

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 270**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 7/01** (2006.01)

**C12N 5/02** (2006.01)

**C12N 5/0789** (2010.01)

**A61K 38/46** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012** **E 17173567 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 3269802**

54 Título: **Compuestos para transducción viral mejorada**

30 Prioridad:

**30.09.2011 US 201161541736 P**

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

**25.06.2020**

73 Titular/es:

**BLUEBIRD BIO, INC. (100.0%)**  
**60 Binney Street**  
**Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**HEFFNER, GARRETT COLLINS y**  
**BASSAN, ABRAHAM ISAAC**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 769 270 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

Compuestos para transducción viral mejorada

## 5 ANTECEDENTES

Campo técnico

10 La presente invención se refiere en general a mejorar la eficacia de los métodos de transducción viral de células. Más concretamente, la presente invención proporciona métodos útiles para mejorar la eficacia de células transductoras, tales como las células madre hematopoyéticas humanas (HSC), con virus y/o vectores virales que pueden ser útiles para indicaciones terapéuticas.

Descripción de los antecedentes de la técnica

15 La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) aún no ha autorizado ningún producto de terapia génica humana para la comercialización. La terapia génica actual es experimental y no ha demostrado tener éxito en ensayos clínicos. Apenas se ha avanzado desde el primer ensayo clínico de terapia génica que comenzó en 1990. En 1999, la terapia génica sufrió un gran revés con la muerte de Jesse Gelsinger, de 18 años de edad. Jesse estaba participando en un ensayo de terapia génica para la deficiencia de ornitina transcarboxilasa (OTCD). Murió de fallo multiorgánico 4 días después de iniciar el tratamiento. Se cree que su muerte fue provocada por una respuesta inmunitaria grave contra el transportador adenoviral.

25 Se produjo otro golpe importante en enero de 2003, cuando la FDA suspendió temporalmente todos los ensayos de terapia génica que utilizaban vectores retrovirales en células madre sanguíneas. La FDA tomó esta medida después de enterarse de que un segundo niño tratado en un ensayo de terapia génica francés había desarrollado una afección similar a la leucemia. Tanto este niño como otro que había desarrollado una afección similar en agosto de 2002 habían sido tratados con éxito mediante terapia génica para la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (X-SCID), también conocida como síndrome del "niño burbuja". El Comité consultivo sobre modificadores de la respuesta biológica (BRMAC) de la FDA se reunió a finales de febrero de 2003 para analizar posibles medidas que permitiesen que continuasen varios ensayos de terapia génica retroviral para el tratamiento de enfermedades potencialmente mortales, con las garantías apropiadas. En abril de 2003, la FDA relajó la prohibición sobre los ensayos de terapia génica que utilizan vectores retrovirales en células madre sanguíneas.

35 Sin embargo, recientemente varios grupos han llevado a cabo ensayos de terapia génica moderadamente satisfactorios para combatir varias enfermedades. En 2008, los investigadores británicos del UCL Institute of Ophthalmology y Moorfields Eye Hospital NIHR Biomedical Research Centre dieron a conocer un ensayo clínico de terapia génica satisfactorio para el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber, un tipo de ceguera heredada. Los resultados mostraron que el tratamiento experimental es seguro y que puede mejorar la vista (Maguire *et al.*, N Engl J Med. 358(21):2240 (2008)).

45 En 2011, Neurologix, Inc. dio a conocer los resultados positivos en un ensayo de fase 2 de su terapia génica en investigación para la enfermedad de Parkinson (PD) avanzada, NLX-P101. Los participantes del estudio que recibieron NLX-P101 experimentaron mejoras estadísticamente significativas y de trascendencia clínica en las puntuaciones motoras sin medicación en comparación con los sujetos control que recibieron cirugía simulada. En el ensayo, esta mejora se observó al mes y se mantuvo prácticamente sin cambios a lo largo del período de estudio con enmascaramiento de seis meses. Los resultados también demostraron un perfil de seguridad positivo para NLX-P101, sin eventos adversos graves relacionados con la terapia génica o con el procedimiento quirúrgico descrito. Los pacientes incluidos en el ensayo tenían PD de moderada a avanzada y no respondían adecuadamente a los tratamientos actuales.

55 En 2009, un grupo de científicos francés informó acerca del uso de una terapia génica mediada por células madre hematopoyéticas para tratar con éxito la adrenoleucodistrofia ligada a X (ALD). Se extrajeron células madre autólogas de los pacientes, se corrigieron genéticamente *ex vivo* y, a continuación, se volvieron a infundir en los pacientes después de haber recibido tratamiento mieloablativo. En un lapso de 24 a 30 meses de seguimiento, se detectó reconstitución policlonal, con un 9% a 14% de granulocitos, monocitos y linfocitos T y B que expresaban la proteína ALD. Estos resultados sugieren claramente que las células madre hematopoyéticas estaban transducidas en los pacientes. Comenzando de 14 a 16 meses después de la infusión de las células corregidas genéticamente, se detuvo la desmielinización cerebral progresiva en los dos pacientes. (Cartier *et al.*, 2009, Science, vol. 326, páginas 818-823).

65 Los recientes avances en el campo de la terapia génica han dado la esperanza de que los pacientes aquejados de hemoglobinopatías tales como la  $\beta$ -talasemia y la anemia drepanocítica se beneficien de los nuevos enfoques terapéuticos. El trasplante de células hematopoyéticas (HC) modificadas con vectores lentivirales que

portan el gen de  $\beta$ -globina ha dado como resultado la corrección a largo plazo de varios modelos en ratones de trastornos de la hemoglobina (Imren *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 2002; 99(22):14380-14385; Malik *et al.*, Ann NY Acad Sci. 2005; 1054:238-249; May *et al.*, Nature. 2000; 406(6791):82-86; Pawliuk *et al.*, Science. 2001; 294(5550):2368-2371), pero como contrapartida, ha conducido a la independencia transfusional en sólo un paciente  $\beta$ -talasémico (Cavazzana-Calvo *et al.*, Nature 2010; 467 (7313): 318-322).

Aunque las principales ventajas de infundir células autólogas genéticamente modificadas son evitar los riesgos de GVHD y el condicionamiento inmunosupresor antes del trasplante, así como abordar la falta de donantes compatibles, el tratamiento actual enfrenta al menos tres advertencias fundamentales: el requisito de mieloablación tóxica (Dunbar *et al.*, Hum Gene Ther. 1998; 9(17):2629-2640); los métodos actuales de transferencia génica no son capaces de transducir más de una fracción de células madre hematopoyéticas (HSC) (Santoni de Sio y Naldini, Methods Mol Biol 2009; 506:59-70); y las diversas estrategias de selección *in vivo* disponibles tienen eficacia y seguridad subóptimas (Beard *et al.*, J Clin Invest., 2010; 120(7):2345-2344; Cornetta *et al.*, Cáncer Gene Ther. 2006; 13(9):886-895; Milsom *et al.*, Cancer Res. 2008; 68(15):6171-6180). Por ejemplo, en los trastornos abordables mediante tratamiento con células madre hematopoyéticas, por ejemplo la drepanocitemia, la  $\beta$ -talasemia, la adrenoleucodistrofia y la adrenomieloneuropatía, las limitaciones incluyen, pero no se limitan a, la transducción ineficiente de las células madre o progenitoras hematopoyéticas, el requisito de tratamiento mielosupresor o mieloablato tóxico, y una falta de métodos óptimos para la selección *in vivo* de las células transducidas.

La WO 2004/098531 describe métodos de transducción viral usando sustratos transportadores ABC y/o inhibidores, Mostoslavsky et al. 2005. Mol Ther. 11,6: 932-940 describen protocolos de transducción lentiviral usando tratamiento con citoquinas. La WO 2010/054271 describe materiales y métodos para el injerto de células madre.

Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de métodos mejorados de terapia génica y, en particular, para el tratamiento o la prevención de trastornos hematopoyéticos. La presente invención ofrece soluciones a estos y otros problemas que afectan a la técnica.

## BREVE RESUMEN

La presente invención proporciona un método para aumentar la eficiencia de transducción de células madre o progenitoras hematopoyéticas cultivadas con un lentivirus que comprende: cultivar las células madre o progenitoras hematopoyéticas y el lentivirus en un medio de cultivo que comprende prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), o 16, 16-dimetil PGE<sub>2</sub>; en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas se cultivan en presencia de PGE<sub>2</sub> o 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> durante la transducción.

La presente divulgación proporciona en general métodos que comprenden un compuesto que aumenta la señalización de receptores EP de prostaglandinas para mejorar la eficiencia de transducción viral. Los métodos de la invención proporcionan adicionalmente métodos más seguros y fiables para transducir células, tales como células madre hematopoyéticas humanas (HSC), con virus y/o vectores virales. Los métodos son útiles para indicaciones terapéuticas tratables con terapias génicas de células madre hematopoyéticas.

En diversas formas de realización, la presente invención contempla, en parte, un método para aumentar la eficiencia de transducción de células cultivadas con un retrovirus que comprende cultivar las células y el retrovirus en un medio de cultivo que comprende uno o más compuestos que aumentan la señalización de receptores EP de prostaglandinas. En una forma de realización, el compuesto es una molécula pequeña.

En una forma de realización, las células son células madre o progenitoras.

En una forma de realización particular, las células madre o progenitoras están seleccionadas del grupo que consiste en: células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas.

En una forma de realización adicional, la célula madre o progenitora está seleccionada del grupo que consiste en: células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre neuronales, células madre retinianas, células madre de músculo cardíaco, células madre de músculo esquelético, células madre procedentes de tejido adiposo, células madre condrogénicas, células madre hepáticas, células madre renales y células madre pancreáticas.

De acuerdo con la invención, las células madre o progenitoras son células madre o progenitoras hematopoyéticas. En una forma de realización adicional divulgada en la presente, las células se seleccionan del grupo que consiste de: osteoblastos, condrocitos, adipocitos, músculo esquelético, músculo cardíaco, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann, células retinianas, células corneales, células de la piel, monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B, células NK, células gástricas, células intestinales, células de músculo liso, células vasculares, células de vejiga, células alfa pancreáticas, células beta pancreáticas, células delta pancreáticas, hepatocitos, células renales, células suprarrenales y células pulmonares.

De acuerdo con la invención, las células son células madre hematopoyéticas o progenitoras hematopoyéticas.

En una forma de realización, se transduce al menos aproximadamente el 50% de las células madre o progenitoras hematopoyéticas.

En otra forma de realización, se transduce al menos aproximadamente el 75% de las células madre o progenitoras hematopoyéticas.

En otra forma de realización, se transduce al menos aproximadamente el 90% de las células madre o progenitoras hematopoyéticas.

En formas de realización particulares, cualquiera de las composiciones o de los métodos divulgados en el presente documento, comprenden uno o más compuestos que aumentan la señalización de receptores EP de prostaglandinas seleccionados del grupo que consiste en: PGA<sub>2</sub>; PGB<sub>2</sub>; PGD<sub>2</sub>; PGE<sub>1</sub>; PGE<sub>2</sub>; PGF<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub>; PGH<sub>2</sub>; PGJ<sub>2</sub>; y precursores, metabolitos, derivados y análogos de los mismos.

En determinadas formas de realización, cualquiera de las composiciones o de los métodos divulgados en el presente documento, comprenden uno o más compuestos que aumentan la señalización de receptores EP de prostaglandinas seleccionados del grupo que consiste en: 15d-PGJ<sub>2</sub>; delta12-PGJ<sub>2</sub>; ácido 2-hidroxiheptadecatrienoico (HHT); tromboxano A<sub>2</sub>; tromboxano B<sub>2</sub>; iloprost; treprostinil; travoprost; carboprost trometamina; tafluprost; latanoprost; bimatoprost; unoprostona isopropilo; cloprostenol; Oestrophan; Superphan; misoprostol; butaprost; ácido linoleico; 13(s)-HODE; LY171883; ácido de Mead; ácido eicosatrienoico; ácido epoxieicosatrienoico; ONO-259; Cay1039; un agonista del receptor de PGE<sub>2</sub>; 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>; 19(R)-hidroxi PGE<sub>2</sub>; éster p-(p-acetamidobenzamido)fenílico de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>; 11-desoxi-16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>; 9-desoxi-9-metilen-16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>; 9-desoxi-9-metilen PGE<sub>2</sub>; sulprostona; serinolamida de PGE<sub>2</sub>; éster metílico de PGE<sub>2</sub>; 16-fenil tetranor PGE<sub>2</sub>; 15(S)-15-metil PGE<sub>2</sub>; 15(R)-15-metil PGE<sub>2</sub>; alcohol-A de Corey; alcohol-B de Corey; diol de Corey; BIO; 8-bromo-AMPC; forskolina; bapta-AM; fendilina; nicardipina; nifedipina; pimizida; estrofantidina; lanatósido; L-Arg; nitroprusiato sódico; vanadato sódico; bradiginina; mebeverina; flurandrenolida; atenolol; pindolol; gaboxadol; ácido cinurénico; hidralazina; tiabendazol; bicuculina; vesamicol; peruvósido; imipramina; clorpropamida; 1,5-pentametilentetrazol; 4-aminopiridina; diazóxido; benfotiamina; ácido 12-metoxidodecenoico; N-formil-Met-Leu-Phe; galamina; IAA 94; y clorotrianiseno.

En algunas formas de realización, cualquiera de las composiciones o de los métodos divulgados en el presente documento comprende uno o más compuestos que aumentan la señalización de receptores EP de prostaglandinas seleccionados del grupo que consiste en: prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) o 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>.

En formas de realización adicionales, cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento comprende adicionalmente cultivar las células y el retrovirus en presencia de un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC).

En una forma de realización, el inhibidor de HDAC está seleccionado del grupo que consiste en: tricotatina A (TSA), ácido valproico (VPA), butirato sódico, ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), fenilbutirato sódico, depsipéptido, trapoxina (TPX), péptido que contiene ácido hidroxámico cíclico 1 (CHAP1), MS-275, LBH589 y PXD-101.

En diversas formas de realización, cualquiera de las composiciones o de los métodos divulgados en el presente documento comprende un retrovirus que es un lentivirus.

En formas de realización particulares, cualquiera de las composiciones o de los métodos divulgados en el presente documento comprende un retrovirus que es un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

En determinadas formas de realización, cualquiera de las composiciones o de los métodos divulgados en el presente documento comprende un retrovirus seudotipificado con una proteína de la envoltura proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G).

En formas de realización adicionales, cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento comprende cultivar las células en presencia del compuesto que aumenta la señalización de receptores EP de prostaglandinas antes de la transducción.

En formas de realización particulares, las células se cultivan con el compuesto que aumenta la señalización de receptores EP de prostaglandinas durante al menos aproximadamente 2 horas.

En otras formas de realización, las células se cultivan con el compuesto que aumenta la señalización de receptores EP de prostaglandinas durante al menos aproximadamente 4 horas.

En determinadas formas de realización, las células se cultivan en presencia del compuesto que aumenta la señalización de receptores EP de prostaglandinas durante la transducción.

En otras formas de realización, las células se cultivan en presencia del compuesto que aumenta la señalización de receptores EP de prostaglandinas durante al menos aproximadamente veinticuatro horas.

En formas de realización adicionales, las células se cultivan en presencia del compuesto que aumenta la señalización de receptores EP de prostaglandinas durante las primeras veinticuatro horas de la transducción.

En algunas formas de realización, las células se cultivan en presencia del compuesto que aumenta la señalización de receptores EP de prostaglandinas durante las primeras cuarenta y ocho horas de la transducción.

En formas de realización particulares, cualquiera de las composiciones o de los métodos divulgados en el presente documento comprende un retrovirus que comprende un vector que comprende: una LTR retroviral izquierda (5'); una secuencia de control de la expresión operativamente unida a un gen de interés; y una LTR retroviral derecha (3').

En determinadas formas de realización, cualquiera de las composiciones o de los métodos divulgados en el presente documento comprende un retrovirus que comprende un vector que comprende: una LTR de VIH-1 izquierda (5'); una secuencia de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ); una región central del tracto de polipurina/"ADN flap" (cPPT/FLAP); un elemento de respuesta a Rev (RRE); un promotor de  $\beta$ -globina y una región controladora de locus (LCR) de  $\beta$ -globina operativamente unida a un gen de interés; y una LTR retroviral derecha (3') que comprende: uno o más elementos aisladores, o una secuencia poliA de  $\beta$ -globina de conejo (r $\beta$ gpA). En diversas formas de realización, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se administran a un paciente que padece una hemoglobinopatía.

En diversas formas de realización particulares, la hemoglobinopatía es la  $\beta$ -talasemia o la drepanocitemia.

En determinadas formas de realización, cualquiera de las composiciones o de los métodos divulgados en el presente documento comprende un vector que comprende: una LTR de VIH-1 izquierda (5'); una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ); una cPPT/FLAP; un RRE; un promotor de MND, unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido ABCD1 humano; una LTR de VIH-1 derecha (3'); y una secuencia de poliadenilación de  $\beta$ -globina de conejo. En diversas formas de realización determinadas, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se administran a un paciente que padece una adrenoleucodistrofia o una adrenomieloneuropatía.

En diversas formas de realización, el retrovirus es de replicación defectuosa.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DISTINTAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra los resultados de un cribado para seleccionar compuestos que promueven la transducción viral de células CD34+. Se descongelaron células CD34+ y se preestimularon con SCF, TPO, FltL e IL-3, y a continuación se transdujeron con el lentivirus GFP+. Las células se expusieron adicionalmente a factores solubles a concentraciones alta, media o baja (véase la Tabla 1) durante el periodo de preestimulación (0-24 horas) o durante el periodo de transducción (24-48 horas). A continuación, las células se lavaron y analizaron mediante citometría de flujo después de aproximadamente 1 semana en cultivo. Se determinó el porcentaje de células que eran GFP+ y se ilustra como un mapa de calor. El color gris representa aproximadamente el 45% de células transducidas, y el intervalo analítico fue del 0% (negro) hasta aproximadamente el 92% (blanco).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS IDENTIFICADORES DE SECUENCIAS

- La SEQ ID NO: 1 presenta una secuencia polinucleotídica de un ADNc de alfa globina humana.
- La SEQ ID NO: 2 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de alfa globina humana.
- La SEQ ID NO: 3 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de alfa globina de ratón.
- La SEQ ID NO: 4 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de alfa globina de rata.
- La SEQ ID NO: 5 presenta una secuencia polinucleotídica de un ADNc de beta globina humana.
- La SEQ ID NO: 6 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de beta globina humana.
- La SEQ ID NO: 7 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de beta globina humana mutante.
- La SEQ ID NO: 8 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de beta globina de ratón.
- La SEQ ID NO: 9 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de beta globina de rata.
- La SEQ ID NO: 10 presenta una secuencia polinucleotídica de un ADNc de gamma globina humana.
- La SEQ ID NO: 11 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de gamma globina humana.
- La SEQ ID NO: 12 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de gamma globina de ratón.
- La SEQ ID NO: 13 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de gamma globina de rata.
- La SEQ ID NO: 14 presenta una secuencia polinucleotídica de un ADNc de delta globina humana.

La SEQ ID NO: 15 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de delta globina humana.  
 La SEQ ID NO: 16 presenta una secuencia de ADNc que codifica un polinucleótido ACBD1.  
 La SEQ ID NO: 17 presenta una secuencia de ADNc que codifica un polinucleótido ACBD1.  
 La SEQ ID NO: 18 presenta una secuencia de aminoácidos de un polipéptido ACBD1.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### A. Visión de conjunto

La presente divulgación se refiere en general a composiciones de terapia génica mejoradas y a métodos para utilizarlas para tratar, prevenir o mejorar trastornos genéticos. Un desafío significativo para la terapia génica es aumentar la eficiencia de transducción de la célula que comprende el gen terapéutico que se suministrará a un sujeto, en el que las células corregidas no tienen una ventaja selectiva intrínseca con respecto a las células no transducidas.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que los nuevos métodos de transducción celular de la invención pueden utilizarse para expandir o aumentar el número de células terapéuticas, es decir, las células corregidas, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* para aumentar adicionalmente la eficacia de la terapia génica. Sin ánimo de limitarse a ninguna teoría en particular, la presente invención contempla, en parte, que al aumentar la eficiencia de transducción de las células, se generan más células corregidas por transducción y, por lo tanto, los métodos de terapia génica de la presente invención requieren la administración de un menor número de células para proporcionar criterios de valoración terapéuticos, preventivos o paliativos para los sujetos que reciben la terapia génica. Por otra parte, debido a que se suministra al paciente un mayor número de células transducidas, no se requiere necesariamente terapia mielosupresora o mieloablativa para alcanzar los criterios de valoración terapéuticos, preventivos o paliativos.

Por consiguiente, la presente invención aborda una necesidad clínica no satisfecha de mejorar la eficacia de la terapia génica en el tratamiento de enfermedades genéticas, por la que puede administrarse a un sujeto un mayor número de células terapéuticas dentro de una población de células transducidas para proporcionar un efecto terapéutico, preventivo o paliativo. La invención se refiere específicamente a métodos de transducción celular sorprendentemente eficaces y a células modificadas genéticamente para facilitar los resultados clínicos deseados para la terapia génica.

La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica, muchas de las cuales se describen más adelante con fines ilustrativos. Tales técnicas se explican íntegramente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición, 1989); Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); ADN Cloning: A Practical Approach, vol. I y II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames y S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames y S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal, ed., 1984).

### B. Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entienden los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Para los fines de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "retrovirus" se refiere a un virus de ARN que somete a transcripción inversa su ARN genómico para dar una copia de ADN bicatenario lineal y posteriormente integra covalentemente su ADN genómico en un genoma hospedador. Los retrovirus son una herramienta común para la transferencia génica (Miller, 2000, Nature 357: 455-460). Una vez que el virus se ha integrado en el genoma del hospedador, se lo denomina "provirus". El provirus hace de molde para la ARN polimerasa II y dirige la expresión de las moléculas de ARN que codifican las proteínas estructurales y las enzimas necesarias para producir nuevas partículas virales.

Los retrovirus ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV), virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia del mono gibbon, virus de la leucemia felina (FLV), espumavirus, virus de la leucemia murina de Friend, virus de las células madre murinas (MSCV) y virus del sarcoma de Rous (RSV) y lentivirus.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "lentivirus" se refiere a un grupo (o género) de retrovirus complejos. Los lentivirus ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: VIH (virus de la inmunodeficiencia humana, incluidos el VIH tipo 1 y el VIH tipo 2); virus Visna-Maedi (VMV); virus de la artritis-encefalitis caprina

(CAEV); virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); virus de la inmunodeficiencia felina (FIV); virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV). En una forma de realización, resultan preferentes los esqueletos de vectores basados en VIH (es decir, elementos de secuencia que actúan en cis del VIH).

Pueden utilizarse vectores retrovirales y, más concretamente, vectores lentivirales en la puesta en práctica de la presente invención. Por consiguiente, el término "retrovirus" o la expresión "vector retroviral", tal como se utilizan en el presente documento, pretenden incluir "lentivirus" y "vectores lentivirales", respectivamente.

El término "vector" se utiliza en el presente documento para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido está generalmente unido a, por ejemplo insertado en, la molécula de ácido nucleico vectora. Un vector puede incluir secuencias que dirigen la replicación autónoma en una célula, o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula hospedadora. Los vectores útiles incluyen, por ejemplo, plásmidos (por ejemplo, plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), transposones, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos y vectores virales. Los vectores virales útiles incluyen, por ejemplo, lentivirus y retrovirus de replicación defectuosa.

Como resultará evidente para un experto en la materia, la expresión "vector viral" se utiliza ampliamente para referirse a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido de transferencia) que incluye elementos de ácido nucleico de origen viral que por lo general facilitan la transferencia de la molécula de ácido nucleico o la integración en el genoma de una célula, o a una partícula viral que interviene en la transferencia del ácido nucleico. Las partículas virales incluirán por lo general diversos componentes virales y a veces también componentes de la célula hospedadora además del ácido o los ácidos nucleicos.

La expresión "vector viral" puede referirse a un virus o a una partícula viral capaz de transferir a una célula un ácido nucleico o al propio ácido nucleico transferido. Los vectores virales y los plásmidos de transferencia contienen elementos genéticos estructurales y/o funcionales derivados principalmente de un virus. La expresión "vector retroviral" se refiere a un plásmido o vector viral que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de los mismos, derivados principalmente de un retrovirus. La expresión "vector lentiviral" se refiere a un plásmido o vector viral que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de los mismos, incluidas las LTR, derivados principalmente de un lentivirus. El término "híbrido" se refiere a un vector, una LTR u otro ácido nucleico que contiene secuencias tanto retrovirales, por ejemplo, lentivirales, como secuencias virales no lentivirales. En una forma de realización, un vector híbrido se refiere a un vector o plásmido de transferencia que comprende secuencias retrovirales, por ejemplo, lentivirales, para la transcripción inversa, la replicación, la integración y/o el empaquetado.

En formas de realización particulares, las expresiones "vector lentiviral", "vector de expresión lentiviral" pueden utilizarse para referirse a plásmidos de transferencia lentivirales y/o a partículas lentivirales infecciosas. Cuando se hace referencia en el presente documento a elementos tales como sitios de clonación, promotores, elementos reguladores, ácidos nucleicos heterólogos, etc., debe entenderse que las secuencias de estos elementos se encuentran presentes en forma de ARN en las partículas lentivirales útiles en los métodos de la invención y se encuentran presentes en forma de ADN en los plásmidos de ADN útiles en los métodos de la invención.

En cada extremo del provirus hay estructuras denominadas "repeticiones terminales largas" o "LTR". La expresión "repeticiones terminales largas (LTR)" se refiere a dominios de pares de bases situados en los extremos de los ADN retrovirales que, en su contexto de la secuencia natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5. Las LTR proporcionan generalmente funciones fundamentales para la expresión de los genes retrovirales (por ejemplo, la promoción, la iniciación y la poliadenilación de los transcritos génicos) y para la replicación viral. La LTR contiene numerosas señales reguladoras que incluyen elementos de control de la transcripción, señales de poliadenilación y secuencias necesarias para la replicación e integración del genoma viral. La LTR viral se divide en tres regiones denominadas U3, R y U5. La región U3 contiene los elementos potenciador y promotor. La región U5 es la secuencia entre el sitio de unión del cebador y la región R, y contiene la secuencia de poliadenilación. La región R (repeticiones) está flanqueada por las regiones U3 y U5. La LTR está compuesta por las regiones U3, R y U5 y aparece en ambos extremos 5' y 3' del genoma viral. Adyacentes a la LTR 5' hay secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión del cebador de ARNt) y para el empaquetamiento eficaz del ARN viral en las partículas (el sitio Psi).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "señal de empaquetamiento" o "secuencia de empaquetamiento" se refiere a secuencias situadas dentro del genoma retroviral que son necesarias para la inserción del ARN viral en la partícula o cápside viral, véase por ejemplo Clever *et al.* 1995. J. of Virology, vol. 69, nº 4; págs. 2101-2109. Varios vectores retrovirales utilizan la señal de empaquetamiento mínima (también denominada secuencia psi [Ψ] o [Ψ<sup>+</sup>]) necesaria para la encapsidación del genoma viral. Por lo tanto, tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "secuencia de empaquetamiento", "señal de empaquetamiento", el término "psi" y el símbolo "Ψ", se utilizan en referencia a la secuencia no codificante necesaria para la encapsidación de las cadenas de ARN retrovirales durante la formación de las partículas virales.

