proteínas anticancerígenas).

50 En otro aspecto, la invención proporciona una población de células progenitoras hematopoyéticas para su uso en terapia génica, en la que dichas células se han separado de una población de células que comprende células madre y células progenitoras hematopoyéticas, y luego se han transducido con un nucleótido de interés, en la que la población de células progenitoras hematopoyéticas tiene un fenotipo seleccionado del grupo que consiste en CD34+CD38^{int}, CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y CD34+CD38⁺, y en la que la población de células progenitoras transducidas se administra en combinación con una población de células madre hematopoyéticas.

55 Dicha terapia génica de células progenitoras hematopoyéticas puede ser adecuada para el tratamiento de trastornos adquiridos, por ejemplo, cáncer, en los que la expresión limitada por el tiempo de un nucleótido anticancerígeno (potencialmente tóxico) de interés puede ser suficiente para erradicar la enfermedad.

60 Los nucleótidos particularmente adecuados de interés para la aplicación en la terapia génica de células progenitoras hematopoyéticas incluyen, por ejemplo, interferón alfa2b, otro tipo 1 de interferones, otras citocinas inmunoestimulantes (por ejemplo, IL-2, IL-12), transgenes inductores de la apoptosis tales como el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL) y factores disruptivos del microambiente tumoral.

65 En una realización, la población de células progenitoras hematopoyéticas tiene el fenotipo CD34+CD38^{int}, por ejemplo, la población de células progenitoras hematopoyéticas se ha enriquecido para el fenotipo CD34+CD38^{int}.

Una población de células con un fenotipo CD34+CD38^{int} puede separarse usando métodos de citometría de flujo. La población de células progenitoras hematopoyéticas CD38^{int} puede estar contenida en el intervalo del 10-70 % de expresión de CD38, de acuerdo con lo determinado por citometría de flujo (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y la Figura 4: en estos, la población de CD38^{int} se ha separado adicionalmente en CD38^{int1} y CD38^{int2}). Las células madre hematopoyéticas pueden estar contenidas en el intervalo del 0-10 % de expresión de CD38.

En otra realización, la población de células progenitoras hematopoyéticas tiene un fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+, por ejemplo, la población de células progenitoras hematopoyéticas se ha enriquecido para los fenotipos CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+. Así pues, por ejemplo, la población de células progenitoras puede comprender esencialmente células CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+.

En otra realización, la población de células progenitoras transducidas se administra en combinación con una población de células madre hematopoyéticas, por ejemplo, células madre hematopoyéticas no modificadas. Las células madre hematopoyéticas pueden tener el fenotipo CD34+CD38^{int}.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de células con un fenotipo CD34+CD38^{int}, por ejemplo, una población de células enriquecidas para células con el fenotipo CD34+CD38^{int}, para su uso en terapia génica, en la que dicha población de células ha sido transducida con un nucleótido de interés.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de células con un fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+, por ejemplo, una población de células enriquecidas para células con un fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+, para su uso en terapia génica, en la que dicha población de células ha sido transducida con un nucleótido de interés. Así pues, por ejemplo, la población de células progenitoras puede comprender esencialmente células CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de células progenitoras hematopoyéticas para su uso en terapia génica, en la que la población de células progenitoras hematopoyéticas tiene el fenotipo CD34+CD38^{int} (por ejemplo, la población de células progenitoras hematopoyéticas se ha enriquecido para el fenotipo CD34+CD38^{int}) y se ha transducido con un nucleótido de interés.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de células progenitoras hematopoyéticas para su uso en terapia génica, en la que la población de células progenitoras hematopoyéticas tiene el fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+ (por ejemplo, la población de células progenitoras hematopoyéticas se ha enriquecido para un fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+) y ha sido transducida con un nucleótido de interés. Así pues, por ejemplo, la población de células progenitoras puede comprender esencialmente células CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de preparación de una población de células progenitoras hematopoyéticas para uso clínico, dicho método comprende separar una población de células progenitoras hematopoyéticas de una población de células que comprende células madre hematopoyéticas y células progenitoras, y transducir la población de células separadas con un nucleótido de interés.

En una realización, la población de células progenitoras hematopoyéticas tiene el fenotipo CD34+CD38^{int}, por ejemplo, la población de células progenitoras hematopoyéticas se ha enriquecido para el fenotipo CD34+CD38^{int}.

En otra realización, la población de células progenitoras hematopoyéticas tiene un fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+, por ejemplo, la población de células progenitoras hematopoyéticas se ha enriquecido para los fenotipos CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+. Así pues, por ejemplo, la población de células progenitoras puede comprender esencialmente células CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38+.

Método de tratamiento

Debe apreciarse que todas las referencias realizadas en el presente documento al tratamiento incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico; aunque en el contexto de la presente invención, las referencias a la prevención se asocian más comúnmente con el tratamiento profiláctico. Se prefiere el tratamiento de mamíferos, en particular, de seres humanos. Los tratamientos tanto humanos como veterinarios están dentro del alcance de la presente invención.

Prostaglandina

La prostaglandina E2 o un derivado de prostaglandina E2 se pueden usar para aumentar la eficiencia de la transferencia génica cuando se transducen células madre hematopoyéticas o progenitoras hematopoyéticas con un vector, preferentemente, un vector vírico.

En una realización de la presente invención, el derivado de prostaglandina E2 es 16,16-dimetil-prostaglandina E2.

Por derivado, debe entenderse que la prostaglandina E2 se modifica mediante cualquiera de una serie de técnicas

conocidas en la técnica, preferentemente para mejorar propiedades tales como la estabilidad y la actividad, mientras sigue conservando su función de aumentar la eficiencia de transferencia de genes al transducir células madre hematopoyéticas con un vector.

- 5 También se prevé que la prostaglandina E2 o el derivado de prostaglandina E2 puedan sustituirse por agonistas del receptor de prostaglandina, por ejemplo, fármacos de molécula pequeña que actúan sobre el receptor EP4, en cualquiera de los aspectos y realizaciones descritos en el presente documento.

Ejemplos

10 Ejemplo 1

Las HSC altamente purificadas son más transducibles por vectores lentivíricos

- 15 Se estudió el efecto diferencial de un micro-ARN en las poblaciones de células progenitoras y hematopoyéticas. Con este fin, se transdujeron HSPC de sangre de cordón umbilical CD34⁺ CD38⁻ y CD34⁺ CD38⁺ con una esponja de ARNm lentivírico o vectores de sobreexpresión (datos no mostrados). Inesperadamente, y en contraste con lo que está ampliamente extendido en el campo, se advirtió una transferencia de genes 1,5 veces superior en el subconjunto enriquecido con HSC CD34⁺CD38⁻ más primitivo. Se confirmó de manera independiente esta observación en múltiples
20 donantes de sangre de cordón umbilical y de médula ósea adultos usando vectores biológicamente neutros que expresaban genes marcadores, demostrando una eficiencia de la transferencia de genes aumentada de 1,5 a 2 veces en las fracciones enriquecidas en HSC CD34⁺CD38⁻ clasificadas en comparación con la transducción de células CD34⁺ o CD34⁺CD38⁺ en masa (Figura 1(A)).

- 25 Dado que las HSPC CD34⁺ en masa contienen un pequeño subconjunto de células CD38⁻, se deseaba probar si este aumento de la transducibilidad de las células más primitivas también se mantenía dentro de un cultivo en masa, o si era necesaria una clasificación previa para ver este efecto. Por lo tanto, se realizó una comparación lado a lado de un protocolo de clasificación-VL (clasificando primero las subpoblaciones de CD38, luego transduciendo el vector lentivírico tras 24 h de estimulación previa) con un protocolo de VL-clasificación (estimulación previa de 24 h seguida
30 de la transducción con el vector lentivírico y clasificación de subpoblaciones de CD38 24 h después de la transducción). Aunque también fue evidente un aumento de la transducción de las células CD38⁻ en el grupo de VL-clasificación, el efecto fue significativamente mayor cuando se realizó la clasificación antes de la transducción (Figura 1(A)).