En diversas formas de realización, los vectores comprenden LTR 5' y/o LTR 3' modificadas. Con frecuencia se realizan modificaciones de la LTR 3' para mejorar la seguridad de los sistemas lentivirales o retrovirales haciendo que los virus sean de replicación defectuosa. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “de replicación defectuosa” se refiere a un virus que no es capaz de realizar una replicación completa y eficaz, de manera que no se producen viriones infecciosos (por ejemplo, descendencia lentiviral de replicación defectuosa). La expresión “de replicación competente” se refiere a un virus silvestre o a un virus mutante que es capaz de replicarse, de manera que la replicación viral del virus es capaz de producir viriones infecciosos (por ejemplo, descendencia lentiviral de replicación competente).

Vectores “autoinactivantes” (SIN) se refiere a vectores de replicación defectuosa, por ejemplo, vectores retrovirales o lentivirales, en los que se ha modificado la región potenciadora-promotora de la LTR derecha (3'), conocida como región U3 (por ejemplo, por delección y/o sustitución) para impedir la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. Esto se debe a que la región U3 de la LTR derecha (3') se utiliza como plantilla para la región U3 de la LTR izquierda (5') durante la replicación viral y, por lo tanto, la transcripción viral no puede hacerse sin el potenciador-promotor U3. En una forma de realización adicional de la divulgación, la LTR 3' se modifica de manera que la región U5 se sustituye, por ejemplo, con una secuencia poli(A) heteróloga o sintética, uno o más elementos aisladores y/o un promotor inducible. Cabe señalar que en la divulgación también se incluyen modificaciones en las LTR tales como modificaciones en la LTR 3', en la LTR 5' o en las LTR 3' y 5'.

Se proporciona una mejora adicional de la seguridad sustituyendo la región U3 de la LTR 5' con un promotor heterólogo para inducir la transcripción del genoma viral durante la producción de partículas virales. Los ejemplos de promotores heterólogos que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, los promotores virales de virus de simio 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tardío), citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, temprano inmediato), virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus del sarcoma de Rous (RSV) y virus del herpes simple (HSV) (timidina quinasa). Los promotores típicos son capaces de inducir altos niveles de transcripción de manera independiente de Tat. Esta sustitución reduce la posibilidad de recombinación para generar virus de replicación competente porque no hay una secuencia U3 completa en el sistema de producción de virus. En determinadas formas de realización, el promotor heterólogo puede ser inducible, de manera que la transcripción de la totalidad o de parte del genoma viral se produzca sólo cuando se encuentren presentes uno o más factores de inducción. Los factores de inducción incluyen, pero no se limitan a, uno o más compuestos químicos o condiciones fisiológicas, por ejemplo, de temperatura o de pH, en las que se cultivan las células hospedadoras.

En algunas formas de realización, los vectores virales comprenden un elemento TAR. El término “TAR” se refiere al elemento genético “de respuesta a la transactivación” que se encuentra en la región R de las LTR lentivirales (por ejemplo, VIH). Este elemento interactúa con el elemento genético transactivador lentiviral (tat) para potencia la replicación viral. Sin embargo, este elemento no es necesario en las formas de realización en las que la región U3 de la LTR 5' se sustituye por un promotor heterólogo.

La “región R” se refiere a la región dentro de las LTR retrovirales que comienza en el inicio del grupo de formación de la caperuza (es decir, el inicio de la transcripción) y que termina inmediatamente antes del inicio del tramo poliA. La región R también se define como flanqueada por las regiones U3 y U5. La región R es importante durante la transcripción inversa, pues permite la transferencia del ADN naciente de un extremo del genoma al otro.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “elemento FLAP” se refiere a un ácido nucleico cuya secuencia incluye la región central del tracto de polipurina y las secuencias de terminación centrales (cPPT y CTS) de un retrovirus, por ejemplo, VIH-1 o VIH-2. Se describen elementos FLAP adecuados en la patente estadounidense nº 6.682.907 y en Zennou, *et al.*, 2000, Cell, 101:173. Durante la transcripción inversa del VIH-1, la iniciación central del ADN de cadena positiva en la región central del tracto de polipurina (cPPT) y la terminación central en la secuencia de terminación central (CTS) conducen a la formación de una estructura de ADN tricatenario: el “ADN flap” (DNA flap) central del VIH-1. Sin desear limitarse a teoría alguna, el “ADN flap” puede actuar como un determinante con actividad in cis de importación nuclear del genoma lentiviral y/o puede aumentar el título del virus. En formas de realización particulares, los esqueletos de vectores retrovirales o lentivirales comprenden uno o más elementos FLAP cadena arriba o cadena abajo de los genes heterólogos de interés en los vectores. Por ejemplo, en formas de realización particulares, un plásmido de transferencia incluye un elemento FLAP. En una forma de realización, un vector útil en los métodos de la invención comprende un elemento FLAP aislado a partir del VIH-1.

En una forma de realización, los vectores de transferencia retrovirales o lentivirales comprenden uno o más elementos de exportación. La expresión “elemento de exportación” se refiere a un elemento regulador postranscripcional que actúa in cis que regula el transporte de un transcrito de ARN desde el núcleo hasta el citoplasma de una célula. Los ejemplos de elementos de exportación de ARN incluyen, pero no se limitan a, el elemento de respuesta a Rev (RRE) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (véase, por ejemplo, Cullen *et al.*, 1991. J. Virol. 65: 1053; y Cullen *et al.*, 1991. Cell 58: 423), y el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis B (HPRE). En general, el elemento de exportación de ARN está situado dentro de la 3'-UTR de un gen, y puede insertarse como una o varias copias.

En formas de realización particulares, la expresión de secuencias heterólogas en vectores virales se aumenta incorporando en los vectores elementos reguladores postranscripcionales, sitios de poliadenilación eficaz, y opcionalmente, señales de terminación de la transcripción. Diversos elementos reguladores postranscripcionales pueden aumentar la expresión de un ácido nucleico heterólogo a nivel de proteína, por ejemplo, el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE; Zufferey *et al.*, 1999, J. Virol., 73:2886); el elemento regulador postranscripcional presente en el virus de la hepatitis B (HPRE) (Huang y Yen, 1995, Mol. Cell. Biol., 5:3864); y similares (Liu *et al.*, 1995, Genes Dev., 9:1766). En formas de realización particulares, los vectores útiles en los métodos de la invención carecen de, o no comprenden, un elemento regulador postranscripcional tal como un WPRE o HPRE porque en algunos casos, estos elementos aumentan el riesgo de transformación celular y/o no aumentan sustancial o significativamente la cantidad de transcrito de ARNm ni aumentan la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, en algunas formas de realización, los vectores útiles en los métodos de la invención carecen de, o no comprenden, un WPRE o HPRE, como medida de seguridad adicional.

Los elementos que dirigen la terminación y poliadenilación eficaces de los transcritos de ácidos nucleicos heterólogos aumentan la expresión del gen heterólogo. Las señales de terminación de la transcripción se encuentran generalmente cadena abajo de la señal de poliadenilación. La expresión "sitio poliA" o "secuencia poliA", tal como se utiliza en el presente documento, indica una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación del transcrito de ARN naciente por la ARN polimerasa II. Resulta deseable la poliadenilación eficaz del transcrito recombinante, ya que los transcritos que carecen de una cola poliA son inestables y se degradan rápidamente. Los ejemplos ilustrativos de señales poliA que pueden utilizarse en un vector, útiles en los métodos de la invención, incluyen una secuencia poliA ideal (por ejemplo, AATAAA, ATTAAA AGTAAA), una secuencia poliA de la hormona del crecimiento bovino (BGHPA), una secuencia poliA de la  $\beta$ -globina de conejo (rBgpA) u otra secuencia poliA heteróloga o endógena adecuada conocida en la técnica.

En determinadas formas de realización, un vector retroviral o lentiviral comprende adicionalmente uno o más elementos aisladores. Los elementos aisladores pueden contribuir a proteger las secuencias expresadas por lentivirus, por ejemplo, polipéptidos terapéuticos, frente a los efectos del sitio de integración, que pueden estar mediadas por elementos que actúan en cis presentes en el ADN genómico y que conducen a la expresión desregulada de las secuencias transferidas (es decir, efecto de posición, véase, por ejemplo, Burgess-Beusse *et al.*, 2002, Proc. Natl Acad. Sci., EE.UU., 99:16433; y Zhan *et al.*, 2001, Hum. Genet., 109:471). En algunas formas de realización, los vectores de transferencia comprenden uno o más elementos aisladores en la LTR 3' y tras la integración del provirus en el genoma hospedador, el provirus comprende el uno o más elementos aisladores en la LTR 5' o en la LTR 3', en virtud de la duplicación de la LTR 3'. Los elementos aisladores adecuados para utilizarse en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan al elemento aislador de  $\beta$ -globina de pollo (véase Chung *et al.*, 1993, Cell 74:505; Chung *et al.*, 1997, PNAS 94:575; y Bell *et al.*, 1999, Cell 98:387). Los ejemplos de elementos aisladores incluyen, pero no se limitan a, un elemento aislador de un locus de la  $\beta$ -globina, tal como HS4 de pollo.

Según determinadas formas de realización específicas de la invención, la mayoría o la totalidad de las secuencias del esqueleto del vector viral proceden de un lentivirus, por ejemplo, el VIH-1. Sin embargo, debe entenderse que pueden utilizarse muchas fuentes diferentes de secuencias lentivirales, y que pueden tener cabida numerosas sustituciones y modificaciones en algunas de las secuencias lentivirales sin afectar a la capacidad de un vector de transferencia para realizar las funciones descritas en el presente documento. Por otra parte, en la técnica se conocen diversos vectores lentivirales, véase Naldini *et al.*, (1996a, 1996b y 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, patentes estadounidenses nº 6.013.516 y nº 5.994.136, muchos de los cuales pueden adaptarse para producir un vector viral o plásmido de transferencia útil en los métodos de la presente invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "compuesto" abarca moléculas orgánicas pequeñas, prostaglandinas, potenciadores de AMPc, agonistas de la vía Wnt, agonistas de la vía AMPc/PI3K/AKT, agonistas de la vía del segundo mensajero  $\text{Ca}^{2+}$ , agonistas de la señalización del óxido nítrico (NO)/angiotensina y productos químicos inorgánicos, incluidos sin limitación, todos los análogos y derivados de los mismos.

Una "molécula pequeña", "molécula orgánica pequeña" o "compuesto de molécula pequeña" se refiere a un compuesto de bajo peso molecular con un peso molecular inferior a aproximadamente 5 kD, inferior a aproximadamente 4 kD, inferior a aproximadamente 3 kD, inferior a aproximadamente 2 kD, inferior a aproximadamente 1 kD o inferior a aproximadamente 0,5 kD. En formas de realización particulares, las moléculas pequeñas pueden incluir ácidos nucleicos, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, otros fármacos o compuestos orgánicos pequeños, y similares. Las bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas, tales como extractos de hongos, bacterias o algas, son conocidas en la técnica y pueden cribarse con cualquiera de los ensayos de la divulgación. Pueden encontrarse ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares en: (Carell *et al.*, 1994a; Carell *et al.*, 1994b; Cho *et al.*, 1993; DeWitt *et al.*, 1993; Gallop *et al.*, 1994; Zuckermann *et al.*, 1994).

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (Houghten *et al.*, 1992) o en perlas (Lam *et al.*, 1991), en matrices (Fodor *et al.*, 1993), bacterias, esporas (Ladner *et al.*, patente estadounidense nº 5.223.409, 1993), plásmidos (Cull *et al.*, 1992) o en fagos (Cwirla *et al.*, 1990; Devlin *et al.*, 1990; Felici *et al.*, 1991; Ladner *et*

*al.*, patente estadounidense nº 5.223.409, 1993; Scott y Smith, 1990). La invención divulgada en el presente documento abarca el uso de diferentes bibliotecas para la identificación de moléculas pequeñas que aumentan la señalización de los receptores EP de prostaglandinas en cualquier punto de la vía de señalización celular. Las bibliotecas útiles para los fines de la invención incluyen, pero no se limitan a, (1) bibliotecas químicas, (2) bibliotecas de productos naturales y (3) bibliotecas combinatorias que comprenden oligonucleótidos, moléculas orgánicas y/o péptidos aleatorios.

Las bibliotecas químicas consisten en análogos estructurales y derivados de compuestos conocidos o compuestos que se identifican como "hits" o "leads" mediante el cribado de productos naturales. Las bibliotecas de productos naturales se derivan de colecciones de microorganismos, animales, plantas u organismos marinos que se utilizan para crear mezclas para el cribado mediante: (1) fermentación y extracción de caldos de microorganismos marinos, vegetales o del suelo (2) extracción de plantas u organismos marinos. Las bibliotecas de productos naturales incluyen policétidos, péptidos no ribosómicos, y variantes (de origen no natural) de los mismos. Para una revisión, véase, Cane, D.E., *et al.*, (1998) *Science* 282:63-68. Las bibliotecas combinatorias están compuestas por un gran número de péptidos, oligonucleótidos o compuestos orgánicos como una mezcla. Son relativamente fáciles de preparar mediante los métodos de síntesis automatizada tradicionales, PCR, clonación o métodos de síntesis patentados. Resultan de especial interés las bibliotecas combinatorias de péptidos y oligonucleótidos.

Más concretamente, una biblioteca química combinatoria es un conjunto de diversos compuestos químicos generados mediante síntesis química o mediante síntesis biológica, combinando varias "unidades estructurales" químicas, tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca de polipéptidos se forma combinando un conjunto de unidades estructurales químicas (aminoácidos) en cada forma posible para una determinada longitud de compuesto (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Pueden sintetizarse millones de compuestos químicos mediante dicha mezcla combinatoria de unidades estructurales químicas.

Para una revisión de la química combinatoria y las bibliotecas creadas a partir de la misma, véase Huc, I. y Nguyen, R. (2001) *Comb. Chem. High Throughput Screen* 4: 53-74; Lepre, C.A. (2001) *Drug Discov. Today* 6:133-140; Peng, S.X. (2000) *Biomed. Chromatogr.* 14:430-441; Bohm, H.J. y Stahl, M. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:283-286; Barnes, C. y Balasubramanian, S. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:346-350; Lepre, Enjalbal, C., *et al.*, (2000) *Mass Spectrom. Rev.* 19:139-161; Hall, D.G., (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:262-262; Lazo, J.S., y Wipf, P. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293:705-709; Houghten, R.A., (2000) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:273-282; Kobayashi, S. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2000) 4:338-345; Kopylov, A.M. y Spiridonova, V.A. (2000) *Mol. Biol. (Mosk)* 34:1097-1113; Weber, L. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:295-302; Dolle, R.E. (2000) *J. Comb. Chem.* 2:383-433; Floyd, C.D., *et al.*, (1999) *Prog. Med. Chem.* 36:91-168; Kundu, B., *et al.*, (1999) *Prog. Drug Res.* 53:89-156; Cabilly, S. (1999) *Mol. Biotechnol.* 12:143-148; Lowe, G. (1999) *Nat. Prod. Rep.* 16:641-651; Dolle, R.E. y Nelson, K.H. (1999) *J. Comb. Chem.* 1:235-282; Czarnick, A.W. y Keene, J.D. (1998) *Curr. Biol.* 8:R705-R707; Dolle, R.E. (1998) *Mol. Divers.* 4:233-256; Myers, P.L., (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:701-707; y Pluckthun, A. y Cortese, R. (1997) *Biol. Chem.* 378:443.

Se dispone de dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias en el mercado (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.). Además, se dispone a su vez de numerosas bibliotecas combinatorias en el mercado (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscú, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, Mo., ChemStar, Ltd., Moscú, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Biosciences, Columbia, Md., etc.).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "precursor metabólico" se refiere a una forma de un compuesto que se metaboliza hasta un compuesto deseado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "metabolito" se refiere a una forma resultado de un compuesto que ha sido metabolizado.

En referencia a los productos químicos, tales como productos químicos orgánicos, "análogo" o "derivado" se refiere a una molécula química que es similar a otra sustancia química en estructura y función, difiriendo con frecuencia estructuralmente en un solo elemento o grupo, pero que puede diferir por modificación de más de un grupo (por ejemplo, 2, 3 o 4 grupos) si conserva la misma función que el producto químico precursor. Tales modificaciones son rutinarias para los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo, restos químicos adicionales o sustituidos, tales como ésteres o amidas de un ácido, grupos protectores tales como un grupo bencilo para un alcohol o tiol, y grupos terc-butoxicarbonilo para una amina. También se incluyen modificaciones en las cadenas laterales alquilo, tales como sustituciones alquilo (por ejemplo, metilo, dimetilo, acetato, etc.), modificaciones en el nivel de saturación o insaturación de las cadenas laterales, y la adición de grupos modificados tales como fenoxi y fenilo sustituido. Los derivados también pueden incluir conjugados, tales como restos biotina o avidina, enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante y similares, y que incluyen restos marcados radiactivamente, bioluminiscentes, quimioluminiscentes o fluorescentes. Además, pueden añadirse restos a los agentes descritos en

el presente documento para modificar sus propiedades farmacocinéticas, tal como para aumentar la semivida *in vivo* o *ex vivo*, o para aumentar sus propiedades de penetración celular, entre otras propiedades deseables. También se incluyen los profármacos, que se sabe potencian numerosas cualidades deseables de los productos farmacéuticos (por ejemplo, la solubilidad, la biodisponibilidad, la fabricación, etc.) (véase, por ejemplo, el documento WO/2006/047476 para profármacos agonistas de EP ejemplares).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “polinucleótido” o la expresión “ácido nucleico” se refieren a ARN mensajero (ARNm), ARN, ARN genómico (ARNg), ARN de cadena positiva (ARN(+)), ARN de cadena negativa (ARN(-)), ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc) o ADN. Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios. Preferentemente, los polinucleótidos útiles en los métodos de la invención incluyen polinucleótidos o variantes que tienen al menos aproximadamente una identidad de secuencia del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en el presente documento (véase, por ejemplo, el listado de secuencias), por lo general en los que la variante mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia. En diversas formas de realización ilustrativas, los métodos de la presente invención contemplan, en parte, secuencias polinucleotídicas del plásmido de transferencia y del vector viral, y composiciones que las comprenden. En formas de realización particulares, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos terapéuticos y/u otros genes de interés. En formas de realización particulares, la presente divulgación proporciona polinucleótidos que codifican un polipéptido globina o un polipéptido casete de unión a ATP, subfamilia D (ALD), miembro 1 (ABCD1), como se analiza en otra parte del presente documento.

Tal como se utilizan en el presente documento, la expresión “variante polinucleotídica” y el término “variante”, y similares, se refieren a polinucleótidos que presentan una identidad de secuencia sustancial con una secuencia polinucleotídica de referencia o a polinucleótidos que hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen más adelante. Estos términos y expresiones incluyen polinucleótidos en los que uno o más nucleótidos se han añadido o delecionado, o sustituido con diferentes nucleótidos en comparación con un polinucleótido de referencia. En este sentido, se entiende bien en la técnica que pueden realizarse determinadas modificaciones que incluyen mutaciones, adiciones, delecciones y sustituciones en un polinucleótido de referencia por las cuales el polinucleótido modificado conserve la actividad o función biológica del polinucleótido de referencia.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “aislado” se refiere a material, por ejemplo, un polinucleótido, un polipéptido, una célula, que carece sustancial o esencialmente de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. En formas de realización particulares, el término “obtenido” o “derivado” se utiliza como sinónimos de “aislado”. Por ejemplo, un “polinucleótido aislado”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polinucleótido que ha sido purificado a partir de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que ha sido extraído de las secuencias que son normalmente adyacentes al fragmento.

Los términos que describen la orientación de los polinucleótidos incluyen: 5' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo fosfato libre) y 3' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo hidroxilo (OH) libre). Las secuencias polinucleotídicas pueden anotarse en la orientación 5' a 3' o en la orientación 3' a 5'.

Los términos “complementario” y “complementariedad” se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia nucleotídica) relacionados por las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la cadena complementaria de la secuencia de ADN 5'AGTCATG3' es 3'TCAGTAC5'. Esta última secuencia se escribe con frecuencia como el complemento inverso con el extremo 5' a la izquierda y el extremo 3' a la derecha, 5'CATGACT3'. Una secuencia que es igual a su complemento inverso se dice que es una secuencia palindrómica. La complementariedad puede ser “parcial”, en la que sólo algunas de las bases de los ácidos nucleicos están apareadas según las reglas de apareamiento de bases. O puede haber complementariedad “completa” o “total” entre los ácidos nucleicos.

La expresión “casete de ácido nucleico”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a secuencias genéticas dentro del vector que pueden expresar un ARN, y posteriormente un polipéptido. En una forma de realización, el casete de ácido nucleico contiene un(os) gen(es)-de-interés, por ejemplo, un(os) polinucleótido(s)-de-interés. En otra forma de realización, el casete de ácido nucleico contiene una o más secuencias de control de la expresión y un(os) gen(es)-de-interés, por ejemplo, un(os) polinucleótido(s)-de-interés. Los vectores pueden comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o más casetes de ácido nucleico. El casete de ácido nucleico está orientado posicional y secuencialmente dentro del vector de manera que el ácido nucleico en el casete pueda ser transcrito a ARN, y cuando sea necesario, traducido a proteína o polipéptido, experimentar modificaciones postraduccionales apropiadas necesarias para la actividad en la célula transformada, y ser translocado al compartimiento apropiado para la actividad biológica dirigiéndose a los compartimentos intracelulares apropiados o secretándose a los compartimentos extracelulares. Preferentemente, el casete tiene sus extremos 3' y 5' adaptados para insertarse fácilmente en un vector, por ejemplo, tiene sitios de endonucleasas de restricción en cada extremo. En una forma de realización preferente de los métodos de la invención, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de un gen

terapéutico utilizado para tratar, prevenir o mejorar un trastorno genético, tal como un trastorno hematopoyético. El casete puede extraerse e insertarse en un plásmido o vector viral como una sola unidad.

Los polinucleótidos incluyen un(os) polinucleótido(s)-de-interés. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "polinucleótido(s)-de-interés" se refiere a uno o más polinucleótidos, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un polipéptido (es decir, un polipéptido-de-interés), insertado en un vector de expresión que se desea sea expresado. En formas de realización preferentes, los vectores y/o plásmidos útiles en los métodos de la presente invención comprenden uno o más polinucleótidos-de-interés, por ejemplo, un gen de globina o el gen ABCD1. En determinadas formas de realización, un polinucleótido-de-interés codifica un polipéptido que proporciona un efecto terapéutico en el tratamiento, la prevención o la mejoría de una enfermedad o trastorno hematopoyético, que puede denominarse "polipéptido terapéutico", por ejemplo, un gen de globina. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n° 6.051.402 y n° 7.901.671. Véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1, 5, 10 y 14.

En otras determinadas formas de realización, un polinucleótido-de-interés codifica un polipéptido que proporciona un efecto terapéutico en el tratamiento, la prevención o la mejoría de una adrenoleucodistrofia o adrenomieloneuropatía, que puede denominarse "polipéptido terapéutico", por ejemplo, un gen ABCD1. Véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO: 16-17. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n° 5.869.039 y n° 6.013.769.

El término "globina", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a todas las proteínas o subunidades proteicas que son capaces de unirse covalentemente o no covalentemente a un resto hemo y que, por lo tanto, pueden transportar o almacenar oxígeno. El término "globina" incluye subunidades de hemoglobinas de vertebrados y de invertebrados, mioglobinas de vertebrados y de invertebrados, o mutantes de las mismas. Los ejemplos de globinas incluyen  $\alpha$ -globina o variante de la misma,  $\beta$ -globina o variante de la misma, una  $\gamma$ -globina o una variante de la misma, y  $\delta$ -globina o una variante de la misma.

En una forma de realización, el polinucleótido-de-interés es un gen que codifica un polipéptido que proporciona una función terapéutica para el tratamiento de una hemoglobinopatía, por ejemplo,  $\alpha$ -globina,  $\beta$ -globina o  $\beta$ -globina-T87Q. Los polinucleótidos-de-interés, y los polipéptidos codificados a partir de los mismos, incluyen tanto polinucleótidos que codifican polipéptidos silvestres como fragmentos y variantes funcionales de los mismos. En formas de realización particulares, una variante funcional tiene una identidad de al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, o al menos un 99% con una secuencia polipeptídica o polinucleotídica de referencia silvestre correspondiente. En determinadas formas de realización, un fragmento o variante funcional tiene al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos el 100%, o al menos un 110%, o más, de una actividad biológica de un polipéptido silvestre correspondiente. Las secuencias polinucleotídicas representativas adecuadas para utilizarse en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos que codifican  $\alpha$ -globina,  $\beta$ -globina y  $\beta$ -globina-T87Q.

Los polinucleótidos de la presente divulgación, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores y/o potenciadores, regiones no traducidas (UTR), secuencias de Kozak, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), sitios de reconocimiento de recombinasas (por ejemplo, sitios LoxP, FRT y Att), codones de terminación, señales de terminación de la transcripción, y polinucleótidos que codifican polipéptidos de autoescisión, epítopos de identificación, como se divulga en otra parte del presente documento o como se conoce en la técnica, de manera que su longitud global puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que pueda emplearse un fragmento polinucleotídico de casi cualquier longitud, estando la longitud total limitada preferentemente por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante previsto.

La expresión "secuencia de control de la expresión" se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende uno o más promotores, potenciadores, u otros elementos de control de la transcripción o combinaciones de los mismos que son capaces de dirigir, aumentar, regular o controlar la transcripción o la expresión de un polinucleótido unido operativamente. En formas de realización particulares, los vectores de la divulgación comprenden una o más secuencias de control de la expresión que son específicas de células, tipos celulares o linajes celulares concretos, por ejemplo, células diana; es decir, la expresión de los polinucleótidos unidos operativamente a una secuencia de control de la expresión específica de células, tipos celulares o linajes celulares concretos se produce en las células diana y no en otras células no diana. Cada una de las una o más secuencias de control de la expresión en un vector que son específicas de célula puede expresarse en tipos celulares iguales o diferentes dependiendo del tratamiento deseado. En formas de realización preferentes, los vectores comprenden una o más secuencias de control de la expresión específicas de las células hematopoyéticas, por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas. En otras formas de realización preferentes, los vectores comprenden una o más secuencias de control de la expresión específicas de las células eritroides.

El término "promotor", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un sitio de reconocimiento de un polinucleótido (ADN o ARN) al que se une una ARN polimerasa. El término "potenciador" se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar una transcripción potenciada y en algunos

casos puede funcionar con independencia de su orientación con respecto a otra secuencia de control. Un potenciador puede funcionar de manera cooperativa o aditiva con promotores y/o otros elementos potenciadores. El término “promotor/potenciador” se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar ambas funciones promotora y potenciadora.

En formas de realización particulares, un vector de la divulgación comprende secuencias de control exógenas, endógenas o heterólogas tales como promotores y/o potenciadores. Una secuencia de control “endógena” es aquella que está naturalmente unida a un determinado gen en el genoma. Una secuencia de control “exógena” es aquella que está situada en yuxtaposición a un gen mediante manipulación genética (es decir, técnicas de biología molecular) de manera que la transcripción de ese gen esté dirigida por el potenciador/promotor unido. Una secuencia de control “heteróloga” es una secuencia exógena que pertenece a una especie diferente a la célula que se está manipulado genéticamente. Una secuencia de control “sintética” puede comprender elementos de una o más secuencias exógenas y/o endógenas, y/o secuencias determinadas *in vitro* o *in silico* que proporcionan actividad promotora y/o potenciadora óptima para la terapia génica particular.

La expresión “operativamente unido”, se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. En una forma de realización, la expresión se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor y/o potenciador u otra secuencia de control de la expresión) y una segunda secuencia polinucleotídica, por ejemplo, un polinucleótido-de-interés, en la que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “secuencia de control de la expresión constitutiva” se refiere a un promotor, potenciador o promotor/potenciador que permite de manera constante o continua la transcripción de una secuencia unida operativamente. Una secuencia de control de la expresión constitutiva puede ser un promotor, potenciador o promotor/potenciador “ubícuo” que permite la expresión en una gran diversidad de tipos de células y tejidos o un promotor, potenciador, o promotor/potenciador “específico de célula”, “específico de tipo de célula”, “específico de estirpe celular” o “específico de tejido”, que permite la expresión en una diversidad limitada de tipos de células y tejidos, respectivamente. Las secuencias de control de la expresión ubicuas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un promotor viral del virus de simio 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tardío), un promotor de LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), una LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor del virus del herpes simple (HSV) (timidina quinasa), promotores H5, P7.5 y P11 del virus vaccinia, un promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1a), respuesta de crecimiento precoz 1 (EGR1), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de iniciación de la traducción eucariota 4A1 (EIF4A1), proteína 5 de choque térmico de 70 kDa (HSPA5), proteína de choque térmico de 90 kDa beta, miembro 1 (HSP90B1), proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70),  $\beta$ -quinesina ( $\beta$ -KIN), el locus ROSA26 humano (Irions *et al.*, (2007) Nature Biotechnology 25, 1477-1482), un promotor de ubiquitina C (UBC), un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un potenciador de citomegalovirus/promotor de  $\beta$ -actina de pollo (CAG) y un promotor de  $\beta$ -actina.

En una forma de realización particular, puede resultar deseable utilizar una secuencia de control de la expresión específica de célula, tipo celular, linaje celular o tejido para conseguir la expresión específica de tipo celular, específica de linaje o específica de tejido de una secuencia polinucleotídica deseada (por ejemplo, para expresar un ácido nucleico concreto que codifica un polipéptido en sólo un subconjunto de tipos celulares, linajes celulares o tejidos, o durante etapas de desarrollo específicas).

Los ejemplos ilustrativos de promotores específicos de tejido incluyen, pero no se limitan a: un promotor de B29 (expresión en linfocitos B), un promotor del factor de transcripción Runt (CBFA2) (expresión específica en células madre), un promotor de CD14 (expresión en células monocíticas), un promotor de CD43 (expresión en leucocitos y plaquetas), un promotor de CD45 (expresión en células hematopoyéticas), un promotor de CD68 (expresión en macrófagos), un promotor de CYP450 3A4 (expresión en hepatocitos), un promotor de desmina (expresión en músculo), un promotor de elastasa 1 (expresión en células acinares pancreáticas), un promotor de endoglin (expresión en células endoteliales), un promotor de proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1) (expresión en células fibroblásticas), un promotor de fibronectina (expresión en células fibroblásticas), un promotor de tirosina quinasa relacionada con fms 1 (FLT1) (expresión en células endoteliales), un promotor de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (expresión en astrocitos), un promotor de insulina (expresión en células beta pancreáticas), un promotor de integrina, alfa 2b (ITGA2B) (megacariocitos), un promotor de la molécula de adhesión intracelular 2 (ICAM-2) (células endoteliales), un promotor de interferón beta (IFN- $\beta$ ) (células hematopoyéticas), un promotor de queratina 5 (expresión en queratinocitos), un promotor de mioglobina (MB) (expresión en músculo), un promotor de diferenciación miogénica 1 (MYOD1) (expresión en músculo), un promotor de nefrina (expresión en podocitos), un promotor de proteína ósea gamma-carboxiglutamato 2 (OG-2) (expresión en osteoblastos), un promotor de 3-oxoácido CoA transferasa 2B (Oxct2B) (expresión en espermátida haploide), un promotor de proteína surfactante B (SP-B) (expresión en pulmón), un promotor de sinapsina (expresión en neuronas), un promotor de la proteína del síndrome Wiskott-Aldrich (WASP) (expresión en células hematopoyéticas).

En una forma de realización, un vector de la presente divulgación comprende uno o más promotores y/o potenciadores específicos de célula hematopoyética o de tejido seleccionados del grupo que consiste en: un promotor de  $\beta$ -globina humana; una LCR de  $\beta$ -globina humana; y un potenciador de HS40 de  $\alpha$ -globina humana y un promotor de anquirina-1, unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido globina.

En otra forma de realización, un vector de la presente divulgación comprende un promotor activo en una célula de la microglía, unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido casete de unión a ATP, subfamilia D, miembro 1 (ABCD1). En determinadas formas de realización, el promotor comprende un promotor del potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, con región de control negativo delecionada, con sitio de unión del cebador dl587rev sustituido (MND) o fragmento transcripcionalmente activo del mismo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "expresión condicional" puede referirse a cualquier tipo de expresión condicional, incluida, pero no limitada a, la expresión inducible; la expresión reprimible; la expresión en células o tejidos que tienen un estado fisiológico, estado biológico o una patología concretos, etc. Esta definición no pretende excluir la expresión específica de tipo celular o tejido. Determinadas formas de realización de la invención proporcionan la expresión condicional de un polinucleótido-de-interés, por ejemplo, la expresión se controla sometiendo a una célula, tejido, organismo, etc., a un tratamiento o condición que haga que el polinucleótido se exprese o que provoque un aumento o disminución de la expresión del polinucleótido codificado por el polinucleótido-de-interés.

Los ejemplos ilustrativos de promotores/sistemas inducibles incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles por esteroides tales como promotores de genes que codifican receptores de glucocorticoides o estrógenos (inducibles por tratamiento con la hormona correspondiente), el promotor de metalotionina (inducible por tratamiento con diversos metales pesados), promotor de MX-1 (inducible por interferón), el sistema regulable por mifepristona "GeneSwitch" (Sirin *et al.*, (2003). *Gene*, 323:67), el interruptor del gen inducible por cumate (WO 2002/088346), sistemas reguladores dependientes de tetraciclinas, etc.

La expresión condicional también puede conseguirse utilizando una ADN recombinasa específica de sitio. Según determinadas formas de realización de la divulgación, el vector comprende al menos un sitio (por lo general dos sitios) para la recombinación mediada por una recombinasa específica de sitio. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "recombinasa" o la expresión "recombinasa específica de sitio" incluye proteínas de escisión o integrativas, enzimas, cofactores o proteínas asociadas que están implicadas en reacciones de recombinación que implican uno o más sitios de recombinación (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, siete, diez, doce, quince, veinte, treinta, cincuenta, etc.), que pueden ser proteínas silvestres (véase Landy, (1993) *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707), o mutantes, derivados (por ejemplo, proteínas de fusión que contienen las secuencias de proteínas de recombinación o fragmentos de las mismas), fragmentos, y variantes de los mismos. Los ejemplos ilustrativos de recombinasas adecuadas para utilizarse en formas de realización particulares de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a: Cre, Int, IHF, Xis, Fli, Fis, Hin, Gin,  $\phi$ C31, Cin, Tn3 resolvasa, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 y ParA.

Los vectores pueden comprender uno o más sitios de recombinación para cualquiera de una gran diversidad de recombinasas específicas de sitio. Debe entenderse que el sitio diana para una recombinasa específica de sitio se suma a cualquier sitio o sitios necesarios para la integración de un vector, por ejemplo, un vector retroviral o vector lentiviral. Tal como se utilizan en el presente documento, las expresiones "secuencia de recombinación", "sitio de recombinación" o "sitio de recombinación específica de sitio" se refieren a una secuencia de ácido nucleico concreta a la que reconoce y se une una recombinasa.

Por ejemplo, un sitio de recombinación para la Cre recombinasa es loxP que es una secuencia de 34 pares de bases que comprende dos repeticiones invertidas de 13 pares de bases (que hacen de sitios de unión de la recombinasa) que flanquean una secuencia central de 8 pares de bases (véase la FIG. 1 de Sauer, B., (1994) *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527). Otros sitios loxP ejemplares incluyen, pero no se limitan a: lox511 (Hoess *et al.*, 1996; Bethke y Sauer, 1997), lox5171 (Lee y Saito, 1998), lox2272 (Lee y Saito, 1998), m2 (Langer *et al.*, 2002), lox71 (Albert *et al.*, 1995) y lox66 (Albert *et al.*, 1995).

Los sitios de reconocimiento adecuados para la recombinasa FLP incluyen, pero no se limitan a: FRT (McLeod, *et al.*, 1996), F1, F2, F3 (Schlake y Bode, 1994), F4, F5 (Schlake y Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff *et al.*, 1988), FRT(RE) (Senecoff *et al.*, 1988).

Otros ejemplos de secuencias de reconocimiento son las secuencias attB, attP, attL y attR, que son reconocidas por la enzima recombinasa integrasa  $\lambda$ , por ejemplo,  $\phi$ C31. La SSR de  $\phi$ C31 interviene en la recombinación solamente entre los sitios heterotípicos attB (34 pb de longitud) y attP (39 pb de longitud) (Groth *et al.*, 2000). Tanto attB como attP, denominados así por los sitios de anclaje para la integrasa del fago en los genomas de bacterias y fagos, respectivamente, contienen repeticiones invertidas imperfectas que probablemente están unidas por homodímeros de  $\phi$ C31 (Groth *et al.*, 2000). Los sitios producto, attL y attR, son de hecho inertes para la posterior recombinación mediada por  $\phi$ C31 (Belteki *et al.*, 2003), haciendo que la reacción sea irreversible. Para

catalizar las inserciones, se ha descubierto que el ADN que porta attB se inserta en un sitio attP genómico más fácilmente que un sitio attP en un sitio attB genómico (Thyagarajan *et al.*, 2001; Belteki *et al.*, 2003). Por lo tanto, las estrategias típicas sitúan mediante recombinación homóloga un "sitio de acoplamiento" que porta attP en un locus definido, que a continuación se empareja con una secuencia entrante que porta attB para la inserción.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "sitio interno de entrada al ribosoma" o "IRES" se refiere a un elemento que promueve la entrada interna directa al ribosoma al codón de iniciación, tal como ATG, de un cistron (una región codificante de proteínas), lo que conduce a la traducción independiente de caperuza del gen. Véase, por ejemplo, Jackson *et al.*, (1990) Trends Biochem Sci 15(12):477-83, y Jackson y Kaminski (1995) RNA 1 (10):985-1000. En formas de realización particulares, los vectores que se contemplan en la divulgación incluyen uno o más polinucleótidos-de-interés que codifican uno o más polipéptidos. En formas de realización particulares, para conseguir una traducción eficiente de cada uno de la pluralidad de polipéptidos, las secuencias polinucleotídicas pueden estar separadas por una o más secuencias IRES o secuencias polinucleotídicas que codifican polipéptidos de autoescisión.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "secuencia de Kozak" se refiere a una secuencia nucleotídica corta que facilita en gran medida la unión inicial del ARNm a la subunidad pequeña del ribosoma y aumenta la traducción. La secuencia de Kozak consenso es (GCC)RCCATGG, en la que R es una purina (A o G) (Kozak, (1986) Cell 44(2):283-92, y Kozak, (1987) Nucleic Acids Res. 15(20):8125-48). En formas de realización particulares, los vectores que se contemplan en la divulgación, comprenden polinucleótidos que tienen una secuencia de Kozak consenso y que codifican un polipéptido deseado.

En determinadas formas de realización, los vectores comprenden un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, higromicina, metotrexato, Zeocin, blasticidina o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes fundamentales no disponibles en los medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para bacilos. Puede utilizarse multitud de sistemas de selección para recuperar las estirpes celulares transformadas. Estos incluyen, pero no se limitan a, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, (1977) Cell 11:223-232) y de la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, (1990) Cell 22: 817-823) que pueden emplearse en células tk- o aprt-, respectivamente.

En diversas formas de realización, los vectores de la divulgación se utilizan para aumentar, establecer y/o mantener la expresión de uno o más polipéptidos, por ejemplo, globinas. Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos del mismo. Por lo tanto, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos de origen no natural sintéticos, tal como un análogo químico de un correspondiente aminoácido de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los ejemplos ilustrativos de polipéptidos globina adecuados para utilizarse en las composiciones y los métodos de formas de realización particulares de la invención incluyen, por ejemplo, las SEQ ID NO: 2-4, 6-9, 11-13 y 15. Véase también, por ejemplo, las patentes estadounidenses nº 6.051.402 y nº 7.901.671.

Los ejemplos ilustrativos de polipéptidos ABCD1 adecuados para utilizarse en los métodos de formas de realización particulares de la invención incluyen, por ejemplo, la SEQ ID NO: 18. Véanse también, por ejemplo, las patentes estadounidenses nº 5.869.039 y nº 6.013.769.

Las formas de realización particulares de la invención también incluyen "variantes" polipeptídicas. La mención del término "variante" polipeptídica se refiere a polipéptidos que se distinguen de un polipéptido de referencia por la adición, delección, truncamientos y/o sustitución de al menos un residuo de aminoácido, y que conservan una actividad biológica. En determinadas formas de realización, una variante polipeptídica se distingue de un polipéptido de referencia por una o más sustituciones, que pueden ser conservadoras o no conservadoras, tal como se conoce en la técnica.

En determinadas formas de realización, una variante polipeptídica incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente una identidad o similitud de secuencia del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, con una secuencia correspondiente de un polipéptido de referencia. En determinadas formas de realización, las adiciones o delecciones de aminoácidos se producen en el extremo C-terminal y/o el extremo N-terminal del polipéptido de referencia.

Como se ha indicado anteriormente, los polipéptidos de la divulgación pueden modificarse de diversas maneras incluidas las sustituciones, delecciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido de referencia mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para la mutagénesis y las modificaciones de secuencias nucleotídicas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:488-492, Kunkel *et al.*, (1987) Methods in Enzymol., 154: 367-382,

patente estadounidense nº 4.873.192, Watson, J.D. *et al.*, (1987) *Molecular Biology of the Gene*, cuarta edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., y las referencias citadas en los mismos. Puede encontrarse orientación con respecto a las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no influyen en la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff *et al.*, (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington D.C.).

Una "célula hospedadora" incluye células transfectadas, infectadas o transducidas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la divulgación. Las células hospedadoras pueden incluir células de empaquetamiento, células productoras y células infectadas con vectores virales. En formas de realización particulares, las células hospedadoras infectadas con el vector viral de la divulgación se administran a un sujeto que necesita tratamiento. En determinadas formas de realización, la expresión "célula diana" se utiliza indistintamente con la de "célula hospedadora" y se refiere a células transfectadas, infectadas o transducidas de un tipo celular deseado. En formas de realización preferentes, la célula diana es una célula madre o célula progenitora. En determinadas formas de realización preferentes, la célula diana es una célula somática, por ejemplo, una célula madre adulta, una célula progenitora o una célula diferenciada. En formas de realización particulares preferentes, la célula diana es una célula hematopoyética, por ejemplo, una célula madre o progenitora hematopoyética. Más adelante se analizan células diana terapéuticas adicionales.

La expresión "célula madre" se refiere a una célula que es una célula indiferenciada capaz de (1) autorrenovarse a largo plazo, o con la capacidad de generar al menos una copia idéntica de la célula original, (2) diferenciarse a nivel de célula única a múltiples tipos, y en algún caso a sólo un tipo, de células especializadas y (3) de producir la regeneración funcional *in vivo* de los tejidos. Las células madre se subclasifican según su potencial de desarrollo como totipotentes, pluripotentes, multipotentes y oligo/unipotentes. "Autorrenovación" se refiere a células con una capacidad única para producir células hijas no modificadas y para generar tipos celulares especializados (potencia). La autorrenovación puede conseguirse de dos maneras. La división celular asimétrica produce una célula hija que es idéntica a la célula parental y una célula hija que es distinta de la célula parental y es una progenitora o célula diferenciada. La división celular asimétrica no aumenta el número de células. La división celular simétrica produce dos células hijas idénticas. "Proliferación" o "expansión" de las células se refiere a células que se dividen de forma simétrica.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "totipotente" se refiere a la capacidad de una célula para formar todos los linajes celulares de un organismo. Por ejemplo, en los mamíferos, sólo el cigoto y los blastómeros en el primer estadio de división son totipotentes. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "pluripotente" se refiere a la capacidad de una célula para formar todos los linajes del cuerpo o soma (es decir, el embrión propiamente dicho). Por ejemplo, las células madre embrionarias son un tipo de células madre pluripotentes que son capaces de formar células de cada una de las tres capas germinales, el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "multipotente" se refiere a la capacidad de una célula madre adulta para formar múltiples tipos celulares de un linaje. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas son capaces de formar todas las células del linaje de células sanguíneas, por ejemplo, las células linfoides y mieloides. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "oligopotente" se refiere a la capacidad de una célula madre adulta para diferenciarse a sólo unos pocos tipos celulares diferentes. Por ejemplo, las células madre linfoides o mieloides son capaces de formar células de cualquiera de los linajes linfoides o mieloides, respectivamente. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "unipotente" se refiere a la capacidad de una célula para formar un solo tipo de célula. Por ejemplo, las células madre espermatogonias sólo son capaces de formar células espermáticas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "progenitora" o la expresión "células progenitoras" se refieren a células con la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse a células más maduras. Muchas células progenitoras se diferencian en un único linaje, pero pueden tener una capacidad proliferativa bastante amplia.

Las células madre hematopoyéticas (HSC) dan lugar a células progenitoras hematopoyéticas comprometidas (HPC) que son capaces de generar todo el repertorio de células sanguíneas maduras durante la vida de un organismo. La expresión "célula madre hematopoyética" o el término "HSC" se refieren a células madre multipotentes que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas de un organismo, incluidos los linajes mieloides (por ejemplo, monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linfoides (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, células NK), y otros conocidos en la técnica (véase Fei, R., *et al.*, patente estadounidense nº 5.635.387; McGlave, *et al.*, patente estadounidense nº 5.460.964; Simmons, P., *et al.*, patente estadounidense nº 5.677.136; Tsukamoto, *et al.*, patente estadounidense nº 5.750.397; Schwartz, *et al.*, patente estadounidense nº 5.759.793; DiGuisto, *et al.*, patente estadounidense nº 5.681.599; Tsukamoto, *et al.*, patente estadounidense nº 5.716.827). Cuando se trasplantan a seres humanos o animales irradiados letalmente, las células madre y progenitoras hematopoyéticas pueden repoblar la reserva de células hematopoyéticas eritroides, neutrófilos-macrófagos, megacariocitos y linfoides.

Con frecuencia se necesita la producción de partículas virales a gran escala para conseguir un título viral razonable. Las partículas virales se producen transfectando un vector de transferencia en una estirpe celular de

empaquetamiento que comprende genes virales estructurales y/o accesorios, por ejemplo, los genes gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx o nef, u otros genes retrovirales.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “vector de empaquetamiento” se refiere a un vector de expresión o vector viral que carece de una señal de empaquetamiento y comprende un polinucleótido que codifica uno, dos, tres, cuatro o más genes virales estructurales y/o accesorios. Por lo general, los vectores de empaquetamiento se incluyen en una célula de empaquetamiento, y se introducen en la célula mediante transfección, transducción o infección. Los métodos de transfección, transducción o infección son bien conocidos por los expertos en la materia. Un vector de transferencia retroviral/lentiviral de la presente divulgación puede introducirse en una estirpe celular de empaquetamiento, mediante transfección, transducción o infección, para generar una célula o estirpe celular productora. Los vectores de empaquetamiento de la presente divulgación pueden introducirse en células o estirpes celulares humanas mediante métodos convencionales incluidos, por ejemplo, la transfección con fosfato cálcico, la lipofección o la electroporación. En algunas formas de realización, los vectores de empaquetamiento se introducen en las células junto con un marcador seleccionable dominante, tal como neomicina, higromicina, puromicina, blastomicina, zeocina, timidina quinasa, DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido de selección en presencia del fármaco apropiado y aislamiento de clones. Un gen marcador seleccionable puede estar unido físicamente a genes que codifican el vector de empaquetamiento, por ejemplo, IRES o péptidos virales de autoescisión.

Las proteínas de la envoltura viral (env) determinan la diversidad de células hospedadoras que en última instancia pueden ser infectadas y transformadas por los retrovirus recombinantes generados a partir de las estirpes celulares. En el caso de los lentivirus, tales como VIH-1, VIH-2, SIV, FIV y EIV, las proteínas env incluyen gp41 y gp120. Preferentemente, las proteínas env virales expresadas por las células de empaquetamiento de la divulgación están codificadas en un vector distinto a partir de los genes virales gag y pol, como se ha descrito anteriormente.

Los ejemplos ilustrativos de genes env de origen retroviral que pueden emplearse en la divulgación incluyen, pero no se limitan a: envolturas de MLV, envoltura de 10A1, envolturas de BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, del Ébola, Sendai, FPV (virus de la peste aviar) y del virus de la gripe. Asimismo, pueden utilizarse genes que codifican envolturas de virus de ARN (por ejemplo, familias de virus de ARN de Picornaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae), así como de virus de ADN (familias de Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae e Iridoviridae). Los ejemplos representativos incluyen, FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, de la rabia, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10 y EIAV.

En otras formas de realización, las proteínas de la envoltura para seudotipificar un virus de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes virus: virus de la gripe A tal como H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1 (gripe aviar), gripe B, gripe C, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, rotavirus, cualquier virus del grupo de virus Norwalk, adenovirus entéricos, parvovirus, virus de la fiebre del dengue, viruela del mono, Mononegavirales, Lyssavirus tal como el virus de la rabia, virus del murciélago de Lagos, virus Mokola, virus Duvenhage, virus del murciélago europeo 1 y 2 y virus del murciélago australiano, Ephemerovirus, Vesiculovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV), Herpesvirus tales como el virus del herpes simple tipos 1 y 2, varicela zóster, citomegalovirus, virus de Epstein-Bar (EBV), herpesvirus humanos (HHV), herpesvirus humanos tipo 6 y 8, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma, gammaherpesvirus murino, Arenavirus tales como el virus de la fiebre hemorrágica argentina, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, virus de la fiebre hemorrágica asociada a Sabia, virus de la fiebre hemorrágica venezolana, virus de la fiebre de Lassa, virus Machupo, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), Bunyaviridae tal como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Hantavirus, virus responsable del síndrome renal con fiebre hemorrágica, virus de la fiebre del valle del Rift, Filoviridae (filovirus) incluidos el virus de la fiebre hemorrágica del Ébola y de la fiebre hemorrágica de Marburg, Flaviviridae incluido el virus de la enfermedad de Kyasanur Forest, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, virus responsable de la encefalitis transmitida por garrapatas y Paramyxoviridae tales como el virus Hendra y el virus Nipah, Variola mayor y Variola minor (viruela), alfavirus tales como el virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis equina occidental, coronavirus asociado al SARS (SARS-CoV), virus del Nilo Occidental, cualquier virus responsable de la encefalitis.

En una forma de realización, la divulgación proporciona células de empaquetamiento que producen retrovirus recombinantes, por ejemplo, lentivirus, seudotipificados con la glicoproteína VSV-G.

Los términos “seudotipificar” o “seudotipificado”, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a un virus cuyas proteínas de la envoltura viral han sido sustituidas con las de otro virus que posee características preferentes. Por ejemplo, el VIH puede seudotipificarse con las proteínas de la envoltura proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), que permiten que el VIH infecte una mayor diversidad de células porque las proteínas de la envoltura del VIH (codificadas por el gen env) normalmente dirigen el virus a las células presentadoras CD4+. En una forma de realización preferente de la divulgación, las proteínas de la envoltura lentiviral se seudotipifican con

VSV-G. En una forma de realización, la divulgación proporciona células de empaquetamiento que producen retrovirus recombinantes, por ejemplo, lentivirus, pseudotipificados con la glicoproteína de la envoltura VSV-G.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “estirpes celulares de empaquetamiento” se utiliza en referencia a estirpes celulares que no contienen una señal de empaquetamiento, pero que expresan de manera estable o transitoria enzimas de replicación y proteínas estructurales virales (por ejemplo, gag, pol y env) que son necesarias para el correcto empaquetamiento de las partículas virales. Puede emplearse cualquier estirpe celular adecuada para preparar las células de empaquetamiento de la divulgación. En general, las células son células de mamífero. En una forma de realización particular, las células utilizadas para producir la estirpe celular de empaquetamiento son células humanas. Las estirpes celulares adecuadas que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células MDCK, células C3H 10T1/2, células FLY, células Psi-2, células BOSC23, células PA317, células WEHI, células COS, células BSC-1, células BSC-40, células BMT-10, células VERO, células W138, células MRC5, células A549, células HT1080, células 293, células 293T, células B-50, células 3T3, células NIH3T3, células HepG2, células Saos-2, células Huh7, células HeLa, células W163, células 211 y células 211A. En formas de realización preferentes, las células de empaquetamiento son células 293, células 293T o células A549. En otra forma de realización preferente, las células son células A549.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “estirpe celular productora” se refiere a una estirpe celular que es capaz de producir partículas retrovirales recombinantes, que comprende una estirpe celular de empaquetamiento y un constructo de vector de transferencia que comprende una señal de empaquetamiento. La producción de partículas virales infecciosas y soluciones madre de virus puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales. Los métodos para preparar soluciones madre de virus son conocidos en la técnica y se ilustran, por ejemplo, en Y. Soneoka *et al.* (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633, y N.R. Landau *et al.* (1992) J. Virol. 66:5110-5113. Pueden recogerse partículas virales infecciosas de las células de empaquetamiento mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas pueden recogerse mediante lisis celular, o la recogida del sobrenadante del cultivo celular, como se conoce en la técnica. Opcionalmente, las partículas virales recogidas pueden purificarse, si se desea. Los expertos en la materia conocen bien las técnicas de purificación adecuadas.

Los términos “potenciar” o “promover”, o “aumentar” o “expandir” se refieren generalmente a la capacidad de los métodos de la invención para inducir, dar lugar a o producir un mayor número de células transducidas en comparación con el número de células transducidas mediante un vehículo o una molécula/composición de control. En una forma de realización, una célula madre hematopoyética transducida con los métodos de la presente invención comprende un aumento del número de células transducidas en comparación con las composiciones y los métodos de transducción existentes. Los aumentos de la transducción celular pueden determinarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como ensayos con indicadores, RT-PCR y expresión de proteínas de superficie celular, entre otros. Una cantidad “aumentada” o “potenciada” de la transducción es por lo general una cantidad “estadísticamente significativa”, y puede incluir un aumento que sea 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1.000 veces) (incluidos todos los números enteros y decimales intermedios y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) el número de células transducidas por el vehículo, una composición de control, u otro método de transducción.

Los términos “disminuir” o “reducir” se refieren en general a composiciones o métodos que dan como resultado un número comparativamente menor de células transducidas en comparación con las células transducidas con los métodos según la presente invención. Una cantidad “disminuida” o “reducida” de células transducidas es por lo general una cantidad “estadísticamente significativa”, y puede incluir una disminución que sea 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1.000 veces) (incluidos todos los números enteros y decimales intermedios y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) el número de células transducidas (respuesta de referencia) producido mediante los métodos según la presente invención.

Los términos y expresiones “mantener” o “conservar” o “mantenimiento” o “sin cambio”, o “sin cambio sustancial” o “sin disminución sustancial” se refieren en general a una respuesta fisiológica que es comparable a una respuesta generada mediante cualquiera de los vehículos, una molécula/composición de control, o la respuesta en un linaje celular concreto. Una respuesta comparable es aquella que no es significativamente distinta o apreciablemente distinta de la respuesta de referencia.

Los artículos “un”, “una”, “el” y “la” se utilizan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” se refiere a un elemento o a más de un elemento.