- 35 Así pues, el trabajo en subpoblaciones enriquecidas con HSC altamente purificadas ofrece una clara ventaja en términos de transducción.

- Los presentes inventores han confirmado que el aumento de la transferencia de genes a HSPC CD34⁺CD38⁻ purificadas previamente en lugar de a células CD34⁺ en masa se mantiene *in vivo* después del xenotrasplante (Figura 1(B)). Estos datos sugieren que el efecto se produce a nivel de células madre hematopoyéticas y que es probable que
40 perdure a largo plazo en pacientes sometidos a terapia génica.

Ejemplo 2

- 45 *La selección secuencial negativa/positiva basada en perlas para CD38 y CD34, respectivamente, permite la purificación de células con un potencial de injerto en NSG superior*

- Con el fin de probar la viabilidad de una selección secuencial negativa/positiva basada en perlas para CD38 y CD34, respectivamente, se aplicó un kit de selección de CD38 disponible en el mercado a células mononucleares de sangre del cordón umbilical humanas y se probó el potencial de injerto de la fracción de CD38⁻ (enriquecida adicionalmente
50 en CD34 mediante selección positiva) y la fracción CD38⁺ en ratones NSG mediante el trasplante competitivo (Figura 2). Aunque se usó un protocolo de selección no optimizado, de primera generación, se pudo demostrar claramente una ventaja de injerto para la fracción de CD38⁻. Aunque las células CD38⁻ representaron menos del 20 % del trasplante, el 70-80 % del injerto a largo plazo se derivó de esta fracción, motivando una mayor optimización de este protocolo de purificación.

55 Ejemplo 3

Modelización de un trasplante dividido en ratones NSG

- 60 Para modelizar el trasplante conjunto de células repobladas a largo plazo modificadas genéticamente con células progenitoras a corto plazo, se marcó diferencialmente la fracción enriquecida en células madre y varias fracciones de células progenitoras con un conjunto de vectores lentivíricos (VL) que expresaban proteínas fluorescentes, y se estudió la cinética del injerto en ratones NSG, tanto en un entorno competitivo como no competitivo.

- 65 En primer lugar, se clasificaron las HSPC de médula ósea adulta CD34⁺ en células CD34⁺CD38⁻ (+/-) y CD34⁺CD38^{alta} (+/alta), se estimularon previamente en SFEM StemSpan que contenía SCF (300 ng/ml), Flt3L (300 ng/ml), TPO

(100 ng/ml), IL6 (60 ng/ml) y dmPGE2 (10 μ M) durante 16 h y se transdujeron con un VL de GFP (+/-) o VL de OFP (+/alta). Tras 24 h de transducción, se inyectaron las células en ratones NSG irradiados subletalmente, de 8 semanas de vida, de la siguiente manera:

- 5 Grupo 1: 27.000 células +/- por ratón (n = 3);
 Grupo 2: 248.000 células +/alta por ratón (n = 3);
 Grupo 3: 27.000 células +/- y 248.000 células +/alta por ratón (n = 3)

10 Se monitorizaron el injerto (grupo 1, 2, 3) y el quimerismo (grupo 3) con el tiempo en la sangre periférica, y se analizaron los órganos hematopoyéticos 18 semanas después del trasplante (Figura 3).

15 Se encontró que las células CD34+/CD38^{alta} no se injertaron en el ratón, ni siquiera a corto plazo a las 3 semanas después del trasplante. En el grupo 3, en el que se mezclaron células CD34+/CD38^{alta} positivas en OFP con células CD34+/CD38⁻ positivas en GFP, se siguió el quimerismo de GFP/OFP a lo largo del tiempo y en las subpoblaciones hematopoyéticas indicadas (HSC: CD34+CD38⁻CD90+CD45RA⁻; MPP: CD34+CD38⁻CD90⁻CD45RA⁻; MLP: CD34+CD38⁻CD90⁻CD45RA⁺). Sorprendentemente, las células derivadas de CD34+/CD38^{alta} estuvieron casi ausentes durante todos los puntos de tiempo, así como en la médula ósea y en el bazo (este último no se muestra).

20 Se concluye que las células CD34+/CD38⁻ contienen la mayoría, si no todo, el potencial de repoblación en SCID, a corto y largo plazo.

25 A continuación, se pasó a las células de sangre periférica movilizada (SPM) CD34+ (adquiridas en Stem Cell Technologies), dado que esta es la fuente preferida de HSC en pacientes adultos que necesitan las mejoras del protocolo de terapia génica con mayor urgencia en comparación con el entorno pediátrico (Figura 4). Se clasificó la SPM CD34⁺ en 4 subconjuntos con niveles crecientes de expresión de CD38 (CD34+/CD38⁻; CD34+/CD38^{int1}; CD34+/CD38^{int2}; CD34+/CD38^{alta}), se estimularon previamente estos subconjuntos en SFEM StemSpan que contenía SCF (300 ng/ml), Flt3L (300 ng/ml), TPO (100 ng/ml), IL6 (60 ng/ml) y dmPGE2 (10 μ M) durante 16 h y se transdujeron los subconjuntos con los siguientes VL: +/-: GreenFP.LV; +/int1: CherryFP.LV; +/int2: CyanFP.LV; +/alta: OrangeFP.VL. Tras 24 h de transducción, Se inyectaron las células en ratones NSG irradiados subletalmente, de 8 semanas de vida, de la siguiente manera:

- 30 Grupo 1: 129.000 células +/- por ratón (n = 6);
 Grupo 2: 869.000 células progenitoras (suma de células +/int1, +/int2 y +/alta, contribuyendo cada población en un 33 % a la mezcla de células progenitoras) por ratón (n = 7);
 35 Grupo 3: una mezcla de 129.000 +/- y 869.000 células progenitoras agrupadas por ratón (n = 6)

Se monitorizaron el injerto (grupo 1, 2, 3) y el quimerismo (grupo 3) a lo largo del tiempo en la sangre periférica (Figure 4(A)).

40 Las células CD34+CD38^{alta} (+/alta) muestran un escaso, pero detectable potencial de injerto en ratones NSG en el punto de tiempo más temprano, y su producción se extinguió posteriormente. Curiosamente, la población CD34+CD38⁻ (+/-) de SPM mostró poco gasto hematopoyético a las 3 semanas después del trasplante. En cambio, el injerto a corto plazo en este punto de tiempo fue sostenido principalmente por las células CD34+CD38^{int} (int2 > int1). La contribución de las diferentes fracciones cambió a las 9-15 semanas del trasplante: el grupo 1 y el grupo 3 mostraron ahora niveles similares de injerto de células CD45⁺ humanas. En el grupo 3, que se trasplantó con la mezcla de todas las poblaciones de células madre y progenitoras, la población CD34+CD38⁻ (+/-) contribuyó a > 70-80 % de injerto CD45 humana⁺ y >98 % de injerto CD13 humana⁺, mientras que el +/int1 contribuyó aproximadamente con el 20-10 % de los linfocitos B. Las células +/int2 y +/alta no mostraron una contribución significativa a la hematopoyesis en los puntos temporales de 9 y 15 semanas.