Debe entenderse que el uso de la alternativa (por ejemplo, “o”) se refiere a una de las alternativas, a ambas, o a cualquier combinación de las mismas. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos “incluye” y “comprende” se utilizan como sinónimos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente” se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta en un

15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En una forma de realización, el término “aproximadamente” se refiere a un intervalo de cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 9\%$ ,  $\pm 8\%$ ,  $\pm 7\%$ ,  $\pm 6\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 4\%$ ,  $\pm 3\%$ ,  $\pm 2\%$  o  $\pm 1\%$  alrededor de una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se entenderá que a menos que el contexto requiera otra cosa, los términos “comprenden”, “comprende” y la expresión “que comprende” implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicados, pero no la exclusión de ninguna otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. La expresión “que consiste en” se refiere a que incluye, y se limita a, todo lo que siga a la expresión “que consiste en”. Por lo tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no puede haber otros elementos presentes. La expresión “que consiste esencialmente en” se refiere a que incluye cualquier elemento enumerado después de la expresión, y que se limita a otros elementos que no interfieren con ni contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por lo tanto, la expresión “que consiste esencialmente en” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que hay otros elementos opcionales y pueden estar o no estar presentes dependiendo de si influyen o no en la actividad o acción de los elementos enumerados.

La referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a “una forma de realización” se refiere a que una función, estructura o característica concreta descrita en relación con la forma de realización está incluida en al menos una forma de realización de la presente invención. Por lo tanto, no todas las apariciones de la expresión “en una forma de realización” en diversos lugares a lo largo de la presente memoria descriptiva se refieren necesariamente a la misma forma de realización. Además, las funciones, estructuras o características concretas pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más formas de realización.

En la siguiente descripción, se presentan determinados detalles específicos con el fin de proporcionar una profunda comprensión de las diversas formas de realización de la invención. Sin embargo, un experto en la materia entenderá que la invención puede ponerse en práctica sin estos detalles. Además, debe entenderse que los vectores individuales, o grupos de vectores, derivados de las diversas combinaciones de las estructuras y sustituyentes descritos en el presente documento, se divulgan mediante la presente solicitud como si cada vector o grupo de vectores se presentase individualmente. Por lo tanto, la selección de estructuras de vector concretas o sustituyentes concretos pertenece al alcance de la presente divulgación.

### C. Vectores virales

Se han ensayado vectores retrovirales y lentivirales y se ha descubierto que son vehículos de introducción adecuados para la introducción estable de genes de interés, por ejemplo, que codifican polipéptidos terapéuticos, en el genoma de una gran variedad de células diana. La presente divulgación contempla, en parte, la mejora de la introducción de vectores de terapia génica a una población de células que se administra a un sujeto para proporcionar la terapia génica.

La presente divulgación proporciona adicionalmente vectores de transferencia, que pueden utilizarse para poner en práctica los métodos de la presente invención. Aunque el experto entenderá que tales vectores de transferencia pueden producirse utilizando diversos vectores virales diferentes, en formas de realización particulares, el vector de transferencia es un vector retroviral o un vector lentiviral, en parte debido a que los vectores lentivirales son capaces de proporcionar una introducción, integración y expresión a largo plazo eficaces de los transgenes en células que no están en división, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se conocen en la técnica diversos vectores lentivirales, véase Naldini *et al.*, (1996a, 1996b y 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, patentes estadounidenses nº 6.013.516 y nº 5.994.136, cualquiera de los cuales puede adaptarse para producir un vector de transferencia de la presente divulgación.

En general, estos vectores están basados en plásmidos o basados en virus, y se configuran para llevar las secuencias esenciales para transferir un ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico a una célula hospedadora.

En formas de realización ilustrativas, el vector retroviral es un vector lentiviral. Por lo tanto, los vectores pueden derivarse del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), virus de la inmunodeficiencia humana 2 (VIH-2), virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), virus de la enfermedad de Jembrana (JDV), virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV) y similares. Los esqueletos del vector basado en VIH (es decir, los elementos de secuencia que actúan en cis del VIH y los genes gag, pol y rev del VIH) resultan generalmente preferentes en relación con la mayoría de los aspectos de la presente invención en el sentido de que los constructos basados en VIH son los más eficaces en la transducción de células humanas.

Aunque las formas de realización ilustrativas particulares incluyen una descripción más detallada de los

vectores, composiciones y métodos utilizados para corregir los trastornos hematopoyéticos, por ejemplo, las hemoglobinopatías, la divulgación no debería considerarse limitada por la presente divulgación. Un experto en la materia entenderá fácilmente que los principios ilustrados en el presente documento pueden aplicarse a la terapia génica en otros sistemas, por ejemplo, el sistema nervioso, incluidos el ojo, el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico; el sistema circulatorio; el sistema muscular; el sistema esquelético; los órganos, incluidos la piel, el corazón, los pulmones, el páncreas, el hígado, el riñón, el intestino, y similares.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona vectores, por ejemplo, vectores lentivirales, que comprenden una secuencia de control de la expresión que dirige la expresión del polinucleótido-de-interés, por ejemplo, un gen de globina, en un tipo celular o linaje celular concreto. El uso de una secuencia de control de la expresión específica de tipo celular o de linaje celular ofrece ventajas de seguridad al restringir la expresión del polinucleótido a una etapa deseada de la diferenciación celular en un solo linaje; y por lo tanto, los vectores de la divulgación mitigan las preocupaciones relacionadas con la expresión ectópica de polipéptidos en tipos celulares no deseados.

En un ejemplo no limitativo, la secuencia de control de la expresión puede ser una secuencia de control de la expresión ubicua tal como se divulga en otra parte del presente documento.

En otro ejemplo no limitativo, la secuencia de control de la expresión puede ser una secuencia de control de la expresión específica de células madre que dirige la expresión específica de células madre del polinucleótido-de-interés en una célula madre embrionaria, una célula madre neural, una célula madre mesenquimal, una célula madre hepática, una célula madre pancreática, una célula madre cardíaca, una célula madre renal o una célula madre hematopoyética.

En otro ejemplo no limitativo, la secuencia de control de la expresión puede ser una secuencia de control de la expresión específica de tipo celular o de linaje celular que dirige la expresión del polinucleótido-de-interés en una célula madre hematopoyética, una célula progenitora hematopoyética, una célula mieloide, una célula linfóide, un linaje trombopoyético, un mastocito, una célula de linaje eritropoyético, una célula de linaje granulopoyético y una célula de linaje monocitopoyético.

En formas de realización particulares, un vector de la divulgación puede utilizarse para expresar un polinucleótido, por ejemplo, un gen-de-interés en una o más o en todas las células hematopoyéticas, incluidas pero no limitadas a células madre hematopoyéticas, células progenitoras hematopoyéticas, progenitoras mieloides, progenitoras linfoides, progenitoras trombopoyéticas, progenitoras eritroides, progenitoras granulopoyéticas, progenitoras monocitopoyéticas, megacarioblastos, promegacariocitos, megacariocitos, trombocitos/plaquetas, proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos, eritroblastos ortocromáticos, eritrocitos policromáticos, eritrocitos (RBC), promielocitos basófilos, mielocitos basófilos, metamielocitos basófilos, basófilos, promielocitos neutrófilos, mielocitos neutrófilos, metamielocitos neutrófilos, neutrófilos, promielocitos eosinófilos, mielocitos eosinófilos, macrófagos, células dendríticas, linfoblastos, prolinfocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos pequeños, linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas y células dendríticas linfoides.

En formas de realización preferentes, un vector de la divulgación puede utilizarse para expresar un polinucleótido, por ejemplo, un gen-de-interés en una o más células eritroides, por ejemplo, proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, eritroblasto ortocromático, eritrocito policromático y eritrocito (RBC).

En una forma de realización, el vector comprende un promotor, potenciador o promotor/potenciador de célula hematopoyética unido operativamente a un gen de interés, por ejemplo, de globina.

Las secuencias de control de la expresión específicas de tipo celular o de linaje celular adecuadas incluyen, pero no se limitan a, secuencias de control de la expresión de célula hematopoyética, tales como, por ejemplo, un promotor de célula madre hematopoyética, y un promotor de célula progenitora hematopoyética. En las formas de realización en las que la expresión del gen de interés se desea en una o más células eritroides, una secuencia de control de la expresión de célula hematopoyética adecuada puede incluir, pero no se limita a, un promotor específico de célula eritroide y, opcionalmente, un potenciador específico de célula eritroide, un promotor de  $\beta$ -globina humana, una LCR de  $\beta$ -globina humana, o un potenciador de HS40 de  $\alpha$ -globina humana y un promotor de anquirina-1.

En una forma de realización, las secuencias de control de la expresión específicas de tipo celular o de linaje celular adecuadas incluyen, pero no se limitan a, un promotor activo en una célula de la microglía. En determinadas formas de realización, el promotor comprende un promotor de MND o fragmento transcripcionalmente activo del mismo, unido operativamente a un gen de interés, por ejemplo, ABC1.

El uso de una secuencia de control de la expresión específica de tipo celular o de linaje celular ofrece ventajas de seguridad al restringir la expresión del polinucleótido a una etapa deseada de la diferenciación celular en un solo linaje; y por lo tanto, los vectores de la divulgación mitigan las preocupaciones relacionadas con la expresión ectópica de polipéptidos en tipos celulares no deseados. En una forma de realización, la divulgación proporciona un

vector que comprende una o más LTR, y una secuencia de control de la expresión operativamente unida a un gen de interés. En una forma de realización relacionada, la secuencia de control de la expresión es una secuencia de control de la expresión específica de célula eritroide, seleccionada del grupo que consiste en: un promotor de  $\beta$ -globina humana; una LCR de  $\beta$ -globina humana; y un potenciador de HS40 de  $\alpha$ -globina humana y un promotor de anquirina-1.

En diversas formas de realización, el diseño del vector se realizará con el objetivo de tratar, prevenir o mejorar una enfermedad, trastorno o afección hematopoyética concreta. Por ejemplo, la presente divulgación contempla vectores para la terapia génica de hemoglobinopatías que comprenden un gen de interés seleccionado del grupo que consiste en:  $\alpha$ -globina humana,  $\beta$ -globina humana,  $\delta$ -globina humana y  $\gamma$ -globina humana, o variantes biológicamente activas o fragmentos de las mismas. En una forma de realización, el gen de globina está seleccionado del grupo que consiste en un gen de  $\beta$ -globina humana silvestre, un gen de  $\beta$ -globina humana delecionada que comprende una o más deleciones de secuencias intrónicas, y un gen de  $\beta$ -globina humana mutado que codifica al menos un residuo de aminoácido antifalciformación.

En una forma de realización particular, en la que la afección tratada es una hemoglobinopatía de células falciformes, el gen de interés puede ser una proteína antifalciformación. Tal como se utiliza en el presente documento, "proteína antifalciformación" se refiere a un polipéptido que previene o revierte los eventos patológicos que conducen a la falciformación de los eritrocitos en las afecciones de células falciformes. En una forma de realización de la divulgación, las células transducidas de la invención se utilizan para suministrar proteínas antifalciformación a un sujeto con una afección hemoglobinopática. Las proteínas antifalciformación también incluyen genes de  $\beta$ -globina mutados que comprenden residuos de aminoácidos antifalciformación.

En una forma de realización preferente, una de tales variantes de la globina es el gen de  $\beta$ A-globina humana que codifica una mutación treonina a glutamina en el codón 87 ( $\beta$ A-T87Q) o un gen de  $\beta$ A-globina humana (la forma madura del polipéptido globina se ha procesado mediante escisión de la metionina N-terminal, el codón 87 del polipéptido globina maduro es treonina; el codón 88 del polipéptido globina no escindido de longitud completa es treonina). Se conocen en la técnica otros residuos de aminoácidos antifalciformación y pueden ser útiles en la presente invención. Por ejemplo, véase la patente estadounidense 6.051.402; la patente estadounidense 5.861.488; la patente estadounidense 6.670.323; la patente estadounidense 5.864.029; la patente estadounidense 5.877.288; y Levasseur *et al.*, Blood 102:4312-4319 (2003).

En determinadas formas de realización, se utiliza un vector que comprende una secuencia de control de la expresión específica de célula eritroide para tratar, prevenir o mejorar un gran número de trastornos que van más allá de las hemoglobinopatías. Las precursoras de glóbulos rojos son una población celular útil en la que expresar polipéptidos que pueden secretarse a la circulación y, por lo tanto, suministrarse a nivel sistémico. Un ejemplo de tal suministro de proteína *in vivo* es el Factor IX humano, un factor de coagulación que está ausente en pacientes con hemofilia B, véase, por ejemplo, A.H. Chang, *et al.*, Molecular Therapy (2008).

En una forma de realización, las células transducidas con los vectores de la divulgación pueden utilizarse como "fábricas" para la secreción de proteínas, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, un vector que comprende una secuencia de control de la expresión específica de célula eritroide puede utilizarse para la producción *in vitro* a gran escala de proteínas de las células eritroides diferenciadas a partir de las HSC o de células madre embrionarias.

Los polinucleótidos-de-interés que podrían expresarse de esta manera incluyen, pero no se limitan a: adenosina desaminasa, las enzimas afectadas en las enfermedades de depósito lisosomal, apolipoproteína E, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6), proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), cardiotrofina 1 (CT-1), CD22, CD40, factor neurotrófico ciliar (CNTF), CCL1-CCL28, CXCL1-CXCL17, CXCL1, CXCL2, CX3CL1, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), dopamina, eritropoyetina, Factor IX, Factor VIII, factor de crecimiento epidérmico (EGF), estrógeno, ligando FAS, factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF-4), factor de crecimiento de fibroblastos 5 (FGF-5), factor de crecimiento de fibroblastos 6 (FGF-6), factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF-7), factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF-10), Flt-3, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), hormona del crecimiento, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interferón beta (IFN- $\beta$ ), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), insulina, glucagón, factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1), factor de crecimiento insulinoide 2 (IGF-2), interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10), interleucina 11 (IL-11), interleucina 12 (IL-12), interleucina 13 (IL-13), interleucina 15 (IL-15), interleucina 17 (IL-17), interleucina 19 (IL-19), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), proteína quimiotáctica para monocitos 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos 3a (MIP-3a), proteína inflamatoria de macrófagos 3b (MIP-3b), factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4 (NT-4), hormona paratiroidea, factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA), factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB), factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), factor de crecimiento derivado de plaquetas CC (PDGF-CC), factor de crecimiento derivado de plaquetas DD

(PDGF-DD), RANTES, factor de células madre (SCF), factor derivado de células del estroma 1 (SDF-1), testosterona, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt7c, Wnt8, Wnt8a, Wnt8b, Wnt8c, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt15 o Wnt16, Sonic Hedgehog, Desert Hedgehog e Indian Hedgehog.

En una forma de realización, un vector útil en los métodos de la invención comprende al menos una LTR retroviral modificada o no modificada, por ejemplo, una LTR lentiviral, un promotor de  $\beta$ -globina y una región controladora de locus (LCR) de  $\beta$ -globina unida operativamente a un polinucleótido de interés, por ejemplo, que codifica un polipéptido globina. Las modificaciones adecuadas de las LTR incluyen, pero no se limitan a: la sustitución de la LTR 5' es con un promotor heterólogo, por ejemplo, promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor de timidina quinasa o un promotor de virus de simio 40 (SV40); y una o más modificaciones, adiciones y/o deleciones de una LTR 3' como se analiza en otra parte del presente documento.

En una forma de realización particular, la expresión específica de célula eritroide de un polinucleótido se consigue utilizando un promotor de  $\beta$ -globina humana, una LCR de  $\beta$ -globina que comprende uno o más sitios 2, 3 y 4 de hipersensibilidad a la ADNsa I de la LCR de  $\beta$ -globina humana, y/o un elemento potenciador 3' de  $\beta$ -globina humana.

En diversas formas de realización, un vector útil en los métodos de la invención comprende uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en: una secuencia de empaquetamiento Psi ( $\Psi^+$ ), una región central del tracto de polipurina/"ADN flap" (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral, un elemento regulador postranscripcional, uno o más elementos aisladores, una secuencia de poliadenilación, un marcador seleccionable, y un gen de suicidio celular, como se analiza en otra parte del presente documento.

En diversas formas de realización, los vectores útiles en los métodos de la divulgación comprenden un promotor operativo en una célula hematopoyética unido operativamente a un gen que codifica un polipéptido que proporciona tratamiento para las hemoglobinopatías. Los vectores pueden tener una o más LTR, en los que cualquiera de las LTR comprende una o más modificaciones, tales como una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos. Los vectores pueden comprender adicionalmente uno o más elementos accesorios para aumentar la eficiencia de transducción (por ejemplo, una cPPT/FLAP), el empaquetamiento viral (por ejemplo, una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ), RRE), y/u otros elementos que aumentan la expresión del gen terapéutico (por ejemplo, secuencias poli(A)).

En una forma de realización, un vector comprende una LTR retroviral izquierda (5'), una secuencia de empaquetamiento Psi ( $\Psi^+$ ), una región central del tracto de polipurina/"ADN flap" (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral, un promotor de  $\beta$ -globina, una región controladora de locus (LCR) de  $\beta$ -globina, y, opcionalmente, un potenciador 3' de  $\beta$ -globina unido operativamente a un polinucleótido de interés, y una LTR retroviral derecha (3') que comprende uno o más elementos aisladores, o una secuencia de poliadenilación.

En una forma de realización particular, un vector útil en los métodos de la invención es un vector lentiviral que comprende una LTR de VIH-1 izquierda (5'), una secuencia de empaquetamiento Psi ( $\Psi^+$ ), una región central del tracto de polipurina/"ADN flap" (cPPT/FLAP), un elemento de respuesta a Rev (RRE), un promotor de  $\beta$ -globina, una región controladora de locus (LCR) de  $\beta$ -globina, y opcionalmente un potenciador 3' de  $\beta$ -globina unido operativamente a un polinucleótido de interés, y una LTR retroviral derecha (3') que comprende uno o más elementos aisladores, y una secuencia poliA de  $\beta$ -globina de conejo ( $\beta$ gpA).

En diversas formas de realización, los vectores útiles en los métodos de la invención comprenden un promotor operativo en una célula de la microglía unido operativamente a un gen que codifica un polipéptido que proporciona tratamiento para las adrenoleucodistrofias y/o las adrenomieloneuropatías. Los vectores pueden tener una o más LTR, en los que cualquiera de las LTR comprende una o más modificaciones, tales como una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos. Los vectores pueden comprender adicionalmente uno o más elementos accesorios para aumentar la eficiencia de transducción (por ejemplo, una cPPT/FLAP), el empaquetamiento viral (por ejemplo, una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ), RRE), y/u otros elementos que aumentan la expresión del gen terapéutico (por ejemplo, secuencias poli(A)).

En una forma de realización particular, el vector de transferencia útil en los métodos de la invención comprende una LTR retroviral izquierda (5'); una región central del tracto de polipurina/"ADN flap" (cPPT/FLAP); un elemento de exportación retroviral; un promotor activo en una célula de la microglía, unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido casete de unión a ATP, subfamilia D, miembro 1 (ABCD1); y una LTR retroviral derecha (3').

En una determinada forma de realización, la divulgación proporciona un vector lentiviral que comprende: una LTR de VIH-1 izquierda (5'); una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ); una cPPT/FLAP; un RRE; un promotor de

MND, unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido ABCD1 humano; una LTR de VIH-1 autoinactivante (SIN) derecha (3'); y una secuencia de poliadenilación de  $\beta$ -globina de conejo.

El experto entenderá que pueden diseñarse muchas otras formas de realización diferentes a partir de las formas de realización actuales de la invención, de manera que el transgén terapéutico o gen de interés se exprese en un tipo celular o linaje celular diana que no sea el linaje hematopoyético, por ejemplo, el linaje neuronal.

#### D. Métodos de transducción

La presente invención contempla, en parte, métodos que aumentan significativamente la eficiencia de transducción de las células diana. Sin desear limitarse a ninguna teoría concreta, se contempla que los métodos de la presente invención pueden utilizarse para transducir un número significativamente mayor de células con un número significativamente menor de virus, minimizando así el riesgo de modificación genómica y/o activación por inserción de protooncogenes del genoma de la célula terapéutica. Minimizar el riesgo de activación por inserción de protooncogenes y otras modificaciones genómicas en la célula terapéutica es una cuestión importante en la elaboración de un protocolo de terapia génica adecuado, dado que minimiza la posibilidad de que células transducidas que comprendan características cancerosas experimenten expansión clonal *in vivo* y den lugar a cánceres, tumores u otras enfermedades que implican la proliferación celular anormal. Por otra parte, se ha observado en la técnica que la transducción con grandes cantidades de virus puede ser generalmente citotóxica para la célula transducida. Por lo tanto, los métodos de la presente invención mejoran adicionalmente la capacidad de supervivencia de las células transducidas. Por consiguiente, la presente invención proporciona una terapia génica más segura y más eficaz.

La introducción de un(os) gen(es) u otras secuencias polinucleotídicas utilizando un vector retroviral o lentiviral mediante infección viral en lugar de mediante transfección se denomina "transducción". En una forma de realización, los vectores retrovirales se transducen en una célula mediante la infección y la integración del provirus. En determinadas formas de realización, una célula, por ejemplo, una célula diana, está "transducida" si comprende un gen u otra secuencia polinucleotídica introducida en la célula mediante infección utilizando un vector viral o retroviral. En formas de realización particulares, una célula transducida comprende uno o más genes u otras secuencias polinucleotídicas introducidas mediante un vector retroviral o lentiviral en su genoma celular.

En formas de realización particulares, las células hospedadoras o células diana transducidas con un vector viral útiles en los métodos de la invención expresan un polipéptido terapéutico y se administran a un sujeto para tratar y/o prevenir una enfermedad, trastorno o afección.

La producción de partículas virales infecciosas y soluciones madre de virus puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales. Los métodos para preparar soluciones madre de virus son conocidos en la técnica y se ilustran, por ejemplo, en Y. Soneoka *et al.* (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633, y N.R. Landau *et al.* (1992) J. Virol. 66:5110-5113.

En formas de realización particulares, pueden generarse partículas virales basadas en el VIH tipo 1 (VIH-1) mediante coexpresión de los elementos de empaquetamiento del virión y el vector de transferencia en una célula productora. Estas células pueden transfectarse de manera transitoria con varios plásmidos. Por lo general, se emplean de tres a cuatro plásmidos, pero el número puede ser mayor dependiendo del grado en que los componentes lentivirales se rompen en unidades distintas. Por ejemplo, un plásmido puede codificar los componentes básicos y enzimáticos del virión, derivados del VIH-1. Este plásmido se denomina plásmido de empaquetamiento. Otro plásmido codifica por lo general la(s) proteína(s) de la envoltura, más comúnmente la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) debido a su alta estabilidad y amplio tropismo. Este plásmido puede denominarse plásmido de expresión de la envoltura. Otro plásmido codifica el genoma a transferir a la célula diana, es decir, el propio vector, y se denomina vector de transferencia. Los plásmidos de empaquetamiento pueden introducirse en estirpes celulares humanas mediante técnicas conocidas, incluidas la transfección con fosfato cálcico, la lipofección o la electroporación. Pueden generarse virus recombinantes con títulos de varios millones de unidades de transducción por mililitro (TU/ml) mediante esta técnica y variantes de la misma. Después de la ultracentrifugación pueden obtenerse reservas concentradas de aproximadamente  $10^8$  TU/ml,  $10^9$  TU/ml,  $10^{10}$  TU/ml,  $10^{11}$  TU/ml,  $10^{12}$  TU/ml, o aproximadamente  $10^{13}$  TU/ml.

Pueden recogerse partículas virales infecciosas a partir de las células de empaquetamiento mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas pueden recogerse mediante lisis celular, o la recogida del sobrenadante del cultivo celular, como se conoce en la técnica. Opcionalmente, las partículas virales recogidas pueden purificarse, si se desea. Los expertos en la materia conocen bien las técnicas de purificación adecuadas.

Los virus pueden utilizarse para infectar células *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, cuando las células, por ejemplo células CD34<sup>+</sup>, células dendríticas, células de sangre periférica o células madre, se transducen *ex vivo*, las partículas de vector pueden incubarse con las células

utilizando una dosis generalmente del orden de entre 1 a 50 multiplicidades de infección (MOI) que también se corresponde con una cantidad de  $1 \times 10^5$  a  $50 \times 10^5$  unidades de transducción del vector viral por  $10^5$  células. Esto, por supuesto, incluye una cantidad de vector correspondiente a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 MOI.

Los virus también pueden suministrarse a un sujeto *in vivo*, por inyección directa a la célula, al tejido o al órgano que necesita tratamiento. La inyección directa requiere del orden de entre 1 a 50 multiplicidades de infección (MOI) que también se corresponde con una cantidad de  $1 \times 10^5$  a  $50 \times 10^5$  unidades de transducción del vector viral por  $10^5$  células.

Los virus también pueden suministrarse según el título viral (TU/ml), que puede medirse, por ejemplo, utilizando un ensayo de titulación de p24 disponible en el mercado, que es un ELISA contra la proteína de cubierta viral p24. Puede utilizarse la siguiente fórmula para calcular la pg/ml de p24: hay aproximadamente 2.000 moléculas de p24 por partícula física (PP) de lentivirus:  $(2 \times 10^3) \times (24 \times 10^3 \text{ Da de p24 por PP})$ ,  $48 \times 10^6 / \text{Avogadro} = (48 \times 10^6) / (6 \times 10^{23}) = 8 \times 10^{-17} \text{ g de p24 por PP}$ , aproximadamente 1 PP por  $1 \times 10^{-16} \text{ g de p24}$ ,  $1 \times 10^4 \text{ PP por pg de p24}$ . Un vector lentiviral seudotipificado con VSV-G, razonablemente bien empaquetado, tendrá un índice de infectividad en el intervalo de 1 TU por 1.000 partículas físicas (PP) a 1 TU por 100 PP (o menos). Por lo tanto, el intervalo es de aproximadamente de 10 TU/pg a 100 TU/pg de p24. A través de esta conversión se obtiene TU/ml.

Basándose en la experiencia anterior, la cantidad de lentivirus directamente inyectada viene determinada por la TU total y puede variar según el volumen que sería posible inyectar al sitio y según el tipo de tejido a inyectar. Por ejemplo, un sitio de inyección en el cerebro sólo puede permitir que se inyecte un volumen muy pequeño de virus, por lo que resultaría preferente una preparación de alta titulación, podría utilizarse una TU de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$ , de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$ , de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^9$ , de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^{10}$ , de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{11}$ , de aproximadamente  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{12}$ , o de aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{12}$ , o más, por inyección. Sin embargo, una administración sistémica podría dar cabida a una TU mucho mayor, podría suministrarse una carga de  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$  o  $1 \times 10^{15}$ .

La presente invención contempla métodos que proporcionan una transducción de alta eficiencia de las células *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, utilizando menores títulos virales que los divulgados anteriormente para conseguir eficiencias de transducción comparables en ausencia de los métodos proporcionados en el presente documento.

Determinados aspectos de la presente invención surgen del inesperado hallazgo de que la eficiencia de transducción se ve significativamente aumentada al poner en contacto las células, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, con un retrovirus y uno o más compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas, tal como, por ejemplo, una molécula pequeña, o los compuestos divulgados en los documentos WO 2007/112084 y WO2010/108028. Tal como se utilizan en el presente documento, las expresiones "estimula la señalización de receptores EP de prostaglandinas", "activa la señalización de receptores EP de prostaglandinas" o "aumenta la señalización de receptores de EP de prostaglandinas" se refiere en general a la capacidad de un compuesto para aumentar la actividad de señalización celular aguas abajo de una receptor EP de prostaglandinas en la célula puesta en contacto con el uno o más compuestos en comparación con la actividad de señalización celular aguas abajo del receptor EP de prostaglandinas en ausencia del uno o más compuestos. Los ensayos que pueden utilizarse para medir la activación o estimulación de la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas son conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en el documento WO2010/108028.

Los ejemplos ilustrativos de compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, por ejemplo, moléculas orgánicas pequeñas, prostaglandinas, agonistas de la vía Wnt, agonistas de la vía AMPc/PI3K/AKT, agonistas de la vía del segundo mensajero  $\text{Ca}^{2+}$ , agonistas de señalización del óxido nítrico (NO)/angiotensina, y otros compuestos conocidos por estimular la vía de señalización de las prostaglandinas seleccionados del grupo que consiste en: mebeverina, flurandrenolida, atenolol, pindolol, gaboxadol, ácido quinurénico, hidralazina, tiabendazol, bicuculina, vesamicol, peruvósido, imipramina, clorpropamida, 1,5-pentametilentetrazol, 4-aminopiridina, diazóxido, benfotiamina, ácido 12-metoxidodecenoico, N-formil-Met-Leu-Phe, galamina, IAA 94, clorotrianiseno, y derivados de estos compuestos.

En una forma de realización preferente, el compuesto que estimula la vía de las prostaglandinas es un polipéptido o molécula química de origen natural o sintético que se une a y/o interactúa con un receptor de EP, por lo general para activar o aumentar una o más de las vías de señalización aguas abajo asociadas con un receptor EP de prostaglandinas, tal como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica.

En una forma de realización, el compuesto que estimula la vía de las prostaglandinas está seleccionado de los grupos que consisten en:  $\text{PGA}_2$ ;  $\text{PGB}_2$ ;  $\text{PGD}_2$ ;  $\text{PGE}_1$  (Alprostadiil (Caverject™; Edex™; Muse™; Prostin VR™);  $\text{PGE}_2$ ;  $\text{PGF}_2$ ;  $\text{PGL}_2$  (Epoprostenol (Flolan™; Prostacyclin™));  $\text{PGH}_2$ ;  $\text{PGJ}_2$ ; y precursores, metabolitos, derivados y análogos de los mismos.

Los compuestos ilustrativos adicionales que estimulan la vía de las prostaglandinas incluyen, pero no se limitan a, 15d-PGJ<sub>2</sub>; delta12-PGJ<sub>2</sub>; ácido 2-hidroxihexadecatrenoico (HHT); tromboxano (TXA<sub>2</sub> y TXB<sub>2</sub>); análogos de PGI<sub>2</sub>, por ejemplo, iloprost (Ventavis™) y treprostinil (Remodulin™); análogos de PGF<sub>2</sub>, por ejemplo, travoprost (Travatan™), carboprost trometamina (Hemabate™), tafluprost (Zioptan™), latanoprost (Xalatan™), bimatoprost (Lumigan™; Latisse™), unoprostona isopropilo (Rescula™), cloprostenol (Ciosin™, Cyclix™, Estrumate™, Lutaprost™, Onsett™, Planate™), Oestrophan y Superphan; análogos de PGE<sub>1</sub>, por ejemplo, misoprostol (Cytotec™) y butaprost; y alcohol-A de Corey [[3α,4α,5β,6α]-(-)-[hexahidro-4-(hidroximetil)-2-oxo-2H-ciclopenta[b]furan-5-il][1,1'-bifenil]-4-carboxilato]; alcohol-B de Corey [2H-ciclopenta[b]furan-2-on,5-(benzoiloxi)hexahidro-4-(hidroximetil)[3αR-(3α,4α,5β,6α)]]; y diol de Corey ((3αR,4S,5R,6aS)-hexahidro-5-hidroxi-4-(hidroximetil)-2H-ciclopenta[b]furan-2-ona).

En una forma de realización, el compuesto es un ligando del receptor EP de prostaglandinas, incluido pero no limitado a, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), así como “análogos” o “derivados” del mismo. “Prostaglandinas” se refiere en general a moléculas hormonoides que se derivan de ácidos grasos que contienen 20 átomos de carbono, incluido un anillo de 5 carbonos, tal como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica.

Los ejemplos ilustrativos de “análogos” o “derivados” de PGE<sub>2</sub> incluyen, pero no se limitan a, 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, éster p-(p-acetamidobenzamido)fenílico de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, 11-desoxi-16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, 9-desoxi-9-metilen-16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, 9-desoxi-9-metilen PGE<sub>2</sub>, 9-ceto fluprostenol, 5-trans PGE<sub>2</sub>, 17-fenil-omega-trinor PGE<sub>2</sub>, serinolamida de PGE<sub>2</sub>, éster metílico de PGE<sub>2</sub>, 16-fenil tetranor PGE<sub>2</sub>, 15(S)-15-metil PGE<sub>2</sub>, 15(R)-15-metil PGE<sub>2</sub>, 8-iso-15-ceto PGE<sub>2</sub>, éster isopropílico de 8-iso PGE<sub>2</sub>, 20-hidroxi PGE<sub>2</sub>, 11-desoxi PGE<sub>i</sub>, nocloprost, sulprostona, butaprost, 15-ceto PGE<sub>2</sub>, y 19(R)-hidroxi PGE<sub>2</sub>.

También se incluyen análogos o derivados de prostaglandinas con una estructura similar a PGE<sub>2</sub> que están sustituidos con halógeno en la posición 9 (véase, por ejemplo, el documento WO 2001/12596), así como derivados de prostaglandinas 2-descarboxi-2-fosfínicos, tales como los descritos en la publicación estadounidense nº 2006/0247214).

En algunas formas de realización, el compuesto es un ligando no basado en PGE<sub>2</sub>. En determinadas formas de realización, el ligando no basado en PGE<sub>2</sub> está seleccionado del grupo que consiste en un agonista de EP<sub>1</sub>, un agonista de EP<sub>2</sub>, un agonista de EP<sub>3</sub> y un agonista de EP<sub>4</sub>.

En formas de realización particulares, el receptor EP de prostaglandinas está seleccionado de entre EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub>.

Los ejemplos ilustrativos de agonistas de EP<sub>1</sub> no basados en PGE<sub>2</sub> incluyen, pero no se limitan a, ONO-DI-004 y ONO-8713. Los ejemplos ilustrativos de agonistas de EP<sub>2</sub> no basados en PGE<sub>2</sub> incluyen, pero no se limitan a, CAY10399, ONO\_8815Ly, ONO-AE1-259 y CP-533536. Los ejemplos adicionales de agonistas de EP<sub>2</sub> no basados en PGE<sub>2</sub> incluyen los carbazoles y fluorenos divulgados en el documento WO 2007/071456. Los ejemplos ilustrativos de agonistas de EP<sub>3</sub> no basados en PGE<sub>2</sub> incluyen, pero no se limitan a, AE5-599, MB28767, GR 63799X, ONO-NT012 y ONO-AE-248. Los ejemplos ilustrativos de agonistas de EP<sub>4</sub> no basados en PGE<sub>2</sub> incluyen, pero no se limitan a, ONO-4819, APS-999 Na, AH23848 y ONO-AE 1-329. Pueden encontrarse ejemplos adicionales de agonistas de EP<sub>4</sub> no basados en PGE<sub>2</sub> en el documento WO/2000/038663, la patente estadounidense nº 6.747.037 y la patente estadounidense nº 6.610.719.

En una forma de realización, el compuesto que estimula la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas es un agonista de Wnt. Los ejemplos ilustrativos de agonistas de Wnt incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y polipéptidos Wnt. Los ejemplos ilustrativos de polipéptidos Wnt adecuados para utilizarse como compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas incluyen, pero no se limitan a, Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt7c, Wnt8, Wnt8a, Wnt8b, Wnt8c, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt15 o Wnt15 y fragmentos biológicamente activos de los mismos.

Los inhibidores de GSK3 adecuados para utilizarse como compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas se unen a y disminuyen la actividad de GSK3α o GSK3β. Los ejemplos ilustrativos de inhibidores de GSK3 incluyen, pero no se limitan a, BIO (6-bromoindirubin-3'-oxime), LiCl u otros inhibidores de GSK-3, como se ejemplifica en las patentes estadounidenses nº 6.057.117 y nº 6.608.063; y las solicitudes estadounidenses 2004/0092535 y 2004/0209878; los inhibidores de GSK-3 selectivos ATP-competitivos CHIR-911 y CHIR-837 (también denominados CT-99021 y CT-98023, respectivamente). Chiron Corporation (Emeryville, CA).

En otra forma de realización, el compuesto que estimula la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas aumenta la señalización a través de la vía del segundo mensajero AMPc/PI3K/AKT y está seleccionado del grupo que consiste en dibutilil AMPc (DBcAMP), éster de forbol, forskolina, sclareline, 8-bromo-AMPc, toxina del cólera (CTx), aminofilina, 2,4-dinitrofenol (DNP), norepinefrina, epinefrina, isoproterenol,

isobutylmetilxantina (IBMX), cafeína, teofilina (dimetilxantina), dopamina, rolipram, iloprost, el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) y el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), y derivados de estos agentes.

En otra forma de realización, el compuesto que estimula la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas aumenta la señalización a través de la vía del segundo mensajero  $\text{Ca}^{2+}$  y está seleccionado del grupo que consiste en bapta-AM, fendilina, nicardipina y derivados de estos compuestos.

En otra forma de realización, el compuesto que estimula la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas aumenta la señalización a través de la vía de señalización NO/angiotensina y está seleccionado del grupo que consiste en L-Arg, nitroprusiato sódico, vanadato sódico, bradiginina, y derivados de los mismos.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para mejorar la eficiencia de transducción que comprende cultivar una población de células con un retrovirus y uno o más compuestos que aumentan la señalización de receptores EP de prostaglandinas seleccionados del grupo que consiste en: una prostaglandina, PGE<sub>2</sub>; PGD<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub>; ácido linoleico; 13(s)-HODE; LY171883; ácido de Mead; ácido eicosatrienoico; ácido epoxieicosatrienoico; ONO-259; Cay1039; un agonista del receptor de PGE<sub>2</sub>; 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>; 19(R)-hidroxi PGE<sub>2</sub>; éster p-(p-acetamidobenzamido)fenílico de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>; 11-desoxi-16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>; 9-desoxi-9-metilen-16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>; 9-desoxi-9-metilen PGE<sub>2</sub>; butaprost; sulprostona; serinolamida de PGE<sub>2</sub>; éster metílico de PGE<sub>2</sub>; 16-fenil tetranor PGE<sub>2</sub>; 15(S)-15-metil PGE<sub>2</sub>; 15(R)-15-metil PGE<sub>2</sub>; BIO; 8-bromo-AMPC; forskolina; bapta-AM; fendilina; nicardipina; nifedipina; pimizida; estrofantina; lanatósido; L-Arg; nitroprusiato sódico; vanadato sódico; bradiginina; mebeverina; flurandrenolida; atenolol; pindolol; gaboxadol; ácido quinurénico; hidralazina; tiabendazol; bicuculina; vesamicol; peruvósido; imipramina; clorpropamida; 1,5-pentametiletetrazol; 4-aminopiridina; diazóxido; benfotiamina; ácido 12-metoxidodecenoico; N-formil-Met-Leu-Phe; galamina; IAA 94; y clorotrianiseno.

En una forma de realización particular, la presente invención proporciona un método para mejorar la eficiencia de transducción que comprende cultivar una población de células con un retrovirus y uno o más compuestos que son ligandos de un receptor EP de prostaglandinas seleccionado del grupo que consiste en: 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, éster p-(p-acetamidobenzamido)fenílico de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, 11-desoxi-16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, 9-desoxi-9-metilen-16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, 9-desoxi-9-metilen PGE<sub>2</sub>, 9-ceto fluprostenol, 5-trans PGE<sub>2</sub>, 17-fenil-omega-trinor PGE<sub>2</sub>, serinolamida de PGE<sub>2</sub>, éster metílico de PGE<sub>2</sub>, 16-fenil tetranor PGE<sub>2</sub>, 15(S)-15-metil PGE<sub>2</sub>, 15(R)-15-metil PGE<sub>2</sub>, 8-iso-15-ceto PGE<sub>2</sub>, éster isopropílico de 8-iso PGE<sub>2</sub>, 20-hidroxi PGE<sub>2</sub>, 11-desoxi PGE<sub>i</sub>, nocloprost, sulprostona, butaprost, 15-ceto PGE<sub>2</sub> y 19(R)-hidroxi PGE<sub>2</sub>.

La presente invención también contempla que la eficiencia de transducción de las células puede aumentarse cultivado las células en presencia de un retrovirus, un compuesto que estimula una vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas, por ejemplo, PGE<sub>2</sub>, y uno o más inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC).

Los ejemplos ilustrativos de inhibidores de HDAC adecuados para utilizarse en las composiciones y los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de HDAC incluidos, pero no limitados a, TSA (tricostatina A) (véase, por ejemplo, Adcock, (2007) British Journal of Pharmacology 150:829-831), VPA (ácido valproico) (véase, por ejemplo, Munster, *et al.*, (2007) Journal of Clinical Oncology 25: 18S: 1065), butirato sódico (NaBu) (véase, por ejemplo, Han, *et al.*, (2007) Immunology Letters 108: 143-150), SAHA (ácido hidroxámico suberoilánilida o vorinostat) (véase, por ejemplo, Kelly, *et al.*, (2005) Nature Clinical Practice Oncology 2: 150 -157), fenilbutirato sódico (véase, por ejemplo, Gore, *et al.*, (2006) Cancer Research 66:6361-6369), depsipéptido (FR901228, FK228) (véase, por ejemplo, Zhu, *et al.*, (2003) Current Medicinal Chemistry 3(3): 187-199), trapoxina (TPX) (véase, por ejemplo, Furumai, *et al.*, (2001) PNAS 98(1): 87- 92), péptido que contiene ácido hidroxámico cíclico 1 (CHAP1) (véase, Furumai, *supra*), MS-275 (véase, por ejemplo, Carninci, *et al.*, WO2008/126932), LBH589 (véase, por ejemplo, Goh, *et al.*, WO2008/108741) y PXD-101 (véase, Goh, *supra*).

La presente invención contempla que las células pueden cultivarse en presencia de un retrovirus, pueden exponerse a (ponerse en contacto con) un compuesto que estimula la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o un inhibidor de HDAC durante un tiempo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 72 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 72 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, o cualquier período de tiempo intermedio.

En una forma de realización, las células cultivadas con un retrovirus se exponen a (se ponen en contacto con) un compuesto que estimula la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o un inhibidor de HDAC durante aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas,

aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, o aproximadamente 72 horas, o cualquier tiempo de duración intermedio.

La presente invención contempla que las células pueden cultivarse con uno o más compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC antes del cultivo con un retrovirus, durante el cultivo con un retrovirus, o después del cultivo con un retrovirus, o cualquier combinación de los mismos, durante cualquiera de los períodos de tiempo anteriores divulgados en el presente documento.

La presente invención contempla adicionalmente que las células pueden cultivarse con uno o más compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas y un retrovirus antes del cultivo con uno o más inhibidores de HDAC, durante el cultivo con uno o más inhibidores de HDAC, o después del cultivo con uno o más inhibidores de HDAC, o cualquier combinación de los mismos, durante cualquiera de los períodos de tiempo anteriores divulgados en el presente documento.

La presente invención también contempla que las células pueden cultivarse con un retrovirus antes del cultivo con uno o más compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC, durante el cultivo con uno o más compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC, o después del cultivo con uno o más compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC, o cualquier combinación de los mismos, durante cualquiera de los períodos de tiempo anteriores divulgados en el presente documento.

Además, un experto en la materia entenderá que los métodos de la presente invención para aumentar la transducción incluyen cultivar las células con retrovirus, uno o más compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC, durante las primeras 6 horas de la transducción, las primeras 12 horas de la transducción, las primeras 24 horas de la transducción, las primeras 48 horas de la transducción, o las primeras 72 horas de la transducción, o cualquier período de transducción intermedio.

Además, la presente invención contempla que las células pueden transducirse 1, 2, 3 o más veces en presencia de un retrovirus y uno o más compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC. En otra forma de realización, la presente invención contempla que las células pueden transducirse 1, 2, 3 o más veces en presencia de un retrovirus y exponerse a (ponerse en contacto con) uno o más compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC sólo una o dos veces.

En una forma de realización particular, la invención contempla que las células pueden cultivarse en el retrovirus, uno o más compuestos que estimulan la vía de señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC, en la que las células se exponen a o se ponen en contacto con ellos durante períodos de tiempo iguales o diferentes, como se divulga en otra parte del presente documento.

La presente invención también contempla que los métodos de la invención pueden aumentar la transducción de prácticamente cualquier tipo de célula hasta al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 91%, al menos aproximadamente un 92%, al menos aproximadamente un 93%, al menos aproximadamente un 94%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99% o al menos aproximadamente un 100%.

En formas de realización particulares, el aumento de la eficiencia de transducción representa un enriquecimiento de las células transducidas al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces, o más veces, mayor en comparación con las células transducidas con el vector en solitario.

Antes de, durante y/o después de la transducción, las células pueden cultivarse en medios adecuados para el mantenimiento, el desarrollo o la proliferación de las células. Las condiciones y medios de cultivo adecuados son bien conocidos en la técnica. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, los medios Dulbecco's Modified Eagle's Medium® (DMEM), DMEM F12 Medium®, Eagle's Minimum Essential Medium®, F-12K Medium®, Iscove's Modified Dulbecco's Medium®, RPMI-1640 Medium®, y el medio sin suero para cultivo y expansión de células

hematopoyéticas SFEM®. También se dispone de muchos medios en forma de formulaciones con bajo contenido de glucosa, con o sin piruvato sódico.

También pueden utilizarse ventajosamente complementos adicionales para proporcionar a las células los elementos traza necesarios para un desarrollo y expansión óptimos. Tales complementos incluyen insulina, transferrina, selenio sódico y combinaciones de los mismos. Estos componentes pueden incluirse en una solución salina tal como, pero no limitada a, la solución Hanks' Balanced Salt Solution® (HBSS), solución Earle's Salt Solution®, complementos antioxidantes, complementos MCDB-201®, solución salina tamponada con fosfato (PBS), ácido ascórbico y ácido ascórbico 2-fosfato, así como aminoácidos adicionales. Muchos medios de cultivo celular ya contienen aminoácidos, no obstante, algunos requieren complementación antes de cultivar las células. Tales aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, L-alanina, L-arginina, ácido L-aspártico, L-asparagina, L-cisteína, L-cistina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina. Está dentro del dominio del experto en la materia determinar las concentraciones apropiadas de estos complementos.

También pueden utilizarse ventajosamente hormonas en los cultivos celulares de la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, D-aldosterona, dietilestilbestrol (DES), dexametasona,  $\beta$ -estradiol, hidrocortisona, insulina, prolactina, progesterona, somatostatina/hormona humana del crecimiento (HGH), tiotropina, tiroxina y L-tironina.

También pueden utilizarse lípidos y transportadores lipídicos para complementar los medios de cultivo celular, dependiendo del tipo de célula y del destino de la célula diferenciada. Tales lípidos y transportadores pueden incluir, pero no se limitan a, ciclodextrina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), colesterol, ácido linoleico conjugado con albúmina, ácido linoleico y ácido oleico conjugado con albúmina, ácido linoleico no conjugado, ácido linoleico-oleico-araquidónico conjugado con albúmina y ácido oleico no conjugado y conjugado con albúmina, entre otros.

Las células también pueden cultivarse en medio de cultivo con baja concentración de suero o sin suero. Se describe un medio sin suero utilizado para cultivar células, por ejemplo, en la patente estadounidense 7.015.037. Se han cultivado muchas células en medio sin suero o con baja concentración de suero.

Después de la transducción, las células transducidas pueden cultivarse en condiciones adecuadas para su mantenimiento, desarrollo o proliferación. En formas de realización particulares, las células transducidas se cultivan durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días antes del trasplante.

Antes de, durante y/o después de la transducción, las células pueden cultivarse en condiciones que promueven la expansión de las células madre o células progenitoras. Puede utilizarse cualquier método conocido en la técnica. En determinadas formas de realización, antes de, durante o después de la transducción, las células se cultivan en presencia de uno o más factores de crecimiento que promueven la expansión de las células madre o células progenitoras. Los ejemplos de factores de crecimiento que promueven la expansión de las células madre o células progenitoras incluyen, pero no se limitan a, ligando de tirosina quinasa de hígado fetal (Flt3), factor de células madre, y las interleucinas 6 y 11, que han demostrado promover la autorrenovación de las células madre hematopoyéticas murinas. Otros incluyen Sonic Hedgehog, que induce la proliferación de progenitoras hematopoyéticas primarias mediante la activación de la proteína morfogenética ósea 4, Wnt3a, que estimula la autorrenovación de las HSC, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por ejemplo, FGF básico, FGF ácido, FGF-17, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-8b, FGF-8c, FGF-9), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por ejemplo, PDGFAA, PDGFAB, PDGFBB), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor de células madre (SCF), factor derivado de células del estroma (SCDF), factor de crecimiento insulinoide (IGF), trombopoyetina (TPO) o interleucina 3 (IL-3). En formas de realización particulares, antes, durante o después de la transducción, las células se cultivan en presencia de uno o más factores de crecimiento que promueven la expansión de las células madre o células progenitoras.

Aunque la descripción y los ejemplos proporcionados en el presente documento se centran en la transducción y selección de células multipotentes, incluidas las células madre hematopoyéticas en particular, los métodos de la presente invención también pueden utilizarse para transducir y seleccionar otros tipos de células, incluidos otros tipos de células madre pluripotentes o multipotentes, y células frágiles anteriormente no aptas para la selección de células transducidas para usos terapéuticos.

Las células utilizadas según los métodos de la presente invención pueden obtenerse de cualquier animal, preferentemente un mamífero, por ejemplo, un primate no humano o un ser humano, y más preferentemente un ser humano, y pueden trasplantarse a cualquier animal, preferentemente un mamífero, y más preferentemente un ser humano.

Las células adecuadas para la transducción y la administración en los métodos de terapia génica de la

invención incluyen, pero no se limitan a células madre, células progenitoras y células diferenciadas.

Los ejemplos ilustrativos de células madre adecuadas para la transducción con los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre mesodérmicas, células madre endodérmicas y células madre ectodérmicas.

En formas de realización particulares, la población o la fuente de células transducidas que utilizan las composiciones y los métodos contemplados en el presente documento comprende células madre y/o progenitoras mesenquimales, células madre y/o progenitoras mesodérmicas, células madre y/o progenitoras endodérmicas, o células madre y/o progenitoras ectodérmicas. En determinadas formas de realización, la población o la fuente de células utilizadas en los métodos contemplados en el presente documento comprende células madre de médula ósea, células madre y/o progenitoras de sangre de cordón umbilical, células madre y/o progenitoras óseas, células madre y/o progenitoras musculares, células madre y/o progenitoras hematopoyéticas, células madre y/o progenitoras adiposas, células madre y/o progenitoras de cartílago, células madre y/o progenitoras neurales, células madre y/o progenitoras cutáneas, células madre y/o progenitoras hepáticas, células madre y/o progenitoras pancreáticas, células madre y/o progenitoras renales, células madre y/o progenitoras gástricas y células madre y/o progenitoras intestinales.

En determinadas formas de realización, la población o la fuente de células transducidas que utilizan los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, de músculo esquelético, de músculo cardíaco, neuronas, células gliales (astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann), células retinianas (bastones, conos), células corneales, células cutáneas, monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B, células NK, células gástricas, células intestinales, células de músculo liso, células vasculares, células de la vejiga, células de los islotes pancreáticos (células alfa pancreáticas, células beta pancreáticas, células delta pancreáticas), hepatocitos, células renales, células suprarrenales y células pulmonares.

En diversas formas de realización, resulta preferente el uso de células madre debido a que tienen la capacidad de diferenciarse a los tipos celulares apropiados cuando se administran a un nicho biológico concreto, *in vivo*.

En formas de realización preferentes, los métodos de la presente invención se utilizan para aumentar la transducción de las células madre o progenitoras hematopoyéticas.

La presente invención también contempla el aislamiento y la transducción de una población de células. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "población de células" se refiere a una pluralidad de células que puede estar compuesta por cualquier número y/o combinación de tipos celulares homogéneos o heterogéneos, tal como se describe en otra parte del presente documento. Por ejemplo, para la transducción de las células madre o progenitoras hematopoyéticas, una población de células puede aislarse u obtenerse a partir de sangre de cordón umbilical, sangre de la placenta, médula ósea o sangre periférica. Una población de células puede comprender aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90% o aproximadamente un 100% del tipo celular diana a transducir. En determinadas formas de realización, las células madre o progenitoras hematopoyéticas pueden aislarse o purificarse a partir de una población de células heterogéneas mediante métodos conocidos en la técnica. En formas de realización particulares, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se purifican después de la transducción de una población de células, y en otras formas de realización, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se aíslan antes de la transducción.

Las células de la invención también pueden crioconservarse antes de la transducción o después de la transducción mediante métodos conocidos en la técnica. Una vez establecidas en cultivo, las células pueden utilizarse recién preparadas o congeladas, y almacenarse como reservas congeladas, utilizando, por ejemplo, DMEM con FCS al 40% y DMSO al 10%. Los expertos en la materia también disponen de otros métodos para preparar reservas congeladas para las células cultivadas.

En formas de realización particulares, una población de células que comprende células madre o progenitoras se pone en contacto con un retrovirus, por ejemplo, un lentivirus, y uno o más compuestos que aumentan la señalización de las prostaglandinas, por ejemplo, un ligando del receptor EP de prostaglandinas tal como PGE2 o un análogo o derivado del mismo. En determinadas formas de realización, la población de células se pone en contacto adicionalmente con uno o más inhibidores de HDAC. En diversas formas de realización, la población de células se pone en contacto *ex vivo* o *in vivo*.

En determinadas formas de realización preferentes, las células madre o progenitoras son células madre o progenitoras hematopoyéticas.

## E. Composiciones de cultivo celular

La presente divulgación contempla adicionalmente composiciones de células que comprenden un cultivo de células en medio de cultivo que comprende un retrovirus y uno o más compuestos que aumentan la señalización de las prostaglandinas. Como se analiza a lo largo de todo el presente documento, en formas de realización particulares, las composiciones y los métodos de la presente invención son útiles para terapias génicas celulares *ex vivo* e *in vivo*. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable.

Un cultivo terapéutico, sistema de cultivo, cultivo celular, o las composiciones de cultivo celular que comprenden una composición de células de la presente divulgación pueden administrarse por separado mediante métodos de administración enteral o parenteral, o en combinación con otros compuestos adecuados para lograr los objetivos de tratamiento deseados, por ejemplo, uno o más factores de crecimiento.

En una forma de realización ilustrativa, un cultivo terapéutico, cultivo celular, sistema de cultivo, o la composición de cultivo celular que comprende una célula transducida de la presente invención se administra a nivel sistémico por inyección directa en un tejido.

## F. Composiciones y formulaciones

Las formulaciones y composiciones producidas mediante los métodos de la invención pueden comprender una combinación de cualquier número de células transducidas o no transducidas o una combinación de las mismas, vectores virales, polipéptidos, polinucleótidos, y uno o más compuestos, por ejemplo, compuestos que aumentan la señalización de las prostaglandinas y/o inhibidores de HDAC, como se describe en el presente documento, formuladas en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables (por ejemplo, medio de cultivo) para la administración a una célula, tejido, órgano o animal, ya sea en solitario, o en combinación con una o más de otras modalidades de tratamiento.