50 Se concluye que las células CD34+ CD38⁻ (+/-) de SPM contienen la mayoría, si no todo, el potencial de repoblación en SCID a largo plazo, mientras que las células CD34+/CD38^{int2-alta} (primera onda) y CD34+/CD38^{int1} (segunda onda) proporcionan la repoblación a corto plazo. Esto proporciona una prueba de concepto de que basta con la modificación genética de las células CD34+CD38⁻ derivadas de SPM movilizada con G-CSF (10 % de todas las células CD34+) para lograr la mayoría, si no todo, el injerto a largo plazo por células modificadas genéticamente. La elección de incluir o no células CD34+/CD38^{int} en el cultivo de transducción depende del período de tiempo en el que se necesite lograr una absorción de la hematopoyesis por parte de las células transducidas. En cambio, las células CD34+/CD38^{int2} proporcionan un injerto a corto plazo, y representan la población ideal para ser administrada como células de soporte no modificadas genéticamente, sin cultivar, para reforzar la recuperación hematopoyética tras el acondicionamiento, reduciendo el riesgo de complicaciones infecciosas y hemorrágicas en pacientes sometidos a terapia génica.

65 Siguiendo el estudio que se muestra en la Figura 4(A) durante un período de tiempo más largo se obtiene una visión más profunda. La Figura 4(B) muestra la continuación del estudio hasta 24 semanas, que proporciona una lectura a largo plazo que mide la hematopoyesis derivada de HSC, estable. Además, los presentes inventores han realizado un experimento replicado usando otro donante de sangre periférica movilizada y permutando los vectores lentivíricos que marcan las fracciones de CD38.

Este análisis a largo plazo confirma que > 95 % del injerto a largo plazo se deriva de la fracción de CD38⁻ (las células con expresión de CD38 del 12 % más baja) de HSPC de sangre periférica movilizada CD34⁺ cultivadas. Estos datos también respaldan la cinética del injerto de las poblaciones progenitoras definidas por diferentes niveles de expresión de CD38: Las células CD38^{int/baja} (percentil del 12-40 % de CD38) dieron su mayor contribución a las 3 semanas con una disminución lenta durante un período de 4 meses; las células CD38^{+/int} (percentil del 41-70 % de CD38) dieron su mayor contribución a las 3 semanas con una rápida disminución durante un período de 2 meses. Las células CD38^{hi} (percentil del 71-100 % de CD38) dieron un bajo injerto a las 3 semanas.

Estos datos nos permiten ahora adaptar la persistencia de las células modificadas por genes:

- Largo plazo: Células CD34⁺ CD38⁻ (percentil del 0-10 %) para la cura de enfermedades genéticas;
- Medio plazo: Células CD34⁺ CD38^{int/baja} (percentil del 12-40 %) para una duración del tratamiento de 3-4 meses (por ejemplo, para la administración dirigida al microambiente de proteínas anticancerígenas);
- Corto plazo: Células CD34⁺CD38^{+/int} (percentil del 41-70 %) para una duración del tratamiento de 1-2 meses (por ejemplo, para la administración dirigida al microambiente de proteínas anticancerígenas).

Ejemplo 4

La prostaglandina E2 aumenta la transferencia de genes a células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas con potencial de repoblación en NSG

En un esfuerzo por aprovechar las propiedades antiapoptóticas de la prostaglandina E2 (PGE2) (Pelus L. M. *et al.* "Prostaglandins Other Lipid Mediat". 2011; 96: 3-9), se trataron HSPC CD34⁺ expuestas al estrés (ciclos de congelación/descongelación, transducción con vectores tóxicos, electroporación) con el homólogo de PGE2 de acción prolongada 16,16-dimetil-prostaglandina E2 (dmPGE2; Cayman Chemical, Cat. 14750). Inesperadamente, se encontró una eficiencia de la transferencia de genes 1,5 veces mayor en HSPC CD34⁺ o CD34⁺ CD38⁻ de la sangre del cordón umbilical (Figura 5(A)) y médula ósea adulta (Figura 6) después del tratamiento con dmPGE2. Esta diferencia en el número de copias del vector (NCV) se mantuvo durante más de 4 meses después del trasplante de las células en ratones NSG, y los niveles de injerto no se vieron afectados negativamente por el tratamiento con dmPGE2.

Los presentes inventores han confirmado que las células madre de sangre periférica CD34⁺ movilizadas con G-CSF también experimentan una transducción más eficiente mediante vectores lentivíricos si se estimulan previamente con dmPGE2 (Figura 5(B)).

Además, se ha investigado el efecto del momento de la estimulación con dmPGE2 en la transducción de HSPC humanas con vectores lentivíricos. El efecto parece maximizarse cuando se añade dmPGE2 2 h antes de la exposición al VL (Figura 5(C)).

Además, los presentes inventores han confirmado, en un experimento adicional, que el aumento del número de copias de vector obtenido por la estimulación con dmPGE2 *ex vivo* se mantiene a largo plazo, hasta 18 semanas después del xenotrasplante (Figura 5(D)).

En resumen, en el presente documento, se muestra por primera vez que los preparados de HSC más primitivas son más transducibles por vectores lentivíricos de tercera generación, de pseudotipado VSVg, un efecto que puede mejorarse aún más mediante la estimulación previa con dmPGE2. Los presentes inventores han ideado un innovador protocolo de terapia génica de HSC, que incorpora estas mejoras en la manipulación *ex vivo*. Se ha probado este nuevo protocolo en HSC humanas de sangre de cordón umbilical, médula ósea y sangre periférica movilizada, deconvolucionando por primera vez la cinética de reconstitución de múltiples linajes de poblaciones de sangre periférica movilizada CD34⁺ definidas inmunofenotípicamente basadas en las diferencias cuantitativas en la expresión de CD38 usando un modelo de xenotrasplante en NSG del estado de la técnica y células con injertos de múltiples linajes a largo plazo segregadas (<10 % del total de células CD34⁺) de progenitoras con potencial de repoblación rápida a corto plazo. Este protocolo mejorará la seguridad al proporcionar una fracción de HSC modificada genéticamente cualitativamente mejor a través de un cultivo *ex vivo* mejorado, la recuperación hematológica rápida sostenida por progenitoras no cultivadas y la infusión de una dosis de integración más baja en el paciente. También mejorará la sostenibilidad de la terapia génica de HSC al permitir una reducción sustancial en la dosis del vector.

Ejemplo 5

Protocolo clínico (adaptado de Biffi A. *et al. Science* 2013;341:1233158): se extrae médula ósea total de las crestas ilíacas en condiciones estériles y con anestesia general, de acuerdo con un POE interno. Como alternativa, los pacientes se someten a la movilización de HSPC con G-CSF a 5-10 µg/kg a partir del día 3, con o sin una sola dosis de plerixaphor 6-9 h antes de la leucaféresis. Luego se transfiere a una instalación de BPF la médula ósea o la sangre periférica movilizada extraída, recogida en una bolsa especial, sellada e identificada. La purificación celular se realiza mediante selección negativa/positiva con perlas inmunomagnéticas de acuerdo con el procedimiento del fabricante

(Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) en condiciones de BPF. Después se cultivan las células purificadas en bolsas VueLife recubiertas con retronectina (American Fluoroseal, Gaithersburg, MD) en medio sin suero complementado con citocinas de grado BPF (véase lo anterior) y se exponen una o dos veces al vector purificado de grado BPF en una multiplicidad de infección de 30-100, durante un tiempo total de cultivo de 40-60 h. Al final del procedimiento de transducción, se recogen las células CD34+ transducidas, se lavan con medio Cell Grow y se vuelven a suspender en solución salina a una concentración de $2 \cdot 10^6$ células/ml para la infusión en el paciente. Al final de la transducción, se recoge una fracción de las células para ensayos clonogénicos, citometría de flujo y cultivo *in vitro*, como se ha explicado anteriormente. Las células se mantienen a 4 °C hasta el momento de la infusión, tras la liberación del lote de acuerdo con las pruebas de control de calidad (resultados disponibles en la infusión para: viabilidad, inmunofenotipado, endotoxina, ADN grande de Ag T, micoplasma).