Las formulaciones y composiciones *ex vivo* e *in vitro* concretas producidas mediante los métodos de la invención pueden comprender una combinación de células transducidas o no transducidas o una combinación de las mismas, vectores virales, y uno o más compuestos, por ejemplo, compuestos que aumentan la señalización de las prostaglandinas y/o inhibidores de HDAC, como se describe en el presente documento, formuladas en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables (por ejemplo, medio de cultivo) para la administración a una célula, tejido, órgano o animal, ya sea en solitario, o en combinación con una o más de otras modalidades de tratamiento.

Las formulaciones y composiciones *in vivo* concretas producidas mediante los métodos de la invención pueden comprender una combinación de vectores virales, y uno o más compuestos, por ejemplo, compuestos que aumentan la señalización de las prostaglandinas y/o inhibidores de HDAC, como se describe en el presente documento, formuladas en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables (por ejemplo, medio de cultivo) para la administración y la transducción de una célula o tejido en un animal, ya sea en solitario, o en combinación con una o más de otras modalidades de tratamiento.

En determinadas formas de realización, los métodos de la presente invención proporcionan composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de células transducidas, como se describe en el presente documento, formuladas junto con uno o más transportadores (aditivos) y/o diluyentes (por ejemplo, medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable) farmacéuticamente aceptables.

En otras determinadas formas de realización, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un vector retroviral y uno o más compuestos que aumentan la señalización de receptores EP de prostaglandinas, tal como se describe en el presente documento, formuladas junto con uno o más transportadores (aditivos) y/o diluyentes (por ejemplo, medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable) farmacéuticamente aceptables.

En formas de realización particulares, los métodos de la presente invención proporcionan composiciones que comprenden una población de células que comprende células madre o progenitoras, un vector retroviral y uno o más compuestos que aumentan la señalización de receptores EP de prostaglandinas, tal como se describe en el presente documento, formuladas junto con uno o más transportadores (aditivos) y/o diluyentes (por ejemplo, medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable) farmacéuticamente aceptables. En una forma de realización relacionada, la población de células comprende células madre y progenitoras hematopoyéticas.

La presente divulgación incluye adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden las células transducidas producidas según los métodos descritos en el presente documento y un transportador farmacéuticamente aceptable. En otras formas de realización, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vector retroviral y uno o más compuestos, por ejemplo, compuestos que

aumentan la señalización de las prostaglandinas y/o inhibidores de HDAC, como se describe en el presente documento.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica ni perjudicial similar cuando se administra a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como principio activo se comprende bien en la técnica. Por lo general, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolverse en, o suspenderse en, un líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse.

Tal como se utiliza en el presente documento, “transportador” incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, tampones, soluciones transportadoras, suspensiones, coloides, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse en las composiciones principios activos complementarios.

Tal como se utiliza en el presente documento, “transportador farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles, incluidos medios de cultivo celular farmacéuticamente aceptables. En una forma de realización, una composición que comprende un transportador es adecuado para la administración parenteral, por ejemplo, la administración intravascular (intravenosa o intraarterial), intraperitoneal o intramuscular. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las células transducidas, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la divulgación.

Las composiciones de la divulgación pueden comprender uno o más polipéptidos, polinucleótidos, vectores que los comprenden, compuestos que aumentan la señalización de los receptores EP de prostaglandinas, inhibidores de HDAC, y células transducidas, etc., como se describe en el presente documento, formulados en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para la administración a una célula o a un animal, ya sea en solitario, o en combinación con una o más de otras modalidades de tratamiento. También se entenderá que, si se desea, las composiciones de la divulgación pueden administrarse también en combinación con otros agentes, tales como, por ejemplo, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas pequeñas o diversos agentes farmacéuticamente activos. No hay prácticamente ninguna limitación en cuanto a la inclusión de otros componentes en las composiciones, siempre que los agentes adicionales no influyan negativamente en la capacidad de la composición para suministrar la terapia génica prevista.

En las composiciones farmacéuticas de la divulgación, la formulación de excipientes y soluciones transportadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los expertos en la materia, al igual que el desarrollo de posologías y planes terapéuticos adecuados para utilizar las composiciones concretas descritas en el presente documento en diversos planes terapéuticos, incluidos por ejemplo, la administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular.

En determinadas circunstancias será deseable administrar las composiciones divulgadas en el presente documento por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, o incluso intraperitoneal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense nº 5.543.158; la patente estadounidense nº 5.641.515 y la patente estadounidense nº 5.399.363. Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el desarrollo de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente estadounidense nº 5.466.468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe protegerse de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, utilizando un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y utilizando tensioactivos. La prevención de la acción de

los microorganismos puede facilitarse mediante diversos antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, resultará preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse utilizando en las composiciones agentes que retarden la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar adecuadamente tamponada, en caso necesario, y hacer primero que el diluyente líquido sea isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas concretas son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la materia conocerán un medio acuoso estéril que puede emplearse a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, puede disolverse una dosis en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1.000 ml de fluido de hipodermoclisión o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2005). Se producirá necesariamente cierta variación en la pauta dependiendo de la afección del sujeto tratado. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto particular. Por otra parte, para la administración a seres humanos, las preparaciones deben satisfacer las normas de esterilidad, pirogenicidad, y las normas generales de seguridad y pureza que exige la Office of Biologics Standards de la FDA.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando los compuestos activos en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con los otros diversos ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferentes son técnicas de secado al vacío y de liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden formularse en una forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la forma farmacéutica y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas farmacéuticas tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos, y similares.

En determinadas formas de realización, las composiciones pueden administrarse mediante pulverizaciones intranasales, inhalación, y/u otros vehículos de administración por aerosol. Los métodos para administrar composiciones de genes, polinucleótidos y péptidos directamente a los pulmones mediante pulverizaciones nasales se ha descrito por ejemplo, en la patente estadounidense nº 5.756.353 y en la patente estadounidense nº 5.804.212. Asimismo, la administración de fármacos utilizando resinas microparticuladas intranasales (Takenaga *et al.*, 1998) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (patente estadounidense nº 5.725.871) también se conoce bien en las técnicas farmacéuticas. Asimismo, en la patente estadounidense nº 5.780.045 se describe la administración de fármacos por vía transmucosa en forma de matriz de soporte de politetrafluoroetileno.

En determinadas formas de realización, la administración puede producirse utilizando liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas, opcionalmente mezclándolas con polipéptidos CPP, y similares, para introducir las composiciones de la presente divulgación en células hospedadoras adecuadas. En particular, las composiciones de la presente divulgación pueden formularse para administrarse encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similares. La formulación y el uso de tales vehículos de administración pueden llevarse a cabo mediante técnicas conocidas y convencionales. Las formulaciones y composiciones de la divulgación pueden comprender uno o más represores y/o activadores compuestos por una combinación de cualquier número de polipéptidos, polinucleótidos y moléculas pequeñas, como se describe en el presente documento, formulados en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables (por ejemplo, medio de cultivo) para la administración a una célula o a un animal, ya sea en solitario, o en combinación con una o más de otras modalidades de tratamiento. También se entenderá que, si se desea, las composiciones de la divulgación también pueden administrarse en combinación con otros agentes, tales como, por ejemplo, células, otras proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos.

En determinadas formas de realización, la presente divulgación proporciona formulaciones o composiciones adecuadas para el suministro de sistemas de vectores virales (es decir, transducción mediada por virus), incluidos pero no limitados a, vectores retrovirales (por ejemplo, lentivirales).

Las formulaciones ejemplares para el suministro *ex vivo* también pueden incluir el uso de diversos agentes de transfección conocidos en la técnica, tales como fosfato cálcico, electroporación, choque térmico y diversas formulaciones de liposomas (es decir, transfección mediada por lípidos). Los liposomas, como se describe con mayor detalle más adelante, son bicapas lipídicas que inmovilizan una fracción de fluido acuoso. El ADN se asocia espontáneamente a la superficie externa de los liposomas catiónicos (en virtud de su carga) y estos liposomas interactuarán con la membrana celular.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polinucleótidos o polipéptidos, como se describe en el presente documento, formulados junto con uno o más transportadores (aditivos) y/o diluyentes (por ejemplo, medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable) farmacéuticamente aceptables.

Las formas de realización particulares de la divulgación pueden comprender otras formulaciones, tales como las que son bien conocidas en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>a</sup> edición. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

En determinadas formas de realización, las composiciones de la presente divulgación comprenden una cantidad eficaz de una composición y, opcionalmente, comprenden uno o más tratamientos adyuvantes. En determinadas formas de realización de la presente divulgación, las composiciones que comprenden una composición de células y que comprende opcionalmente uno o más tratamientos adyuvantes pueden comprender adicionalmente una solución salina estéril, solución de Ringer, solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) o Isolyte S, pH 7,4, medios celulares sin suero, u otro medio farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, medio de cultivo celular), como se analiza en otra parte del presente documento.

En formas de realización particulares, una composición que comprende una población de células se trata (por ejemplo, se pone en contacto) con uno o más compuestos que aumentan la señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC, cada uno independientemente a una concentración final de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 100  $\mu$ M. En determinadas formas de realización, una población de células se trata con uno o más compuestos que aumentan la señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC, cada uno independientemente a una concentración final de aproximadamente 1  $\times 10^{-14}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-3}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-13}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-4}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-12}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-5}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-11}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-4}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-11}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-5}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-10}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-4}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-10}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-5}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-9}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-4}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-9}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-5}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-8}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-4}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-7}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-4}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-6}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-4}$  M, o cualquier intervalo intermedio de concentraciones finales.

En otra forma de realización particular, una población de células se pone en contacto con uno o más compuestos que aumentan la señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC, cada uno independientemente a una concentración final de aproximadamente 1  $\times 10^{-14}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-13}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-12}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-10}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-9}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-8}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-7}$  M a aproximadamente 1  $\times 10^{-6}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-5}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-4}$  M, de aproximadamente 1  $\times 10^{-3}$  M, o cualquier concentración final intermedia. En composiciones que comprenden uno o más compuestos que aumentan la señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC, los compuestos pueden encontrarse en diferentes concentraciones unos de otros o en la misma concentración.

Un experto en la materia sería capaz de utilizar métodos rutinarios con el fin de determinar la vía de administración apropiada y la correcta dosificación de una cantidad eficaz de una composición que comprende células transducidas y/o uno o más compuestos que aumentan la señalización de los receptores EP prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC para los métodos de la presente invención. Los expertos en la materia también sabrán reconocer que en determinados tratamientos se necesitarán múltiples administraciones de las composiciones farmacéuticas de la divulgación para efectuar el tratamiento.

Por ejemplo, una composición puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o más veces, en un lapso de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años, o más.

Por otra parte, pueden administrarse múltiples administraciones de las mismas o diferentes composiciones de la presente divulgación, múltiples veces, durante largos períodos de tiempo, como se ha indicado anteriormente.

Además, la administración de las células transducidas y/o uno o más compuestos que aumentan la señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC puede ser por la misma

vía o por diferentes vías como se ha analizado en otra parte del presente documento. La administración de las células transducidas y/o uno o más compuestos que aumentan la señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC también puede realizarse en diferentes sitios utilizando la misma o diferentes vías de administración. Además, la administración de las células transducidas y/o uno o más compuestos que aumentan la señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC puede hacerse en el mismo sitio por la misma vía, al mismo tiempo, o en momentos diferentes.

### G. Métodos de terapia génica

Las células transducidas y los vectores retrovirales correspondientes proporcionan métodos de terapia génica mejorados. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "terapia génica" se refiere a la introducción de un gen en el genoma de una célula. En diversas formas de realización, un vector viral útil en los métodos de la invención comprende una secuencia de control de la expresión hematopoyética que expresa un transgén terapéutico que codifica un polipéptido que proporciona beneficios curativos, preventivos o paliativos a un sujeto al que se le ha diagnosticado, o que se sospecha tiene una enfermedad, trastorno o afección monogénica, o una enfermedad, trastorno o afección que es abordable mediante tratamiento con células madre hematopoyéticas.

En una forma de realización preferente, los métodos de la invención proporcionan células transducidas con el potencial de convertirse en células de la microglía del cerebro. En formas de realización particulares, las células madre hematopoyéticas se transducen con un vector útil en los métodos de la invención y se administran a un individuo que necesita tratamiento para una adrenoleucodistrofia o adrenomieloneuropatía. Las células madre hematopoyéticas son el origen de las células de la microglía del cerebro y, por tanto, resultan preferentes.

En formas de realización particulares, las células madre o progenitoras hematopoyéticas transducidas comprenden vectores virales que tienen una secuencia de control de la expresión hematopoyética que expresa un transgén terapéutico que codifica un polipéptido que proporciona beneficios curativos, preventivos o paliativos a un sujeto al que se le ha diagnosticado o que se sospecha tiene una enfermedad, trastorno o afección monogénica, o una enfermedad, trastorno o afección del sistema hematopoyético.

Una composición que comprende un virus, por ejemplo, lentivirus, y/o uno o más compuestos que aumentan la señalización de los receptores EP de prostaglandinas y/o uno o más inhibidores de HDAC puede infectar y transducir células con mayores eficiencias *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, en comparación con las células transducidas con el vector en solitario. En las formas de realización *ex vivo* e *in vitro*, las células transducidas pueden administrarse a continuación a un sujeto que necesita tratamiento. La presente divulgación contempla que el vector, las partículas virales útiles en los métodos de la invención y las células transducidas de la invención puedan utilizarse para tratar, prevenir y/o mejorar una enfermedad, trastorno o afección monogénica, o una enfermedad, trastorno o afección del sistema hematopoyético en un sujeto, por ejemplo, una hemoglobinopatía.

Tal como se utiliza en el presente documento, "hematopoyesis," se refiere a la formación y al desarrollo de células sanguíneas a partir de células progenitoras, así como a la formación de células progenitoras a partir de células madre. Las células sanguíneas incluyen, pero no se limitan a, eritrocitos o glóbulos rojos (RBC), reticulocitos, monocitos, neutrófilos, megacariocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos B, macrófagos, granulocitos, mastocitos, trombocitos y leucocitos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hemoglobinopatía" o la expresión "afección hemoglobinopática" incluyen cualquier trastorno que implica la presencia de una molécula de hemoglobina anormal en la sangre. Los ejemplos de hemoglobinopatías incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de la hemoglobina C, la hemoglobinopatía de células falciformes (SCD), la anemia drepanocítica y talasemias. También se incluyen hemoglobinopatías en las que hay una combinación de hemoglobinas anormales presente en la sangre (por ejemplo, drepanocitemia/enfermedad de la hemoglobina C).

La expresión "anemia drepanocítica" o el término "drepanocitemia" se definen en el presente documento para incluir cualquier afección anémica sintomática que sea el resultado de la falciformación de los glóbulos rojos. Las manifestaciones de la drepanocitemia incluyen: anemia, dolor y/o disfunción de órganos, tales como la insuficiencia renal, la retinopatía, el síndrome torácico agudo, la isquemia, el priapismo y el ictus. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "drepanocitemia" se refiere a diversos problemas clínicos inherentes a la anemia drepanocítica, especialmente en aquellos sujetos que son homocigotos para la sustitución en la HbS en las células falciformes. Entre las manifestaciones constitucionales a las que se hace referencia en el presente documento mediante el uso del término "drepanocitemia" se encuentran el retraso del crecimiento y del desarrollo, una mayor tendencia a desarrollar infecciones graves, en particular debidas a neumococos, marcado deterioro de la función esplénica, que impide la eliminación eficaz de las bacterias circulantes, con infartos recurrentes y la eventual destrucción del tejido esplénico. También se incluyen en el término "drepanocitemia" los episodios agudos de dolor musculoesquelético, que afectan principalmente a la columna lumbar, el abdomen y el eje femoral, y que tienen un mecanismo y gravedad similares a las de la enfermedad por descompresión. En los adultos, este tipo de ataques se manifiestan comúnmente como episodios leves o moderados de corta duración cada pocas semanas o meses.

intercalados con ataques agudos que duran de 5 a 7 días que se presentan como promedio una vez al año. Entre los eventos conocidos por desencadenar tales crisis se encuentran la acidosis, la hipoxia y la deshidratación, todos los cuales potencian la polimerización intracelular de la HbS (J.H. Jandl, Blood: Textbook of Hematology, 2ª edición, Little, Brown and Company, Boston, 1996, páginas 544-545). Tal como se utiliza en el presente documento, el término “talasemia” abarca las anemias hereditarias que se producen debido a mutaciones que afectan a la síntesis de la hemoglobina. Por lo tanto, el término incluye cualquier anemia sintomática resultado de afecciones talasémicas tales como la talasemia grave o  $\beta$ -talasemia, la talasemia mayor, la talasemia intermedia, las  $\alpha$ -talasemias tal como la enfermedad de la hemoglobina H.

Tal como se utiliza en el presente documento, “talasemia” se refiere a un trastorno hereditario caracterizado por la producción defectuosa de hemoglobina. Los ejemplos de talasemias incluyen la talasemia  $\alpha$  y  $\beta$ . Las  $\beta$ -talasemias se deben a una mutación en la cadena de globina beta, y puede producirse en una forma mayor o menor. En la forma mayor de la  $\beta$ -talasemia, los niños son normales al nacer, pero desarrollan anemia durante el primer año de vida. La forma menor de la  $\beta$ -talasemia produce glóbulos rojos pequeños. La talasemia menor se produce si se recibe el gen defectuoso de sólo uno de los progenitores. Las personas con esta forma de trastorno son portadores de la enfermedad y por lo general no tienen síntomas.

La  $\alpha$ -talasemia es por lo general el resultado de deleciones que implican a los genes HBA1 y HBA2. Ambos genes codifican  $\alpha$ -globina, que es un componente (subunidad) de la hemoglobina. Hay dos copias del gen HBA1 y dos copias del gen HBA2 en cada genoma celular. Como resultado, hay cuatro alelos que producen  $\alpha$ -globina. Los diferentes tipos de  $\alpha$ -talasemia son el resultado de la pérdida de algunos o la totalidad de estos alelos. El síndrome Hb Bart, la forma más grave de  $\alpha$ -talasemia, es el resultado de la pérdida de los cuatro alelos de  $\alpha$ -globina. La enfermedad HbH se debe a una pérdida de tres de los cuatro alelos de  $\alpha$ -globina. En estas dos afecciones, la escasez de  $\alpha$ -globina impide que las células produzcan hemoglobina normal. En cambio, las células producen formas anormales de hemoglobina denominadas hemoglobina de Bart (Hb Bart) o hemoglobina H (HbH). Estas moléculas de hemoglobina anormales no pueden transportar el oxígeno a los tejidos del cuerpo de manera eficaz. La sustitución de la hemoglobina normal por Hb Bart o HbH provoca anemia y otros problemas de salud graves asociados con la  $\alpha$ -talasemia.

En una forma de realización preferente, los métodos de terapia génica de la divulgación se utilizan para tratar, prevenir o mejorar una hemoglobinopatía que está seleccionada del grupo que consiste en: la enfermedad de la hemoglobina C, la hemoglobinopatía de células falciformes (SCD), la anemia drepanocítica, la anemia hereditaria, la talasemia, la  $\beta$ -talasemia, la talasemia mayor, la talasemia intermedia, la  $\alpha$ -talasemia y la enfermedad de la hemoglobina H.

En diversas formas de realización, los vectores retrovirales se administran por inyección directa a una célula, tejido u órgano de un sujeto que necesita terapia génica, *in vivo*. En otras diversas formas de realización, las células se transducen *in vitro* o *ex vivo* con vectores útiles en el método de la invención, y opcionalmente se expanden *ex vivo*. A continuación, las células transducidas se administran a un sujeto que necesita terapia génica.

Las células adecuadas para la transducción y la administración en los métodos de terapia génica de la divulgación incluyen, pero no se limitan a células madre, células progenitoras y células diferenciadas como se describe en otra parte del presente documento. En determinadas formas de realización, las células transducidas son células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre de médula ósea, células madre de cordón umbilical, células madre de la placenta, células madre mesenquimales, células madre neurales, células madre hepáticas, células madre pancreáticas, células madre cardíacas, células madre renales, células madre hematopoyéticas como se describe en otra parte del presente documento.

En formas de realización preferentes, las células transducidas son células madre y/o progenitoras hematopoyéticas aisladas a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical o de la circulación periférica. En formas de realización particulares preferentes, las células transducidas son células madre hematopoyéticas aisladas a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical o de la circulación periférica.

Las HSC pueden identificarse según determinados marcadores fenotípicos o genotípicos. Por ejemplo, las HSC pueden identificarse por su pequeño tamaño, la ausencia de marcadores de linaje (lin), intensidad de tinción baja (población lateral) con colorantes vitales tales como rodamina 123 (“apagadas” para rodamina, también denominadas rhlo) o Hoechst 33342, y la presencia de diversos marcadores antigénicos en su superficie, muchos de los cuales pertenecen a la serie de los grupos de diferenciación (por ejemplo, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, Ter119 y c-kit, el receptor para el factor de células madre). Las HSC son principalmente negativas para los marcadores que se utilizan por lo general para detectar el compromiso de linaje, y, por lo tanto, se denominan con frecuencia células Lin(-).

En una forma de realización, las HSC humanas pueden caracterizarse como CD34+, CD59+, Thy1/CD90+, CD38lo/-, c-kit/CD117+ y Lin(-). Sin embargo, no todas las células madre quedan incluidas en estas combinaciones, ya que determinadas HSC son CD34-/CD38-. Además, algunos estudios sugieren que las células madre tempranas

pueden carecer de c-kit en la superficie celular. Para las HSC humanas, CD133 puede representar un marcador temprano, ya que tanto las HSC CD34+ como CD34- han demostrado ser CD133+. Es conocido en la técnica que las células CD34+ y Lin(-) también incluyen células progenitoras hematopoyéticas.

En otra forma de realización, la jerarquía hematopoyética viene determinada por un código SLAM. La familia SLAM (molécula de señalización de activación de linfocitos) es un grupo de > 10 moléculas cuyos genes se encuentran principalmente en tándem en un único locus en el cromosoma 1 (ratón), todas ellas pertenecientes a un subconjunto de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, y que en un principio se pensaba estaban implicadas en la estimulación de los linfocitos T. Esta familia incluye CD48, CD150, CD244, etc., siendo CD150 el miembro fundador, y, por lo tanto, también denominado slamF1, es decir, miembro 1 de la familia SLAM. El código de SLAM firma para la jerarquía hematopoyética es: células madre hematopoyéticas (HSC) - CD150+CD48-CD244-; células progenitoras multipotentes (MPP) - CD150-CD48-CD244+; células progenitoras de linaje restringido (PRL) - CD150-CD48+CD244+; progenitora mieloide común (CMP) - lin-SCA-1-c-kit+CD34+CD16/32mid; progenitora granulocito-macrófago (GMP) - lin-SCA-1-c-kit+CD34+CD16/32hi; y progenitora megacariocito-eritroide (MEP) - lin-SCA-1-c-kit+CD34-CD16/32low.

En ratones, el grupo de Irving Weissman de la Universidad de Stanford fue el primero en aislar las células madre hematopoyéticas de ratón en 1988 y fue también el primero en encontrar los marcadores para distinguir la jerarquía hematopoyética de ratón. Los marcadores para la jerarquía hematopoyética es: células madre hematopoyéticas con capacidad de autorrenovación a largo plazo (LT-HSC) - CD34-, SCA-1+, Thy1.1+/lo, C-kit+, lin-, CD135-, Slamf1/CD150+; células madre hematopoyéticas con capacidad de autorrenovación a corto plazo (ST-HSC) - CD34+, SCA-1+, Thy1.1+/lo, C-kit+, lin-, CD135-, Slamf1/CD150+, Mac-1 (CD11b)lo; progenitoras multipotentes tempranas - (MPP tempranas) - CD34+, SCA-1+, Thy1.1-, C-kit+, lin-, CD135+, Slamf1/CD150-, Mac-1 (CD11b)lo, CD4lo; y progenitoras multipotentes tardías (MPP tardías) - CD34+, SCA-1+, Thy1.1-, C-kit+, lin-, CD135high, Slamf1/CD150-, Mac-1 (CD11b)lo, CD4lo.

En una forma de realización, las células hematopoyéticas son células CD105+ Sca1+.

Las células útiles en los métodos de la invención pueden ser autólogas/autogénicas ("auto") o no autólogas ("no auto", por ejemplo, alogénicas, singénicas o xenogénicas). "Autóloga", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a células del mismo sujeto. "Alogénica", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a células de la misma especie que difieren genéticamente de la célula en comparación. "Singénica", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación. "Xenogénica", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a células de una especie diferente a la de la célula en comparación. En formas de realización preferentes, las células útiles en los métodos de la invención son alogénicas.

Un "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, incluye cualquier animal que presenta un síntoma de una enfermedad, trastorno o afección monogénica que puede tratarse con los vectores de terapia génica, los agentes terapéuticos celulares y los métodos divulgados en otra parte del presente documento. En formas de realización preferentes, un sujeto incluye cualquier animal que presenta síntomas de una enfermedad, trastorno o afección del sistema hematopoyético, por ejemplo, una hemoglobinopatía, que puede tratarse con los vectores de terapia génica, los agentes terapéuticos celulares y los métodos divulgados en otra parte del presente documento. Los sujetos adecuados (por ejemplo, pacientes) incluyen animales de laboratorio (tal como un ratón, rata, conejo o conejillo de indias), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tal como un gato o un perro). Están incluidos los primates no humanos y, preferentemente, los pacientes humanos. Los sujetos típicos incluyen animales que presentan cantidades aberrantes (cantidades menores o mayores que un sujeto "normal" o "sano") de una o más actividades fisiológicas que pueden modularse mediante terapia génica.

Tal como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" incluye cualquier efecto beneficioso o deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o estado patológico, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores mensurables de la enfermedad o afección tratada. El tratamiento puede implicar opcionalmente la reducción o la mejoría de los síntomas de la enfermedad o afección, o el retraso de la evolución de la enfermedad o afección. "Tratamiento" no indica necesariamente la erradicación completa o la curación de la enfermedad o afección, ni de los síntomas asociados a la misma.

Tal como se utiliza en el presente documento, "prevenir", y términos similares tales como "prevenido", "que previene", etc., indican un enfoque para la prevención, inhibición o reducción de la probabilidad de aparición o reaparición de una enfermedad o afección. También se refiere a retrasar la aparición o reaparición de una enfermedad o afección, o retrasar la aparición o reaparición de los síntomas de una enfermedad o afección. Tal como se utiliza en el presente documento, "prevención" y términos similares también incluyen la reducción de la intensidad, el efecto, los síntomas y/o la carga de una enfermedad o afección antes de la aparición o reaparición de la enfermedad o afección.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad" se refiere a "una cantidad eficaz" de un

virus o célula terapéutica transducida para conseguir un resultado profiláctico o terapéutico beneficioso o deseado, incluidos los resultados clínicos.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un virus o célula terapéutica transducida eficaz para conseguir el resultado profiláctico deseado. Por lo general, pero no necesariamente, puesto que una dosis profiláctica se utiliza en los sujetos antes de o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz es inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un virus o célula terapéutica transducida puede variar según factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de las células madre y progenitoras para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos son mayores que cualquier efecto tóxico o perjudicial del virus o de las células terapéuticas transducidas. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye una cantidad que es eficaz para "tratar" a un sujeto (por ejemplo, un paciente).

Sin desear limitarse a ninguna teoría concreta, una ventaja importante que proporcionan los métodos de la presente invención es la gran eficacia de la terapia génica que puede conseguirse administrando poblaciones de células que comprenden un alto porcentaje de células transducidas en comparación con los métodos existentes.