Ejemplo 6

Modelización de la administración conjunta de células madre CD34+CD38^{int/+} cultivadas/transducidas con células progenitoras CD34+CD38^{int/+} no cultivadas

Los datos que se muestran en la Figura 7 se refieren al trasplante combinado de células progenitoras de sangre periférica movilizada CD34+CD38^{int/+} no cultivadas (Progenitoras) con HSPC CD34+CD38⁻ (Madre) modificadas por genes. Este experimento demuestra que las células progenitoras CD34+CD38^{int/+} (percentil del 13-100 % de CD38) no cultivadas persisten por más tiempo y tienen una mayor capacidad de repoblación con respecto a las células CD34+CD38^{int/+} cultivadas/transducidas.

Esto significa que:

1. las células progenitoras nuevas administradas a los pacientes como una población de células de soporte probablemente aceleren y consoliden la recuperación hematopoyética en pacientes con terapia génica, reduciendo así sustancialmente el riesgo de complicaciones infecciosas y hemorrágicas en los primeros meses posteriores a la terapia;
 2. la proporción de células madre modificadas genéticamente frente a las células progenitoras nuevas (actualmente de 1:8) podría ajustarse a favor de las células madre (por ejemplo, a 1:5) para mejorar el marcaje eficiente de genes a largo plazo;
 3. parte de la población CD34+CD38^{int/+} podría eliminarse de la población de células de soporte para reducir la competitividad con las células CD34+CD38⁻ modificadas genéticamente;
 4. un corto tiempo de cultivo es fundamental para obtener HSC modificadas genéticamente, altamente funcionales.
- La mejora de las propiedades funcionales de las HSC modificadas genéticamente hace que las intervenciones descritas en los puntos (2) y (3) sean más irrelevantes, como lo demuestra un marcaje genético similar en las células CD34+ y CD33^{alta} *in vivo*, tanto para la proporción de 1:5 como para la proporción de 1:10 (véase la Figura 7B).

Ejemplo 7

Los datos de las Figuras 5, 7 y 9 demuestran que el tiempo de cultivo influye negativamente en la capacidad de injerto funcional de tanto las células madre como las células progenitoras de la sangre periférica movilizada. La reducción del tiempo de cultivo hasta 24 h puede mitigar el impacto perjudicial del cultivo y mejorar la calidad de los productos medicinales de la terapia génica. El uso de dmPGE2 permite la transducción eficiente de HSC en un protocolo de manipulación *ex vivo* corto, de 24 h (Figura 5), aportando así una fuerte razón para implementar este protocolo en futuros estudios de terapia génica. Estos datos también implican que el número de células CD34, la medida convencional usada para dosificar los trasplantes de células madre, tiene un valor informativo reducido, dado que las células CD34+ de cultivos *ex vivo* prolongados no son funcionalmente equivalentes a las células CD34+ nuevas o las células CD34+ cultivadas durante un corto período de tiempo. De hecho, aunque se inyectaron menos células CD34+ de los cultivos de 24 h con respecto a los cultivos de 44 h, el protocolo anterior proporcionó niveles más altos de injerto a largo plazo.

Ejemplo 8

Protocolos de transducción preferidos para obtener una transferencia de genes eficiente a HSPC CD34+CD38⁻ de sangre periférica movilizada (movilizada con G-CSF y/o Plerixaphor o nuevos agentes movilizadores en investigación) o médula ósea

Los protocolos analizados se indican en la Figura 10.

Protocolo de referencia: Convencional de dos aciertos-66 h: Células CD34+CD38⁻ transducidas con el protocolo convencional de 2 aciertos (66 horas), que es el protocolo de referencia actual para la transducción de células CD34+ (Biffi, A. *et al.* (2013) *Science* 341: 1233158; Scaramuzza, S. *et al.*, (2013) *Mol. Ther.* 21: 175-84).

Se demostró que el protocolo de 1 acierto de 44 h probado por los presentes inventores (véanse las Figuras 7 y 9) era

subóptimo, y no se seguirá utilizando.

Se espera que los siguientes protocolos superen a la referencia, y son protocolos preferidos para la modificación genética de las células CD34⁺ CD38⁻:

5 Protocolo A: Células CD34⁺CD38⁻ transducidas con un protocolo de "un solo acierto" (38 horas) en un medio libre de IL3;

10 Protocolo B: Células CD34⁺CD38⁻ transducidas con un protocolo de "un solo acierto" (38 horas) en un medio libre de IL3, con exposición a dmPGE2 120 min antes de la exposición al VI;

 Protocolo C: Células CD34⁺CD38⁻ transducidas con un protocolo acortado de "un solo acierto" (24 horas) en un medio libre de IL3;

15 Protocolo D: Células CD34⁺CD38⁻ transducidas con un protocolo acortado de "un solo acierto" (24 horas) en un medio libre de IL3, con exposición a dmPGE2 120 min antes de la exposición al VI.

20 Las células CD34⁺CD38⁻ se purificarán de la sangre periférica movilizada o de la médula ósea de acuerdo con una de las opciones técnicas contempladas (por ejemplo, clasificación basada en microchips o selección secuencial basada en perlas), y se sembrarán en medio de cultivo/transducción a una densidad de aproximadamente 10⁶ células/ml. Se añadirá VL de grado clínico (10⁷ a 10⁸ UT/ml, de acuerdo con la aplicación) en el punto de tiempo establecido en el esquema. En los protocolos B y D, dmPGE2 se añadirá al cultivo 120 minutos antes de la exposición al VI, como se establece en el esquema. Al final previsto del cultivo (véase el esquema experimental), las células se lavarán y

25 crioconservarán o prepararán para la administración directa al paciente (Producto farmacológico).

Condiciones ambientales durante la transducción de células de SPM CD34⁺

Incubadora

30 El cultivo se mantendrá en una incubadora de cultivo celular (37 °C, CO₂ al 5 %)

Placa de cultivo

35 Placa o bolsa recubierta con retronectina

Medio de estimulación previa/transducción

40 Protocolo de referencia: Medio CellGro (CellGenix) complementado con penicilina/estreptomina y SCF a 300 ng/ml, FLT3L (300 ng/ml), TPO (100 ng/ml), IL3 (60 ng/ml), filtrado en condiciones estériles (0,22 µm) antes de su uso.

45 Los protocolos A, B, C, D: Medio CellGro (CellGenix) (u otro medio de grado clínico adecuado para el cultivo de células madre hematopoyéticas) complementado con Penicilina/Estreptomina y SCF a 300 ng/ml, FLT3L (300 ng/ml), TPO (100 ng/ml), filtrado en condiciones estériles (0,22 µm) antes de su uso. Se añade dmPGE2 (10 µM) a algunos grupos de acuerdo con lo establecido en el protocolo.