Las células transducidas pueden administrarse como parte de un trasplante de médula ósea o de sangre de cordón umbilical en un individuo que ha sido sometido o no ha sido sometido a tratamiento ablativo de médula ósea. En una forma de realización, las células transducidas de la invención se administran en un trasplante de médula ósea a un individuo que se ha sometido a tratamiento de quimioablación o radioablación de médula ósea.

En una forma de realización, se administra a un sujeto una dosis de células transducidas, por vía intravenosa. En formas de realización preferentes, se administran a un sujeto células madre hematopoyéticas transducidas, por vía intravenosa.

En una forma de realización ilustrativa, la cantidad eficaz de células transducidas proporcionada a un sujeto es inferior a  $1 \times 10^{12}$  células por 100 kg, inferior a  $1 \times 10^{11}$  células por 100 kg, inferior a  $1 \times 10^{10}$  células por 100 kg, inferior a  $1 \times 10^9$  células por 100 kg, inferior a  $1 \times 10^8$  células por 100 kg, inferior a  $1 \times 10^7$  células por 100 kg, inferior a  $5 \times 10^6$  células por 100 kg, inferior a  $4 \times 10^6$  células por 100 kg, inferior a  $3 \times 10^6$  células por 100 kg, inferior a  $2 \times 10^6$  células por 100 kg, inferior a  $1 \times 10^6$  células por 100 kg, inferior a  $5 \times 10^5$  células por 100 kg, inferior a  $4 \times 10^5$  células por 100 kg, inferior a  $3 \times 10^5$  células por 100 kg, inferior a  $2 \times 10^5$  células por 100 kg, inferior a  $1 \times 10^5$  células por 100 kg, inferior a  $5 \times 10^4$  células por 100 kg, o inferior a  $1 \times 10^4$  células por 100 kg de peso corporal del sujeto.

En otra forma de realización ilustrativa, la cantidad eficaz de células transducidas proporcionada a un sujeto es de aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  células por 100 kg, aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  células por 100 kg, aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células por 100 kg, aproximadamente  $1 \times 10^9$  células por 100 kg, aproximadamente  $1 \times 10^8$  células por 100 kg, aproximadamente  $1 \times 10^7$  células por 100 kg, aproximadamente  $5 \times 10^6$  células por 100 kg, aproximadamente  $4 \times 10^6$  células por 100 kg, aproximadamente  $3 \times 10^6$  células por 100 kg, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células por 100 kg, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por 100 kg, aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por 100 kg, aproximadamente  $4 \times 10^5$  células por 100 kg, aproximadamente  $3 \times 10^5$  células por 100 kg, aproximadamente  $2 \times 10^5$  células por 100 kg, aproximadamente  $1 \times 10^5$  células por 100 kg, aproximadamente  $5 \times 10^4$  células por 100 kg, o aproximadamente  $1 \times 10^4$  células por 100 kg.

En otra forma de realización ilustrativa, la cantidad eficaz de células transducidas proporcionada a un sujeto es de aproximadamente  $1 \times 10^1$  células por 100 kg a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  células por 100 kg, de aproximadamente  $1 \times 10^2$  células por 100 kg a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  células por 100 kg, de aproximadamente  $1 \times 10^3$  células por 100 kg a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células por 100 kg, de aproximadamente  $1 \times 10^4$  células por 100 kg a aproximadamente  $1 \times 10^9$  células por 100 kg, de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células por 100 kg a aproximadamente  $1 \times 10^8$  células por 100 kg, de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por 100 kg a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células por 100 kg, o cualquier intervalo intermedio de células por 100 kg.

En diversas formas de realización, los métodos de la invención proporcionan una terapia génica más robusta y más segura que la de los métodos existentes, y comprende administrar una población o dosis de células que comprende aproximadamente un 5% de células transducidas, aproximadamente un 10% de células transducidas, aproximadamente un 15% de células transducidas, aproximadamente un 20% de células transducidas, aproximadamente un 25% de células transducidas, aproximadamente un 30% de células transducidas, aproximadamente un 35% de células transducidas, aproximadamente un 40% de células transducidas, aproximadamente un 45% de células transducidas, aproximadamente un 50% de células transducidas, aproximadamente un 55% de células transducidas, aproximadamente un 60% de células transducidas, aproximadamente un 65% de células transducidas, aproximadamente un 70% de células transducidas, aproximadamente un 75% de células transducidas, aproximadamente un 80% de células transducidas, aproximadamente un 85% de células transducidas, aproximadamente un 90% de células transducidas,

aproximadamente un 95% de células transducidas, aproximadamente un 98% de células transducidas, o aproximadamente un 100% de células transducidas, a un sujeto.

En diversas formas de realización, los vectores, las composiciones y los métodos de la presente invención ofrecen métodos mejorados de terapia génica mediante terapia génica *ex vivo* y trasplante autólogo. En una forma de realización preferente, los métodos de la invención proporcionan células transducidas, tal como una célula madre, por ejemplo, una célula madre hematopoyética. En formas de realización particulares, las células madre hematopoyéticas se transducen con un vector útil en los métodos de la invención y se administra a un individuo que necesita tratamiento para una hemoglobinopatía.

En formas de realización particulares, las células madre hematopoyéticas se transducen con un vector útil en los métodos de la invención y se administran a un individuo que necesita tratamiento para una adrenoleucodistrofia o una adrenomieloneuropatía.

En una forma de realización preferente, la divulgación proporciona sistemas de vectores virales mejorados optimizados para que expresen altos niveles de una o más proteínas terapéuticas en las células eritroides o en las células precursoras eritroides. Los vectores retrovirales, incluidos los vectores lentivirales, útiles en los métodos de la invención comprenden adicionalmente un polinucleótido-de-interés, incluido, por ejemplo, un gen de globina o un gen que codifica una proteína antifalciiformación. En una forma de realización, el gen de globina expresado en el vector retroviral útil en los métodos de la invención es  $\beta$ -globina,  $\delta$ -globina o  $\gamma$ -globina. En otra forma de realización, el gen de  $\beta$ -globina humana es el gen de  $\beta$ -globina humana silvestre o el gen de  $\beta^A$ -globina humana. En otra forma de realización, el gen de  $\beta$ -globina humana comprende una o más delecciones de secuencias intrónicas o es un gen de  $\beta$ -globina humana mutado que codifica al menos un residuo de aminoácido antifalciiformación. Los aminoácidos antifalciiformación pueden derivarse de  $\delta$ -globina humana o de  $\gamma$ -globina humana. En otra forma de realización, el gen de  $\beta$ -globina humana mutado codifica una mutación treonina a glutamina en el codón 87 ( $\beta^{A-T87Q}$ ).

Los vectores retrovirales, incluidos los vectores lentivirales, útiles en los métodos de la invención pueden utilizarse en terapia génica, incluida para el tratamiento de las hemoglobinopatías. En formas de realización particulares, la invención proporciona métodos para utilizar los vectores anteriores para conseguir niveles altos y estables de expresión génica en células eritroides, por ejemplo, con el fin de tratar enfermedades específicas de células eritroides. En una forma de realización particular, los vectores de terapia génica se utilizan para tratar hemoglobinopatías, incluida, por ejemplo, la drepanocitemia (SCD). En otra forma de realización preferente, los vectores de terapia génica se utilizan para tratar las talasemias, incluidas pero no limitadas a, la  $\beta$ -talasemia.

En otra forma de realización preferente, las células madre hematopoyéticas se transducen con vectores de la invención que comprenden un gen ABCD1 para el tratamiento de adrenoleucodistrofias y/o adrenomieloneuropatías.

A continuación, se describirá la presente invención más detalladamente mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, la presente invención puede realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse que está limitada a las formas de realización presentadas en el presente documento; más bien, estas formas de realización se proporcionan para que la divulgación sea rigurosa y completa, y transmita plenamente el alcance de la invención a los expertos en la materia.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### PREESTIMULACIÓN DE CÉLULAS PARA LA TRANSDUCCION

Se descongeló un vial de células CD34+ (AllCells) mediante incubación a 37°C durante 1-2 minutos y se transfirió el contenido a 10 ml de medio para células madre "Stem Cell Growth Media" (denominado en lo sucesivo SCGM) en un tubo cónico de 15 ml. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 rpm en una centrífuga de mesa convencional, se resuspendieron en 10 ml de SCGM y se realizó el recuento en un hemocitómetro. Se transfirió un volumen que se correlacionaba con un número apropiado de células a un nuevo tubo cónico de 15 ml, y se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 1.500 rpm. Las células se resuspendieron hasta la concentración celular deseada en SCGM + 1x citocinas (100 ng/ml de SCF, 100 ng/ml de TPO, 100 ng/ml de FltL y 30 ng/ml de IL-3), y se sembraron en una superficie estéril no adherente a 37°C en una incubadora de cultivo tisular humidificada convencional (CO<sub>2</sub> al 5%).

Se realizó un cribado para seleccionar los compuestos que aumentan la eficiencia de transducción viral de las células CD34+ utilizando concentraciones variables de los compuestos solubles a partir de un número de clases (Tabla 1). Los resultados del cribado se muestran en la Figura 1.

**Tabla 1**

| Concentración | Wnt3      | FGF1      | IGF-II    | SHH       | Stemregenin-1 | dmPGE2 |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|--------|
| Alta          | 100 ng/ml | 100 ng/ml | 200 ng/ml | 100 ng/ml | 1000 nM       | 100 uM |
| Media         | 10 ng/ml  | 10 ng/ml  | 20 ng/ml  | 10 ng/ml  | 100 nM        | 10 uM  |
| Baja          | 1 ng/ml   | 1 ng/ml   | 2 ng/ml   | 1 ng/ml   | 10 nM         | 1 uM   |

**Tabla 1 (Cont.)**

| Concentración | SC514  | Omuralide | Epoxomicina | AMD3100   | B18R      | Tricostatina A |
|---------------|--------|-----------|-------------|-----------|-----------|----------------|
| Alta          | 10 uM  | 1000 nM   | 10 uM       | 100 ng/ml | 200 ng/ml | 3000 nM        |
| Media         | 1 uM   | 100 nM    | 1 uM        | 10 ng/ml  | 20 ng/ml  | 300 nM         |
| Baja          | 0,1 uM | 10 nM     | 0,1 uM      | 1 ng/ml   | 2 ng/ml   | 30 nM          |

**EJEMPLO 2****TRANSDUCCIÓN**

Se realizó el recuento de las células preestimuladas (Ejemplo 1) después de 18-24 horas de cultivo. Las células se recogieron y se centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 rpm. Se resuspendieron  $1,2 \times 10^6$  células CD34+ preestimuladas en 60 ul de 10x citocinas (1.000 ng/ml de SCF, 1.000 ng/ml de TPO, 1.000 ng/ml de FltL y 300 ng/ml de IL-3), 7,8 ul de sulfato de protamina, 111 ul de sobrenadante viral, y 361,2 ul de SCGM. Se añadieron 90 ul de suspensión de células/virus (aproximadamente 200.000 células) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos no adherentes convencional. Se añadió dmPGE2 durante esta etapa de la transducción viral a una concentración final de 100 uM, 50 uM, 25 uM, 12,5 uM, 1 uM o 0 uM. La reserva viral tenía un título de  $2,7 \times 10^8$  TU/ml, y la multiplicidad de infección (MOI) fue de aproximadamente 25.

Las células se incubaron a 37°C en una incubadora de cultivo tisular humidificada convencional (CO<sub>2</sub> al 5%).

**EJEMPLO 3****ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS CON DMPGE2**

Se prepararon alícuotas de dmPGE2 10 mM en DMSO a partir de 1 mg de dmPGE2 previamente procesado (Cayman Chemicals). En resumen, se pipeteó aire en el vial de dmPGE2 hasta que se evaporó el acetato de metilo. Se añadieron 263 ul de DMSO al PGE2 que quedaba en el vial, y se añadieron alícuotas de 25 ul a tubos Eppendorf de 1,5 ml, y se almacenaron a -80°C. Se prepararon 10x soluciones madre de trabajo mediante dilución en serie de dmPGE2 en SCGM, y, a continuación, se añadieron a las células a concentraciones de trabajo apropiadas, según la Tabla 2. A continuación, las células se incuban a 37°C en una incubadora de cultivo tisular humidificada convencional (CO<sub>2</sub> al 5%).

**TABLA 2: Diluciones en serie de dmPGE2 y adición de dmPGE2 a las células**

|                                  | Reserva A | Reserva B | Reserva C | Reserva D | Reserva E |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Reserva congelada de dmPGE2      | 20        | 0         | 0         | 0         | 0         |
| Volumen de SCGM                  | 180       | 100       | 100       | 100       | 92,5      |
| Volumen de reserva A             | 0         | 100       | 0         | 0         | 0         |
| Volumen de reserva B             | 0         | 0         | 100       | 0         | 0         |
| Volumen de reserva C             | 0         | 0         | 0         | 100       | 0         |
| Volumen de reserva D             | 0         | 0         | 0         | 0         | 8         |
| Concentración de dmPGE2          | 1 mM      | 500 uM    | 250 uM    | 125 uM    | 10 uM     |
| Para una concentración final de: | 100 uM    | 50 uM     | 25 uM     | 12,5 uM   | 1 uM      |
| Añadir 10 ul de:                 | Reserva A | Reserva B | Reserva C | Reserva D | Reserva E |

**EJEMPLO 4****ENSAYOS DE VALIDACIÓN**

Preparación de células para los ensayos de validación

Después de 24 horas de cultivo con el virus y dmPGE2, las células se lavaron antes de los ensayos de validación funcionales posteriores. El lavado se realizó transfiriendo las células a una placa de 96 pocillos con fondo en U y centrifugando durante 5 minutos a 1.500 rpm en una centrífuga de mesa convencional. Se aspiró el medio y las células se resuspendieron en 200 µl de SCGM. Las células se centrifugaron de nuevo durante 5 minutos a 1.500 rpm y se aspiró el medio. Las células se resuspendieron de nuevo en 200 µl de SCGM, a continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 rpm, y se aspiró de nuevo el medio. A continuación se describen los ensayos concretos de validación funcional.

Cultivo líquido de 7 días

Las células lavadas se resuspendieron en 200 µl de SCGM + 1x citocinas (como se describe en el Ejemplo 1) y se transfirieron a una placa de cultivo tisular no adherente de 12 pocillos convencional que contenía de 800 µl adicionales de SCGM + 1x citocinas. Las células se mantuvieron durante 6 días más en una incubadora de cultivo tisular humidificada convencional (CO<sub>2</sub> al 5%) y, a continuación, se sometieron a análisis del número de copias del vector (Ejemplo 5) y a análisis FACS. Para el análisis FACS, las células se ensayaron para determinar la presencia de un transgén codificado por virus, proteína fluorescente verde (GFP). La frecuencia de las células marcadas con virus dentro del conjunto de células cultivadas se cuantificó como la frecuencia de células GFP+ dentro de la población. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia media de las células marcadas. En la Tabla 3 se muestran los resultados del ensayo de cultivo líquido de 7 días con concentraciones variables de dmPGE2.

Evaluación de la actividad de unidades formadoras de colonias en metilcelulosa

Las células lavadas se resuspendieron en 200 µl de SCGM y, a continuación, se transfirieron a alícuotas de 3 ml de metilcelulosa complementada con citocinas (por ejemplo, Methocult M4434 Classic). A continuación, se transfirieron 1,5 ml a placas de cultivo tisular de 35 mm paralelas mediante una aguja de calibre 16 roma. Las placas se mantuvieron en una incubadora de cultivo tisular humidificada convencional durante 14-16 días y las colonias se puntuaron para el tamaño, la morfología y la composición celular. A continuación, se escogieron colonias individuales para un posterior análisis del número de copias del vector (Ejemplo 5) o se agrupó el contenido de toda una placa de 35 mm y, a continuación, se sometió a análisis del número de copias del vector (Ejemplo 5).

Células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC)

Las células se resuspendieron en 200 µl de SCGM, se realizó el recuento y, a continuación, se transfirieron a una capa estromal MS-5 previamente sembrada a diversas diluciones (2.000; 1.000; 500; 250; 125; 62; 31; 16 células por pocillo en 200 µl de StemSpan SFEM (StemCell Technologies, nº de cat. 09650), complementado con Pen-Strep 100 U/ml-100 µg/ml) y 24 réplicas por dilución. A intervalos semanales, se sustituían 100 µl por 100 µl de medio recién preparado. A las 5 semanas, se recogieron los cultivos. Se desecharon 100 µl, las células se lavaron bien con los 100 µl restantes y el pocillo se aclaró con 50 µl de medio recién preparado, y se sembró todo el contenido en Methocult™ H4434; se homogeneizaron 150 µl de suspensión de células con 600 µl de Methocult H4434 y se sembraron en un pocillo de una placa de 12 pocillos durante 14 días. A continuación, se realizó el recuento de colonias. El número de pocillos que contenían al menos una colonia (> 40 células) y el número total de pocillos analizados para cada dilución se utilizaron para calcular la frecuencia de las LTC-IC y el intervalo de confianza del 95% mediante el software L-calc (Stem Cell Technologies). Se llevaron 100 colonias de cada grupo de tratamiento a 100 pocillos diferentes y se puntuaron individualmente para la presencia del vector. Se agruparon 100 colonias de cada grupo de tratamiento, se extrajo el ADN genómico y se evaluó el VCN medio mediante qPCR (Ejemplo 5).

Trasplante en ratones NOD/SCID Gamma (NSG)

Para determinar si dmPGE2 promueve la transducción viral de las células madre hematopoyéticas con capacidad de autorrenovación a largo plazo humanas con toxicidad residual mínima, las células transducidas se lavaron y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se trasplantaron a la vena caudal de ratones NSG adultos irradiados. Se alojó a los animales en un entorno libre de patógenos según las directrices para el cuidado de animales del IACUC convencionales. En momentos escalonados, se cuantificó la contribución procedente del donante humano a la sangre periférica recogiéndola del ratón mediante protocolos convencionales. En resumen, los glóbulos rojos se sembraron con dextrano al 2% y, a continuación, el sobrenadante se eliminó adicionalmente mediante tratamiento con tampón de lisis de glóbulos rojos. A continuación, se tiñeron las células mononucleares con anticuerpos conjugados con fluoróforo como describen Majeti, *et al.*, Cell Stem Cell 2007, y se analizaron mediante citometría de flujo en un LSR-II (Becton Dickinson).

Análisis del sitio de integración

Para determinar si dmPGE2 cambia la preferencia del sitio de integración del vector lentiviral, se sometieron muestras de médula ósea de ratones trasplantados con células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas

transducidas con virus tratados con dmPGE2 y con tratamiento simulado, a PCR precedida de una amplificación lineal (Cartier, (2009) Science 326(5954):818-23). En resumen, 1 ng-1.000 ng de ADN hicieron de molde para la PCR lineal utilizando cebadores biotinilados específicos de LTR retrovirales. Los productos de la PCR lineal se separaron con perlas paramagnéticas. Se llevaron a cabo, en fase semisólida, otra síntesis de la segunda cadena de ADN, digestión de restricción (Tsp509I, NlaIII o HpyCH4IV) y ligación de un casete conector, seguido de dos etapas de PCR exponenciales adicionales. Los amplicones LAM-PCR resultantes se prepararon adicionalmente para la pirosecuenciación 454 (GS Flx; Roche Diagnostics) realizando una PCR exponencial adicional para añadir los cebadores A y B de amplificación y secuenciación específicos de GS Flx a ambos extremos de los amplicones LAM-PCR. El diseño de los cebadores se realizó según lo sugerido por el fabricante. Se incorporó al cebador A una secuencia de reconocimiento de 6 bases para analizar simultáneamente diferentes muestras en una única corrida de secuenciación. Se utilizaron 40 ng de productos de LAM-PCR purificados. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 120 s a 95°C; 12 ciclos a 95°C, durante 45 s, 60°C durante 45 s y 72°C durante 60 s; elongación final de 300 s a 72°C. Las secuencias de amplicón LAM-PCR se recortaron y se alinearon mediante BLAST.

#### EJEMPLO 5

#### ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIAS DEL VECTOR

En resumen, se aisló el ADN genómico total a partir de las células mediante protocolos convencionales (por ejemplo, mediante columnas DNEasy de Qiagen). El ADN genómico se sometió a reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) con sondas TaqMan para LTR viral y beta-actina humana. Los valores de Ct para la señal viral y la señal de beta-actina se normalizaron a un control normalizado, y se calculó el número de copias virales por copia de beta-actina. Se observó una relación lineal entre el número de copias del vector y la intensidad media de fluorescencia (Ejemplo 4) cuando se utilizó un constructo viral que codifica GFP. En las Tablas 3A-C se muestran los resultados del análisis del número de copias del vector (VCN) con concentraciones variables de dmPGE2.

Las Tablas 3A-C indican la respuesta a la dosis de dmPGE2 en la promoción de la transducción viral de las células CD34+ para tres experimentos independientes. Se descongelaron células CD34+ y se preestimularon con SCF, TPO, FltL e IL-3, a continuación se transdujeron (A) con el lentivirus GFP+ a una multiplicidad de infección de 25, (B) con el lentivirus GFP+ a una multiplicidad de infección de 5, o (C) se transdujeron con un lentivirus de expresión de ALD (ABCD1) a una multiplicidad de infección de 25. Las células se expusieron a dmPGE2 durante la etapa de transducción viral (24-48 horas de cultivo). A continuación, las células se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo y PCR después de aproximadamente 1 semana en cultivo. Se indica el porcentaje de células positivas para GFP (A, B) o ALD (C) mediante tinción FACS, junto con la intensidad media de fluorescencia (MFI) y el número de copias del vector (VCN) (A, B).

**TABLA 3A: GFP MOI 25**

| Conc. de dmPGE2 | % de positivas (GFP) | MFI          | VCN   |
|-----------------|----------------------|--------------|-------|
| 100 uM          | 81,53                | 1.513.504,00 | 3,55  |
| 50 uM           | 67,62                | 977.806,75   | 2,2   |
| 25 uM           | 59,99                | 845.691,00   | 1,7   |
| 12,5 uM         | 54,71                | 759.442,75   | 1,5   |
| 0 uM            | 30,07                | 583.079,25   | 0,535 |
| Sin virus       | 0,02                 | 290.577,50   | N.D.  |

**TABLA 3B: GFP MOI 5**

| Conc. de dmPGE2 | % de positivas (GFP) | MFI        | VCN   |
|-----------------|----------------------|------------|-------|
| 100 uM          | 42,97                | 732.716,25 | 0,83  |
| 50 uM           | 36,80                | 656.703,50 | 0,715 |
| 25 uM           | 18,69                | 562.428,00 | 0,21  |
| 12,5 uM         | 17,84                | 530.218,50 | 0,18  |
| 0 uM            | 9,05                 | 477.691,00 | 0,025 |
| Sin virus       | 0,02                 | 290.577,50 | N.D.  |

TABLA 3C: ABCD1 MOI 25

| Conc. de dmPGE2 | % de positivas |
|-----------------|----------------|
| 100 uM          | 72,26          |
| 50 uM           | 56,10          |
| 25 uM           | 43,76          |
| 12,5 uM         | 45,36          |
| 1 uM            | 34,13          |
| 0 uM            | 21,44          |

## EJEMPLO 6

## EVOLUCIÓN TEMPORAL Y RESPUESTA A LA DOSIS DE DMPGE2 EN LA PROMOCIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN VIRAL DE CÉLULAS CD34+

Se descongelaron células MCD-34+ y se preestimularon con SCF, TPO, FltL e IL-3, y a continuación se transdujeron con el lentivirus GFP+ a una multiplicidad de infección de 25. Las células se expusieron a dmPGE2 durante la etapa de transducción viral (24-25 horas de cultivo; 24-26 horas de cultivo; 24-28 horas de cultivo, o 24-48 horas de cultivo) y, a continuación, se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo después de aproximadamente 1 semana en cultivo. Como alternativa, las células se expusieron a dmPGE2 durante la etapa de preestimulación (22-24 horas de cultivo; 23-24 horas de cultivo). En la Tabla 4 se indica el porcentaje de células positivas para GFP.

TABLA 4

| Conc. de dmPGE2 | Virus y PGE2 |          |          | Preestim. con PGE2 |           |            |
|-----------------|--------------|----------|----------|--------------------|-----------|------------|
|                 | Más 1 hr     | Más 2 hr | Más 4 hr | 24 hr              | Menos 2hr | Menos 1 hr |
| 100 uM          | 2,48         | 4,02     | 21,57    | 76,44              | 34,85     | 25,14      |
| 50 uM           | 1,85         | 4,23     | 27,45    | 54,63              | 31,85     | 22,98      |
| 25 uM           | 1,76         | 4,76     | 27,46    | 50,69              | 31,90     | 24,05      |
| 12,5 uM         | 1,97         | 5,32     | 28,08    | 47,42              | 30,64     | 22,13      |
| 1 uM            | 2,94         | 7,17     | 21,10    | 32,03              | 25,74     | 22,29      |
| 0 uM            | 3,14         | 7,05     | 13,61    | 20,79              | 20,69     | 21,31      |

## EJEMPLO 7

## CORRECCIÓN DE LA BETA-TALASEMIA O LA DREPANOCITEMIA DESPUÉS DE LA TRANSDUCCIÓN DE HSC CON VECTORES LENTIVIRALES EN PRESENCIA DE DMPGE2

Se recogerá mediante aféresis sangre periférica movilizada de los pacientes con su consentimiento informado y según los protocolos autorizados del Comité Institucional de Revisión (IRB). Se utilizará un gradiente de Ficoll A para eliminar los eritrocitos, y se obtendrán células enriquecidas en CD34 después de la selección de CD34+ utilizando el sistema Miltenyi CliniMACs (Miltenyi Biotec). Las células se preestimularán con FltL, TPO, IL-3 y SCF humano a una concentración de aproximadamente 4E6 células/ml durante 18-24 horas. A continuación, las células se transducirán con Lentiglobin GTP, que alberga un gen de  $\beta$ -globina-T87Q humana, a una multiplicidad de infección de 25 durante 18-24 horas en presencia de SCF, FltL, TPO, IL-3, sulfato de protamina y dmPGE2.

Después de la transducción, se extrae una porción de las células para las pruebas de liberación, y el remanente se crioconserva y se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Como parte de las pruebas de liberación, las células transducidas para un individuo se someten a continuación a cultivo de 7 días y análisis VCN (Ejemplo 1) para verificar de 0,5 a 3 copias por promedio de células, así como una eficiencia de transducción  $> 50\%$ . Tras unas pruebas de liberación satisfactorias, los pacientes se someten a tratamiento con busulfán y ciclofosfamida.

A continuación, se administra al sujeto la dosis de células CD34+ autólogas por vía intravenosa en una sola dosis intravenosa de  $> 3 \times 10^6$  células CD34+/kg. Se hace seguimiento diario a los pacientes en la unidad de trasplantes para detectar eventos adversos y determinar los parámetros de laboratorio para controlar el prendimiento de la médula ósea.

Una vez se produce el prendimiento y los pacientes están estables, se les dará de alta en el hospital y se les hará seguimiento mensual durante 6 meses y al menos cada 3 meses durante un total de 24 meses. Las evaluaciones incluirán hematología rutinaria y evaluación de las pruebas de seguridad química y pruebas hematológicas especiales, examen de médula ósea, recopilación de eventos adversos y medicaciones concomitantes, y evaluación de parámetros hematológicos y clínicos específicos de la enfermedad específica.