50 Preferentemente, el producto farmacológico se infunde por vía intraósea tras un acondicionamiento adecuado del paciente. Opcionalmente, se puede administrar una dosis adecuada de células de soporte (definición de dosis adecuada: cero en caso de acondicionamiento no mieloablativo; en el caso del condicionamiento mieloablativo: 5-10 veces el número de células CD34⁺ del preparado CD38⁺ con respecto al número de células CD34⁺ contenidas en el preparado CD38⁻; con un número absoluto mínimo de 2,5-3 millones por kg de peso del paciente) por vía intravenosa, preferentemente 1-2 días después de la infusión del producto farmacológico. Como alternativa, el producto farmacológico puede administrarse por vía intravenosa, preferentemente, como una administración junto con las células de soporte.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de preparación de una población de células terapéuticas y una población de células de soporte adecuado para uso clínico a partir de una población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas, comprendiendo dicho método separar una población de células que no expresan sustancialmente CD38, pero que expresan CD34, de la población inicial de células, y transducir la población de células separada con un vector, obteniéndose la población de células terapéuticas que tenga el fenotipo CD34+CD38⁻; y en el que las células que expresan CD38 separadas o una parte de las mismas se conservan para formar una población de células de soporte que tengan el fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34⁺CD38⁺.
2. El método de la reivindicación 1, método que comprende las etapas de:
- separar células que expresan CD38 de una población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas;
 - separar las células que expresan CD34 de la población de células que no expresan CD38 obtenida en la etapa (a);
 - transducir la población de células que expresan CD34 obtenida en la etapa (b) con un vector para obtener la población de células terapéuticas.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la población inicial de células que comprende células madre hematopoyéticas se obtiene de sangre periférica movilizada, médula ósea o sangre del cordón umbilical.
4. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que las células que expresan CD38 y/o las células que expresan CD34 se separan usando separación basada en perlas magnéticas o citometría de flujo.
5. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el vector es un vector vírico, preferentemente, en el que el vector vírico es un vector lentivírico o comprende un nucleótido de interés.
6. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de transducción de una población de células con un vector comprende cultivar las células durante menos de aproximadamente 44 h, preferentemente, en el que la etapa de transducción de una población de células con un vector comprende cultivar las células durante aproximadamente 12-24 horas.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de transducción de una población de células con un vector comprende tratar la población de células con prostaglandina E2, o un derivado de prostaglandina E2, preferentemente, en el que las células se tratan con prostaglandina E2 o derivado de prostaglandina E2 antes de la exposición de las células al vector.
8. Una población de células terapéuticas para uso en medicina, teniendo la población de células terapéuticas el fenotipo CD34⁺CD38⁻ y preparándose de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y administrándose la población de células terapéuticas en combinación con una población de células de soporte que tiene el fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34⁺CD38⁺, y que se prepara de acuerdo con el método de cualquier reivindicación precedente.
9. Una población de células de soporte para uso en medicina, teniendo la población de células de soporte el fenotipo CD34+CD38^{int1}, CD34+CD38^{int2} y/o CD34+CD38⁺, y preparándose de acuerdo con un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y administrándose la población de células de soporte en combinación con la población de células terapéuticas que tiene el fenotipo CD34+CD38⁻ y que se prepara de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
10. La población de células terapéuticas o de soporte para el uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en la que el número de células CD34⁺ administradas a un sujeto en la población de células de soporte es aproximadamente 5-15 veces el número de células CD34⁺ administradas en la población de células terapéuticas cuando el sujeto ha sido sometido a un acondicionamiento mieloablativo.
11. La población de células terapéuticas o de soporte para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, administrándose las poblaciones de células terapéuticas y de soporte como parte de un procedimiento de trasplante de células madre autólogas o un procedimiento de trasplante alogénico de células madre.
12. La población de células terapéuticas o de soporte para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, administrándose la población de células terapéuticas a un sujeto antes de la administración de la población de células de soporte, o administrándose la población de células terapéuticas a un sujeto contemporánea o simultáneamente a la administración de la población de células de soporte.
13. Una población de células progenitoras hematopoyéticas para uso en terapia génica, en la que dichas células se han separado de una población de células que comprende células madre y células progenitoras hematopoyéticas, y

luego se han transducido con un nucleótido de interés, teniendo la población de células progenitoras hematopoyéticas un fenotipo seleccionado del grupo que consiste en CD34⁺CD38^{int}, CD34⁺CD38^{int1}, CD34⁺CD38^{int2} y CD34⁺CD38⁺, y administrándose la población de células progenitoras transducidas en combinación con una población de células madre hematopoyéticas.

5

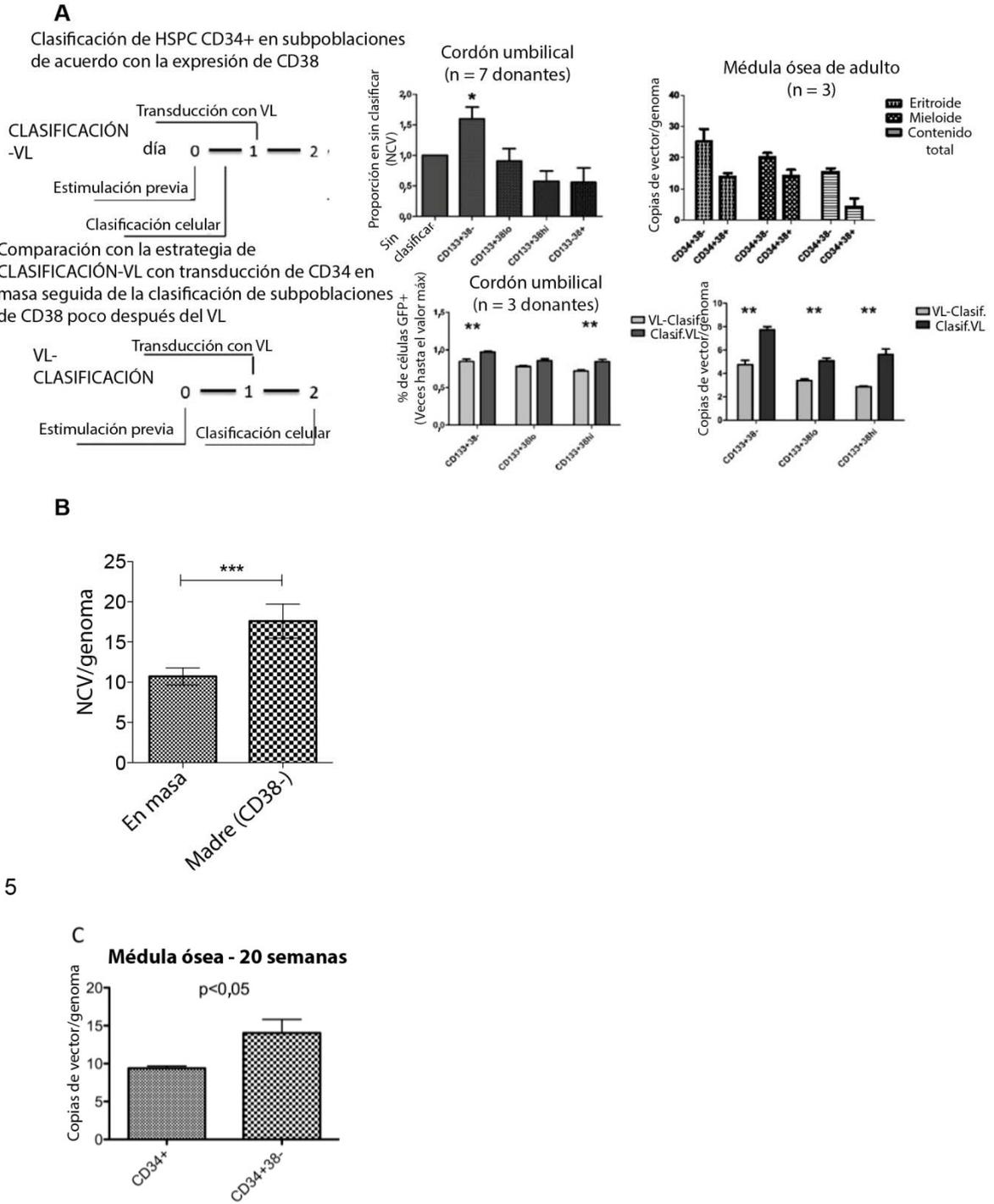


Figura 1

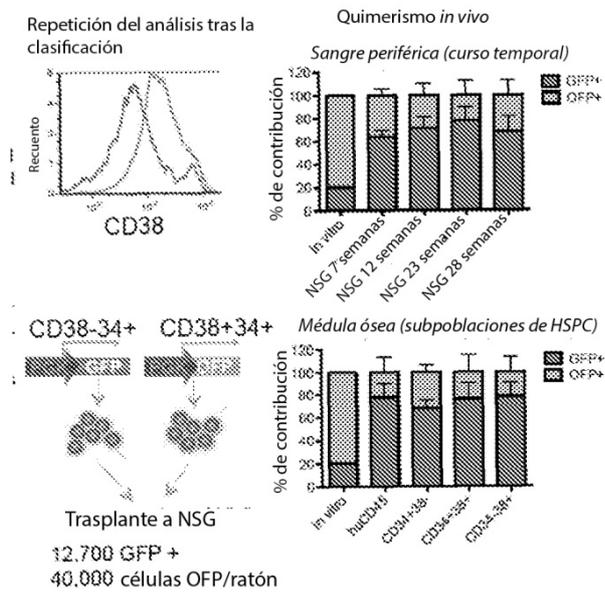


Figura 2

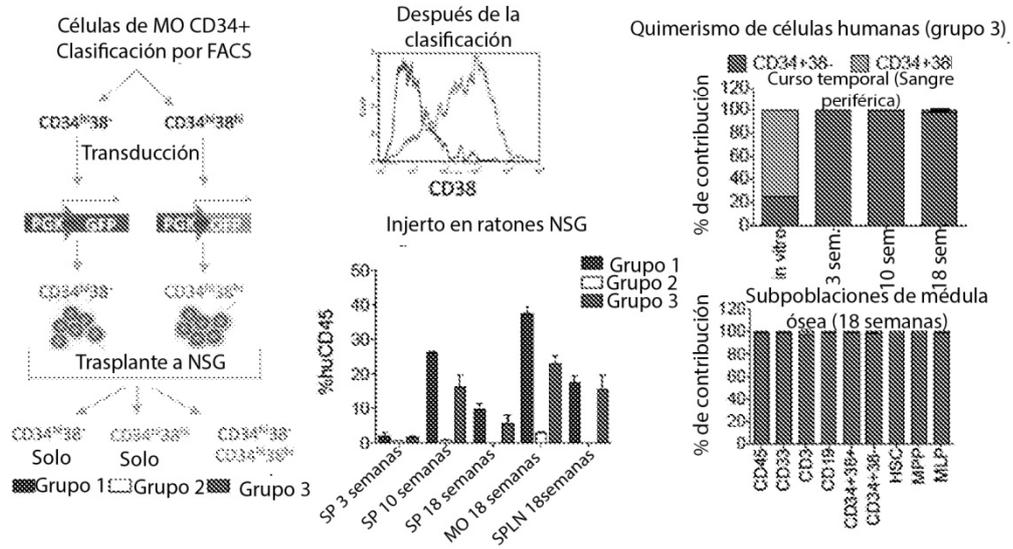
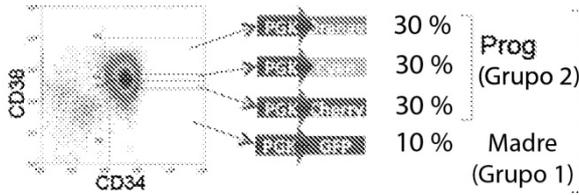


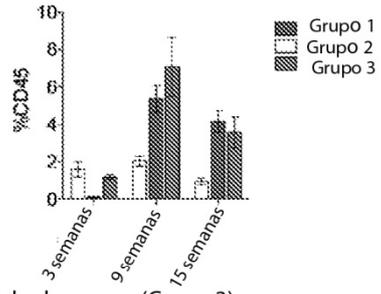
Figura 3

A

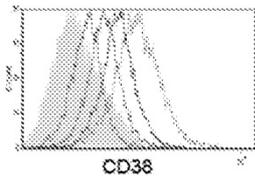
Estrategia de clasificación y marcaje



Injerto en ratones NSG

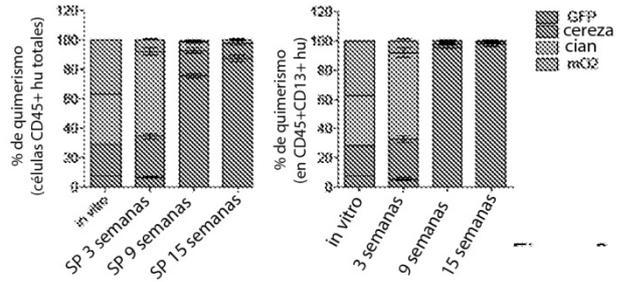


Repetición del análisis tras clasificación



% de transducción con VL
 - GFP: 98,95 %
 - Cereza: 94,71 %
 - Azul cian: 78,83 %
 - OFP: 87,01 %

Quimerismo de células humanas (Grupo 3)



B

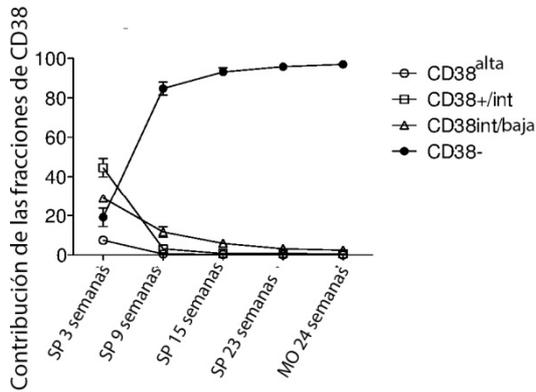


Figura 4

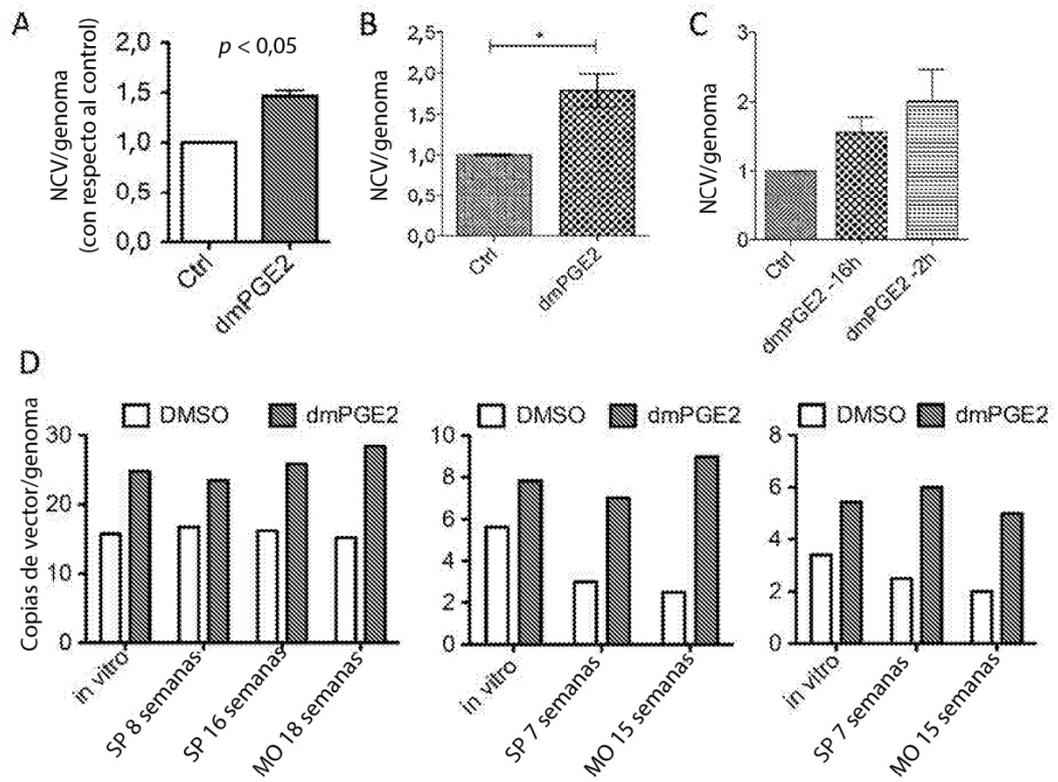


Figura 5 (A-D)

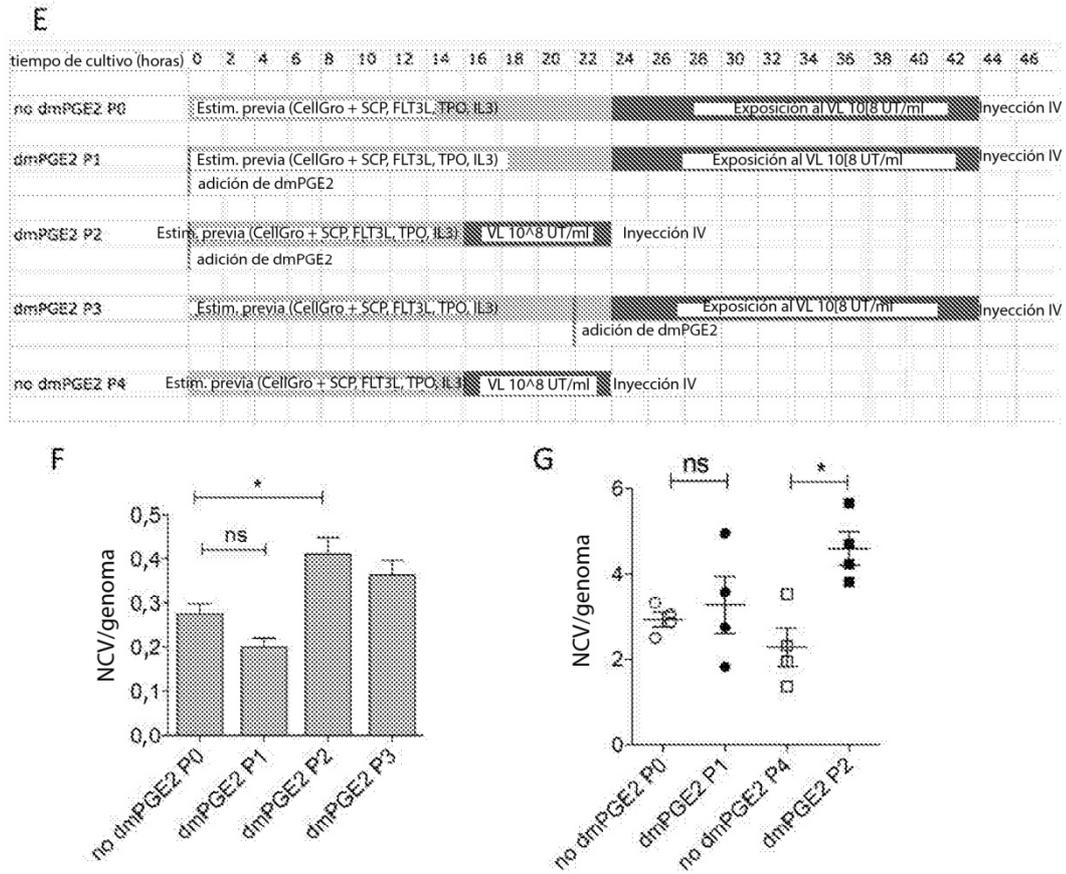


Figura 5(E-G)

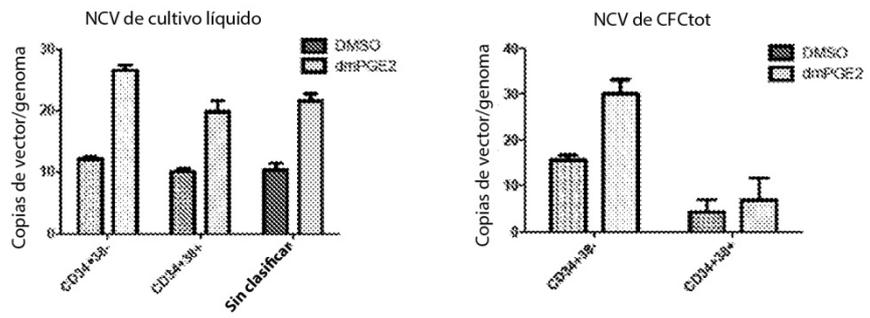


Figura 6

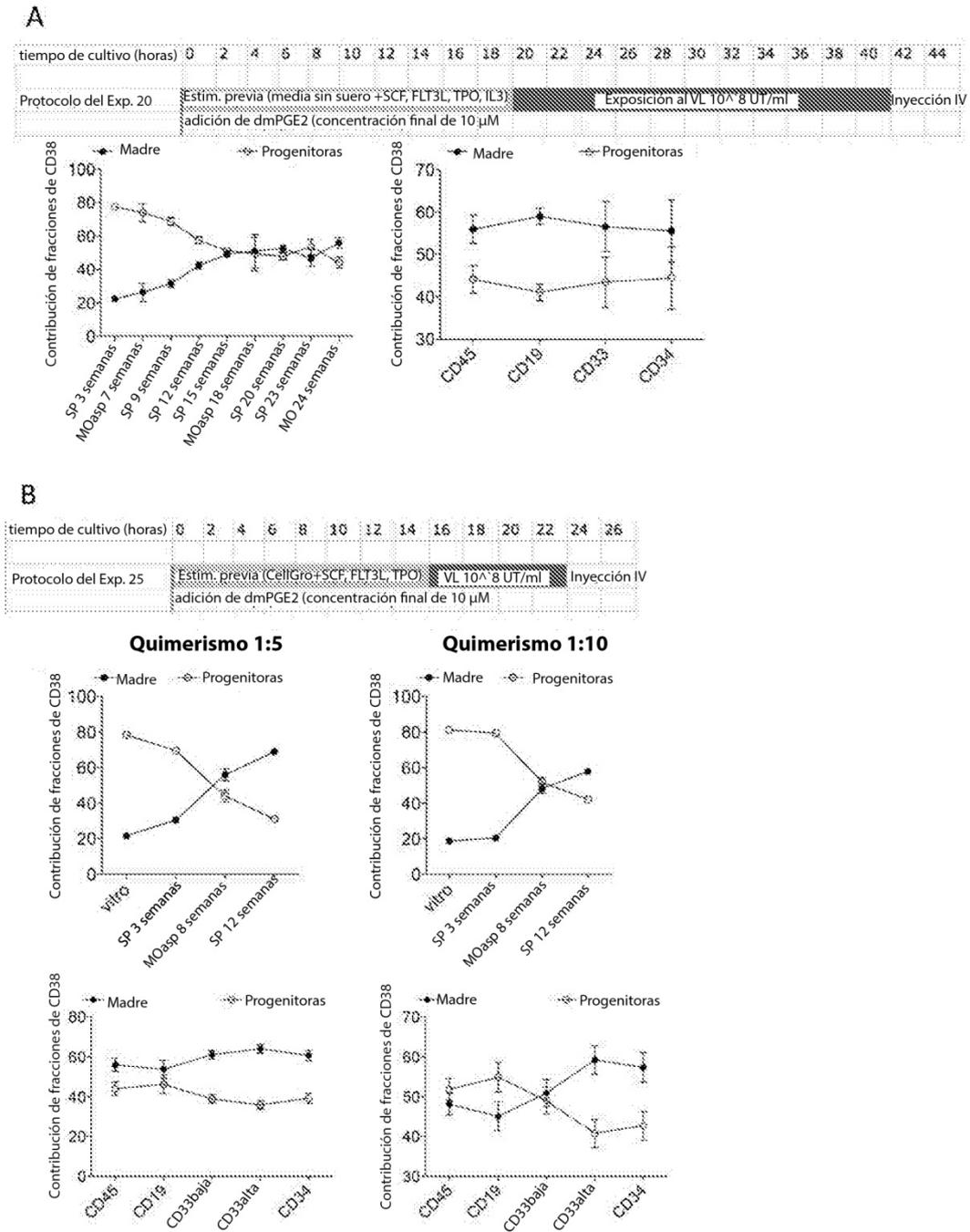


Figura 7

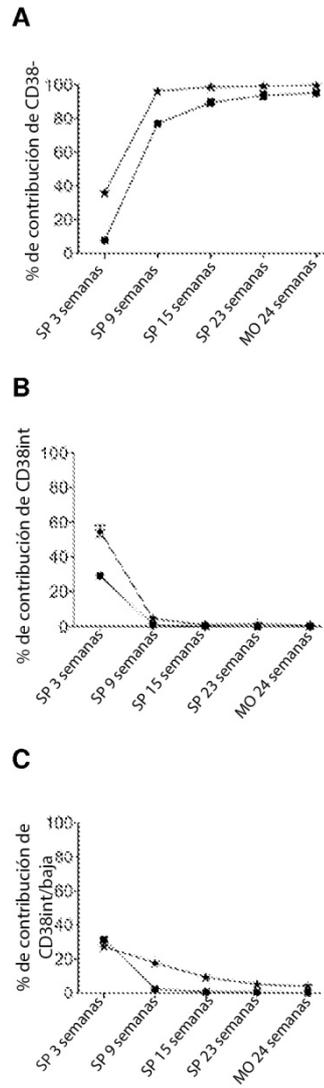


Figura 8

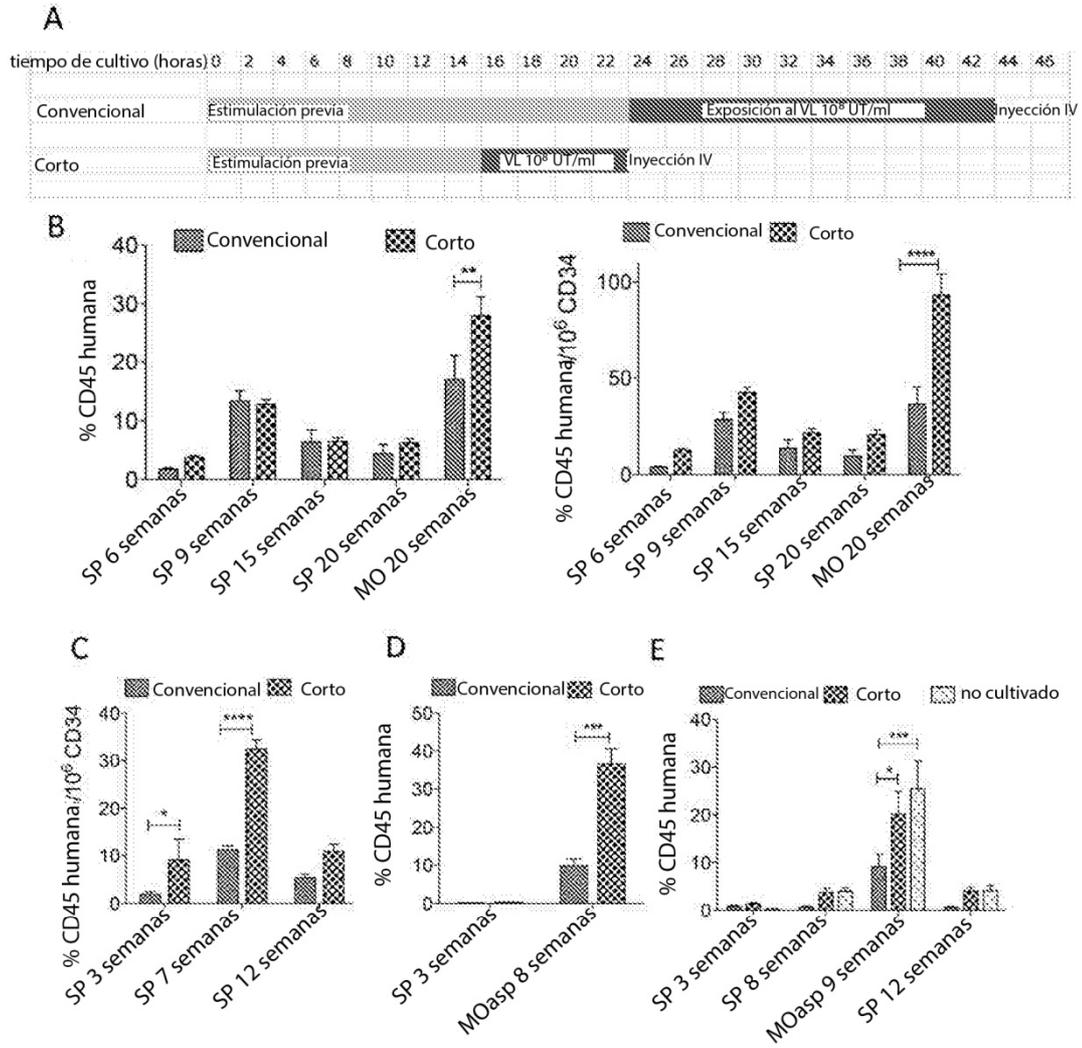


Figura 9

ES 2 747 951 T3

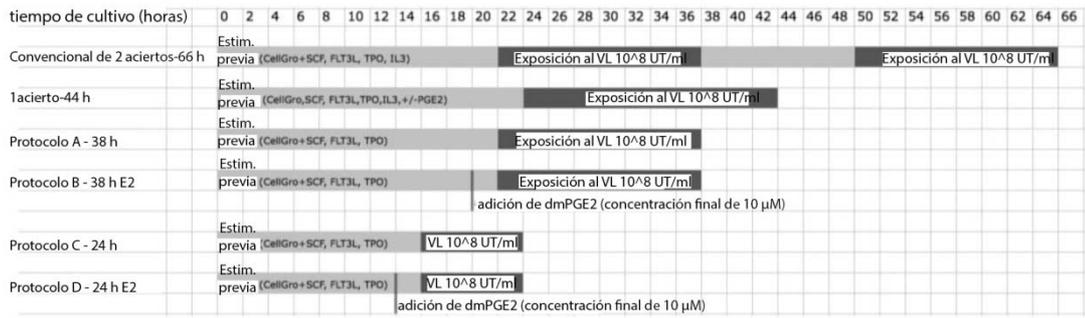


Figura 10