Los criterios de valoración principales son la seguridad y la tolerabilidad de la infusión de células transducidas con Lentiglobin y el tiempo hasta el prendimiento de las células CD34+ manipuladas autólogas. Los criterios de valoración adicionales incluyen mediciones biológicas y bioquímicas de la presencia del gen transducido y del producto génico en las células hematopoyéticas y sanguíneas, las necesidades de transfusión, y el número de hospitalizaciones y eventos clínicos que se producen en diversos períodos de tiempo a lo largo del período de seguimiento de 2 años. Se hará seguimiento de todos los pacientes al menos anualmente durante un total de 15 años después del trasplante para la detección de eventos adversos graves, las pruebas de RCL, y la creación de bancos de células sanguíneas para las pruebas de mutagénesis por inserción en el caso de que se desarrolle un cáncer.

#### EJEMPLO 8

#### CORRECCIÓN DE LA ADRENOLEUCODISTROFIA DESPUÉS DE LA TRANSDUCCIÓN DE HSC CON VECTORES LENTIVIRALES EN PRESENCIA DE DMPGE2

Se recogerá mediante aféresis sangre periférica movilizada de los pacientes con su consentimiento informado y según los protocolos autorizados del Comité Institucional de Revisión (IRB). Se utilizará un gradiente de Ficoll A para eliminar los eritrocitos, y se obtendrán células enriquecidas en CD34 después de la selección de CD34+ utilizando el sistema Miltenyi CliniMACs (Miltenyi Biotec). Las células se preestimarán con, FltL, TPO, IL-3 y SCF humano a una concentración de aproximadamente 4E6 células/ml durante 18-24 horas. A continuación, las células se transducirán con Lenti-D GTP, que alberga un gen ABCD1 humano, a una multiplicidad de infección de 25 durante 18-24 horas en presencia de SCF, FltL, TPO, IL-3, sulfato de protamina y dmpGE2.

Después de la transducción, se extrae una porción de células para las pruebas de liberación, y el remanente se crioconserva y se almacena a -80°C. Como parte de las pruebas de liberación, las células transducidas para un individuo se someten a continuación a cultivo de 7 días y análisis VCN (Ejemplo 1) para verificar de 0,5 a 3 copias por promedio de células, así como una eficiencia de transducción > 50%. Tras unas pruebas de liberación satisfactorias, los pacientes se someterán a tratamiento con busulfán y ciclofosfamida.

A continuación, se administra al sujeto la dosis de células CD34+ autólogas por vía intravenosa en una sola dosis intravenosa de  $> 3 \times 10^6$  células CD34+/kg. Se hace seguimiento diario a los pacientes en la unidad de trasplantes para detectar eventos adversos y determinar los parámetros de laboratorio para controlar el prendimiento de la médula ósea.

Una vez se produce el prendimiento y los pacientes están estables, se les dará de alta en el hospital y se les hará seguimiento mensual durante 6 meses y al menos cada 3 meses durante un total de 24 meses. Las evaluaciones incluirán hematología rutinaria y evaluación de las pruebas de seguridad química y pruebas hematológicas especiales, examen de médula ósea, recopilación de eventos adversos y medicaciones concomitantes, y evaluación de parámetros hematológicos y clínicos específicos de la enfermedad específica.

Los criterios de valoración principales son la seguridad y la tolerabilidad de la infusión de células transducidas con Lenti-D y el tiempo hasta el prendimiento de las células CD34+ manipuladas autólogas. Los criterios de valoración adicionales incluyen mediciones biológicas y bioquímicas de la presencia del gen transducido y del producto génico en las células hematopoyéticas y sanguíneas, RM cerebral, y estudios de cognitivos, y el número de hospitalizaciones y eventos clínicos que se producen en diversos períodos de tiempo a lo largo del período de seguimiento de 2 años. Se hará seguimiento de todos los pacientes al menos anualmente durante un total de 15 años después del trasplante para la detección de eventos adversos graves, las pruebas de RCL, y la creación de bancos de células sanguíneas para las pruebas de mutagénesis por inserción en el caso de que se desarrolle un cáncer.

Como reconocerá fácilmente el experto en la materia después de leer la presente divulgación, pueden realizarse numerosas modificaciones en las formas de realización a la luz de la anterior descripción detallada. En general, en las siguientes reivindicaciones, no debe interpretarse que los términos usados limitan las reivindicaciones a las realizaciones específicas divulgadas en la especificación y las reivindicaciones, sino que debe interpretarse que incluyen todas las realizaciones posibles junto con el alcance completo de equivalentes a los que tales reivindicaciones tienen derecho.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110 bluebird bio, Inc.  
Heffner, Garrett Collins  
Bassan, Abraham Isaac

<120> COMPUESTOS PARA TRANSDUCCIÓN VIRAL MEJORADA

<130> P068943EP  
 <140> No asignado todavía  
 <141> 2012-09-28  
 5  
 <150> US 61/541.736  
 <151> 30-09-2011  
 10  
 <160> 18  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 15  
 <210> 1  
 <211> 576  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 1  
 20  
 actctttctgg tccccacaga ctcagagaga acccaccatg gtgctgtctc ctgccgacaa 60  
 gaccaacgtc aaggccgcct ggggtaaggt cggcgcgcac gctggcgagt atggtgcgga 120  
 ggccctggag aggatgttcc tgtccttccc caccaccaag acctacttcc cgcaettcga 180  
 25  
 cctgagccac ggctctgccc aggttaaggg ccacggcaag aaggtggccg acgcgctgac 240  
 caacgccgtg gcgcacgtgg acgacatgcc caacgcgctg tccgccctga gcgacctgca 300  
 cgcgcacaaag cttcgggtgg acccgggtcaa cttcaagctc ctaagccact gcctgctggt 360  
 30  
 gaccctggcc gccacacctc ccgccgagtt caccctgcg gtgcacgcct ccctggacaa 420  
 gttcctggct tctgtgagca ccgtgctgac ctccaaatac cgtaagctg gagcctcggg 480  
 35  
 ggccatgctt cttgccctt gggcctcccc ccagcccctc ctccccttcc tgcacccgta 540  
 cccccgtggt ctttgaataa agtctgagtg ggcggc 576  
 40  
 <210> 2  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 45  
 <400> 2

ES 2 769 270 T3

|    |                                                                                |
|----|--------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | Met Val Leu Ser Pro Ala Asp Lys Thr Asn Val Lys Ala Ala Trp Gly<br>1 5 10 15   |
| 10 | Lys Val Gly Ala His Ala Gly Glu Tyr Gly Ala Glu Ala Leu Glu Arg<br>20 25 30    |
| 15 | Met Phe Leu Ser Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe Asp<br>35 40 45    |
| 20 | Leu Ser His Gly Ser Ala Gln Val Lys Gly His Gly Lys Lys Val Ala<br>50 55 60    |
| 25 | Asp Ala Leu Thr Asn Ala Val Ala His Val Asp Asp Met Pro Asn Ala<br>65 70 75 80 |
| 30 | Leu Ser Ala Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro<br>85 90 95    |
| 35 | Val Asn Phe Lys Leu Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Ala<br>100 105 110 |
| 40 | His Leu Pro Ala Glu Phe Thr Pro Ala Val His Ala Ser Leu Asp Lys<br>115 120 125 |
| 45 | Phe Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg<br>130 135 140         |
| 50 | <210> 3<br><211> 142<br><212> PRT<br><213> <i>Mus musculus</i><br><br><400> 3  |

# ES 2 769 270 T3

|    |                                                                                |
|----|--------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | Met Val Leu Ser Gly Glu Asp Lys Ser Asn Ile Lys Ala Ala Trp Gly<br>1 5 10 15   |
| 10 | Lys Ile Gly Gly His Gly Ala Glu Tyr Gly Ala Glu Ala Leu Glu Arg<br>20 25 30    |
| 15 | Met Phe Ala Ser Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe Asp<br>35 40 45    |
| 20 | Val Ser His Gly Ser Ala Gln Val Lys Gly His Gly Lys Lys Val Ala<br>50 55 60    |
| 25 | Asp Ala Leu Ala Asn Ala Ala Gly His Leu Asp Asp Leu Pro Gly Ala<br>65 70 75 80 |
| 30 | Leu Ser Ala Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro<br>85 90 95    |
| 35 | Val Asn Phe Lys Leu Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Ser<br>100 105 110 |
| 40 | His His Pro Ala Asp Phe Thr Pro Ala Val His Ala Ser Leu Asp Lys<br>115 120 125 |
|    | Phe Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg<br>130 135 140         |
|    | <210> 4                                                                        |
|    | <211> 142                                                                      |
|    | <212> PRT                                                                      |
|    | <213> <i>Rattus norvegicus</i>                                                 |
|    | <400> 4                                                                        |

# ES 2 769 270 T3

|    |                           |            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Met                       | Val        | Leu        | Ser        | Ala        | Asp        | Asp | Lys | Thr | Asn | Ile | Lys | Asn | Cys | Trp | Gly |     |
|    | 1                         |            |            |            | 5          |            |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| 5  |                           | Lys        | Ile        | Gly        | Gly        | His        | Gly | Gly | Glu | Tyr | Gly | Glu | Glu | Ala | Leu | Gln | Arg |
|    |                           |            |            | 20         |            |            |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |
| 10 | Met                       | Phe        | Ala        | Ala        | Phe        | Pro        | Thr | Thr | Lys | Thr | Tyr | Phe | Ser | His | Ile | Asp |     |
|    |                           |            | 35         |            |            |            |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| 15 | Val                       | Ser        | Pro        | Gly        | Ser        | Ala        | Gln | Val | Lys | Ala | His | Gly | Lys | Lys | Val | Ala |     |
|    |                           | 50         |            |            |            |            | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| 20 | Asp                       | Ala        | Leu        | Ala        | Lys        | Ala        | Ala | Asp | His | Val | Glu | Asp | Leu | Pro | Gly | Ala |     |
|    | 65                        |            |            |            |            | 70         |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| 25 | Leu                       | Ser        | Thr        | Leu        | Ser        | Asp        | Leu | His | Ala | His | Lys | Leu | Arg | Val | Asp | Pro |     |
|    |                           |            |            |            | 85         |            |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| 30 | Val                       | Asn        | Phe        | Lys        | Phe        | Leu        | Ser | His | Cys | Leu | Leu | Val | Thr | Leu | Ala | Cys |     |
|    |                           |            |            | 100        |            |            |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
| 35 | His                       | His        | Pro        | Gly        | Asp        | Phe        | Thr | Pro | Ala | Met | His | Ala | Ser | Leu | Asp | Lys |     |
|    |                           |            | 115        |            |            |            |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| 40 | Phe                       | Leu        | Ala        | Ser        | Val        | Ser        | Thr | Val | Leu | Thr | Ser | Lys | Tyr | Arg |     |     |     |
|    |                           | 130        |            |            |            |            | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| 45 |                           |            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <210> 5                   |            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <211> 626                 |            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <212> ADN                 |            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i> |            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <400> 5                   |            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 45 |                           |            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | acatttgctt                | ctgacacaac | tgtgttcact | agcaacctca | aacagacacc | atggtgcatc |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 60  |
|    | tgactcctga                | ggagaagtct | gccgttactg | ccctgtgggg | caaggtgaac | gtggatgaag |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 120 |
| 50 | ttggtggtga                | ggccctgggc | aggctgctgg | tggctaccc  | ttggaccag  | aggttctttg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 180 |
|    | agtccttttg                | ggatctgtcc | actcctgatg | ctgttatggg | caaccctaag | gtgaaggctc |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 240 |
|    | atggcaagaa                | agtgctcggt | gcctttagtg | atggcctggc | tcacctggac | aacctcaagg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 300 |

# ES 2 769 270 T3

gcacctttgc cacactgagt gagctgcact gtgacaagct gcacgtggat cctgagaact 360  
 tcaggctcct gggcaacgtg ctggtctgtg tgctggccca tcactttggc aaagaattca 420  
 5 cccaccagt gcaggctgcc tatcagaaag tgggtggctgg tgtggctaata gccctggccc 480  
 acaagtatca ctaagctcgc tttcttgctg tccaatttct attaaagggt cctttgttcc 540  
 10 ctaagtccaa ctactaaact gggggatatt atgaagggcc ttgagcatct ggattctgcc 600  
 taataaaaaa catttatttt cattgc 626

15 <210> 6  
 <211> 147  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 6

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

# ES 2 769 270 T3

<210> 7  
 <211> 147  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

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

<210> 8  
 <211> 147  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

55

<400> 8

# ES 2 769 270 T3

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

<210> 9  
 <211> 147  
 <212> PRT  
 50 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 9

# ES 2 769 270 T3

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

<210> 10  
 <211> 583  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

# ES 2 769 270 T3

5  
10  
15  
20

```

acactcgctt ctggaacgtc tgaggttatc aataagctcc tagtccagac gccatgggtc      60
atttcacaga ggaggacaag gctactatca caagcctgtg gggcaagggtg aatgtggaag      120
atgctggagg agaaaccctg ggaaggctcc tggttgtcta cccatggacc cagaggttct      180
ttgacagctt tggcaacctg tcctctgcct ctgccatcat gggcaacccc aaagtcaagg      240
cacatggcaa gaagggtgctg acttccttgg gagatgccat aaagcacctg gatgatctca      300
agggcacctt tgcccagctg agtgaactgc actgtgacaa gctgcatgtg gatcctgaga      360
acttcaagct cctgggaaat gtgctggtga ccgttttggc aatccatttc ggcaaagaat      420
tcacccctga ggtgcaggct tcctggcaga agatggtgac tggagtggcc agtgcctgt      480
cctccagata ccaactgagct cactgcccac gatgcagagc tttcaaggat aggctttatt      540
ctgcaagcaa tcaaataata aatctattct gctaagagat cac                          583

```

25  
30

```

<210> 11
<211> 147
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

```

35  
40  
45  
50

```

Met Gly His Phe Thr Glu Glu Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ser Leu Trp
 1              5              10              15

Gly Lys Val Asn Val Glu Asp Ala Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu
          20              25              30

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Ser Phe Gly Asn
      35              40              45

Leu Ser Ser Ala Ser Ala Ile Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His
      50              55              60

Gly Lys Lys Val Leu Thr Ser Leu Gly Asp Ala Ile Lys His Leu Asp

```

# ES 2 769 270 T3

|    | 65    |                     | 70  |     | 75  |     | 80  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5  | Asp   | Leu                 | Lys | Gly | Thr | Phe | Ala | Gln | Leu | Ser | Glu | Leu | His | Cys | Asp | Lys |
|    |       |                     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |
| 10 | Leu   | His                 | Val | Asp | Pro | Glu | Asn | Phe | Lys | Leu | Leu | Gly | Asn | Val | Leu | Val |
|    |       |                     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| 15 | Thr   | Val                 | Leu | Ala | Ile | His | Phe | Gly | Lys | Glu | Phe | Thr | Pro | Glu | Val | Gln |
|    |       |                     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| 20 | Ala   | Ser                 | Trp | Gln | Lys | Met | Val | Thr | Gly | Val | Ala | Ser | Ala | Leu | Ser | Ser |
|    |       |                     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| 25 | Arg   | Tyr                 | His |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | 145   |                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 30 | <210> | 12                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <211> | 147                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <212> | PRT                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <213> | <i>Mus musculus</i> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | <400> | 12                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

# ES 2 769 270 T3

|    |                                                                                      |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | Met Val His Phe Thr Ala Glu Glu Lys Ala Ala Ile Thr Ser Ile Trp<br>1 5 10 15         |
| 10 | Asp Lys Val Asp Leu Glu Lys Val Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu<br>20 25 30          |
| 15 | Leu Ile Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Lys Phe Gly Asn<br>35 40 45          |
| 20 | Leu Ser Ser Ala Leu Ala Ile Met Gly Asn Pro Arg Ile Arg Ala His<br>50 55 60          |
| 25 | Gly Lys Lys Val Leu Thr Ser Leu Gly Leu Gly Val Lys Asn Met Asp<br>65 70 75 80       |
| 30 | Asn Leu Lys Glu Thr Phe Ala His Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys<br>85 90 95          |
| 35 | Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Lys Leu Leu Gly Asn Met Leu Val<br>100 105 110       |
| 40 | Ile Val Leu Ser Thr His Phe Ala Lys Glu Phe Thr Pro Glu Val Gln<br>115 120 125       |
| 45 | Ala Ala Trp Gln Lys Leu Val Ile Gly Val Ala Asn Ala Leu Ser His<br>130 135 140       |
|    | Lys Tyr His<br>145                                                                   |
|    | <210> 13<br><211> 147<br><212> PRT<br><213> <i>Rattus norvegicus</i><br><br><400> 13 |

# ES 2 769 270 T3

5 Met Val His Phe Thr Ala Glu Glu Lys Ala Ala Ile Ile Ser Ile Trp  
 1 5 10 15  
 10 Glu Lys Val Asp Leu Glu Lys Ile Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu  
 20 25 30  
 15 Leu Ile Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Lys Phe Gly Asn  
 35 40 45  
 20 Leu Ser Ser Ala Leu Ala Ile Met Gly Asn Pro Arg Ile Arg Ala His  
 50 55 60  
 25 Gly Lys Lys Val Leu Thr Ser Leu Gly Ser Ala Val Glu Asn Met Asp  
 65 70 75 80  
 30 Asn Leu Lys Glu Thr Phe Ala His Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys  
 85 90 95  
 35 Leu His Val Asp Pro Gln Asn Phe Lys Leu Leu Gly Asn Met Leu Val  
 100 105 110  
 40 Ile Val Leu Ser Thr His Phe Ala Lys Glu Phe Thr Pro Glu Val Gln  
 115 120 125  
 45 Ala Ala Trp Gln Lys Leu Val Met Gly Val Ala Asn Ala Leu Ser His  
 130 135 140  
 50 Lys Tyr His  
 145  
 <210> 14  
 <211> 774  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 14

# ES 2 769 270 T3

```

      agggcaagtt aagggaatag tggaatgaag gttcattttt cattctcaca aactaatgaa      60
5      accctgctta tcttaaacca acctgctcac tggagcaggg aggacaggac cagcataaaa      120

      ggcagggcag agtcgactgt tgcttacact ttcttctgac ataacagtgt tcactagcaa      180
10     cctcaaacag acaccatggg gcatctgact cctgaggaga agactgctgt caatgccctg      240
      tggggcaaag tgaacgtgga tgcagttggg ggtgaggccc tgggcagatt actggtgggc      300
      tacccttgga cccagagggt ctttgagtcc tttggggatc tgcctctcc tgatgctgtt      360
15     atgggcaacc ctaagtgaa ggctcatggc aagaaggtgc taggtgcctt tagtgatggc      420
      ctggctcacc tggacaacct caagggcact ttttctcagc tgagtgagct gcactgtgac      480
20     aagctgcacg tggatcctga gaacttcagg ctcttgggca atgtgctggt gtgtgtgctg      540
      gcccgcaact ttggcaagga attcacccca caaatgcagg ctgcctatca gaaggtggtg      600
      gctggtgtgg ctaatgccct ggctcacaag taccattgag atcctggact gtttctgat      660
25     aaccataaga agaccctatt tccctagatt ctattttctg aacttgggaa cacaatgcct      720
      acttcaaggg tatggcttct gcctaataaa gaatgttcag ctcaacttcc tgat      774

```

```

30     <210> 15
      <211> 147
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens

35     <400> 15

```

```

40     Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Thr Ala Val Asn Ala Leu Trp
      1          5          10          15

      Gly Lys Val Asn Val Asp Ala Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu
      20          25          30

45     Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp
      35          40          45

50     Leu Ser Ser Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His
      50          55          60

55     Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp
      65          70          75          80

60     Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ser Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
      85          90          95

      Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val
      100         105         110

65     Cys Val Leu Ala Arg Asn Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Gln Met Gln
      115         120         125

```

# ES 2 769 270 T3

Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His  
130 135 140

5

Lys Tyr His  
145

10 <210> 16  
<211> 2297  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 16

ccagccccag tccctacgcg gcagccagcc caggtgacat gccggtgctc tccaggcccc 60  
ggccctggcg ggggaacacg ctgaagcgca cggcogtgct cctggccctc ggggcctatg 120  
20 gagcccacaa agtctacccc ttggtgcgcc agtgcctggc cccggccagg ggtcttcagg 180  
cgcccgcccg ggagcccacg caggaggcct ccggggctcg gccggccaaa gctggcatga 240  
25 accgggtatt cctgcagcgg ctccctgtggc tcctgcggct gctgttcccc cgggtcctgt 300  
gccgggagac ggggctgctg gccctgcact cggccgcctt ggtgagccgc accttcctgt 360  
cgggtgatgt ggcccgctg gacggaaggc tggcccgctg catcgccgc aaggaccgc 420  
30 gggcttttgg ctggcagctg ctgcagtggc tcctcatcgc cctccctgct accttcgtca 480  
acagtgccat ccgttacctg gagggccaac tggccctgtc gttccgcagc cgtctggtgg 540  
35 cccacgccta ccgcctctac ttctcccagc agacctacta ccgggtcagc aacatggacg 600  
ggcggcttcg caacctgac cagtctctga cggaggacgt ggtggccttt ggggcctctg 660  
tggcccacct ctactccaac ctgaccaagc cactcctgga cgtggctgtg acttcctaca 720  
40 ccctgcttcg ggcggcccg ccccgtggag ccggcacagc ctggccctcg gccatcgccg 780  
gcctcgtggt gttcctcacg gccaacgtgc tgcgggcctt ctgcccacg ttoggggagc 840  
45 tgggtggcaga ggaggcgcg cggaagggg agctgcgcta catgcactcg cgtgtggtgg 900  
ccaactcgga ggagatcgcc ttctatggg gccatgaggt ggagctggcc ctgctacagc 960  
gctcctacca ggacctggcc tcgcagatca acctcatcct tctggaacgc ctgtggtatg 1020  
50 ttatgctgga gcagttcctc atgaagtatg tgtggagcgc ctcgggcctg ctcatggtgg 1080  
ctgtcccat catcactgcc actggctact cagagtcaga tgcagaggcc gtgaagaagg 1140  
55 cagccttga aaagaaggag gaggagctgg tgagcgagcg cacagaagcc ttcactattg 1200  
cccgaacct cctgacagcg gctgcagatg ccattgagcg gatcatgtcg tcgtacaagg 1260  
aggtgacgga gctggctggc tacacagccc ggggtgcacga gatgttccag gtatttgaag 1320  
60 atgttcagcg ctgtcacttc aagaggccca gggagctaga ggacgctcag gcggggctctg 1380  
ggaccatagg ccggtctggt gtccgtgtgg agggccccct gaagatccga ggccaggtgg 1440  
65 tggatgtgga acaggggatc atctgcgaga acatcccat cgtcacgccc tcaggagagg 1500

# ES 2 769 270 T3

5 tgggtggtggc cagcctcaac atcaggggtgg aggaaggcat gcatctgctc atcacaggcc 1560  
 ccaatggctg cggcaagagc tccctgttcc ggatcctggg tgggctctgg cccacgtacg 1620  
 gtggtgtgct ctacaagccc ccaccccagc gcatgttcta catcccgcag aggccctaca 1680  
 tgtctgtggg ctccctgcgt gaccaggtga tctacccgga ctcaagtggag gacatgcaaa 1740  
 10 ggaagggcta ctcgagcag gacctggaag ccatcctgga cgtcgtgcac ctgcaccaca 1800  
 tcctgcagcg ggagggaggt tgggaggcta tgtgtgactg gaaggacgtc ctgtcgggtg 1860  
 gcgagaagca gagaatcggc atggcccgcga tgttctacca caggcccaag tacgccctcc 1920  
 15 tggatgaatg caccagcgcc gtgagcatcg acgtggaagg caagatcttc caggcggcc 1980  
 aggacgcggg cattgccctg ctctccatca cccaccggcc ctccctgtgg aaataccaca 2040  
 20 cacacttgct acagttcgat ggggagggcg gctggaagtt cgagaagctg gactcagctg 2100  
 cccgcctgag cctgacggag gagaagcagc ggctggagca gcagctggcg ggcattccca 2160  
 25 agatgcagcg gcgcctccag gagctctgcc agatcctggg cgaggccgtg gcccagcgcg 2220  
 atgtgccggc acctagcccg caaggccctg gtggcctcca gggcgccctc acctgactcg 2280  
 aggggggggcc cgtacc 2297

30  
 <210> 17  
 <211> 2238  
 <212> ADN  
 35 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 17

40 atgccggtgc tctccaggcc ccggccctgg cgggggaaca cgctgaagcg caccggccgtg 60  
 ctccctggccc tcgcggccta tggagccac aaagtctacc ccttgggtgcg ccagtgcctg 120  
 gcccgggcca ggggtcttca ggcccccgcg ggggagccca cgcaggagcg ctccggggtc 180  
 45 gcggcgggcca aagctggcat gaaccgggta ttcctgcagc ggctcctgtg gctcctgcgg 240  
 ctgctgttcc cccgggtcct gtgccgggag acgggggtgc tggccctgca ctcgcccgcc 300  
 ttggtgagcc gcaccttct gtccgtgtat gtggcccgcc tggacggaag gctggcccg 360  
 50 tgcacgtcc gcaaggaccc gcgggctttt ggctggcagc tgcctgcagt gctcctcatc 420  
 gccctccctg ctaccttct caacagtgc atccgttacc tggagggcca actggccctg 480  
 tcgttccgca gccgtctggt ggcccacgcc taccgcctct acttctccca gcagacctac 540  
 55 taccgggtca gcaacatgga cgggcggctt cgcaaccctg accagtctct gacggaggac 600  
 gtggtggcct ttgcggcctc tgtggccac ctctactcca acctgaccaa gccactcctg 660  
 60 gacgtggctg tgacttcta caccctgctt cgggcggccc gctcccggtg agccggcaca 720  
 gcctggccct cggccatgc cggcctcgtg gtgttctca cggccaacgt gctgcggg 780  
 ttctcgccca agttcgggga gctggtggca gaggagggcg ggcggaaggg ggagctgcgc 840

ES 2 769 270 T3

|    |             |            |            |             |            |            |      |
|----|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| 5  | tacatgcact  | cgcgtgtggt | ggccaactcg | gaggagatcg  | ccttctatgg | gggccatgag | 900  |
|    | gtggagctgg  | ccctgctaca | gcgctcctac | caggacctgg  | cctcgcagat | caacctcatc | 960  |
|    | cttctggaac  | gcctgtggta | tgttatgctg | gagcagttcc  | tcatgaagta | tgtgtggagc | 1020 |
| 10 | gcctcggggc  | tgctcatggt | ggctgtcccc | atcatcactg  | ccactggcta | ctcagagtca | 1080 |
|    | gatgcagagg  | ccgtgaagaa | ggcagccttg | gaaaagaagg  | aggaggagct | ggtgagcgag | 1140 |
|    | cgcacagaag  | ccttcactat | tgcccgcaac | ctcctgacag  | cggtctgaga | tgccattgag | 1200 |
| 15 | cggatcatgt  | cgtcgtacaa | ggaggtgacg | gagctggctg  | gctacacagc | ccgggtgcac | 1260 |
|    | gagatgttcc  | aggtatttga | agatgttcag | cgctgtcact  | tcaagaggcc | cagggagcta | 1320 |
|    | gaggacgctc  | aggcggggtc | tgggaccata | ggccgggtctg | gtgtccgtgt | ggagggcccc | 1380 |
| 20 | ctgaagatcc  | gaggccaggt | ggtggatgtg | gaacagggga  | tcatctgcga | gaacatcccc | 1440 |
|    | atcgtcacgc  | cctcaggaga | ggtggtggtg | gccagcctca  | acatcagggt | ggaggaaggc | 1500 |
|    | atgcatctgc  | tcatcacagg | ccccaatggc | tgcggaaga   | gctccctgtt | ccggatcctg | 1560 |
| 25 | ggtgggctct  | ggccccacgt | cggtggtgtg | ctctacaagc  | ccccaccca  | gcgcatgttc | 1620 |
|    | tacatcccg   | agaggcccta | catgtctgtg | ggctccctgc  | gtgaccaggt | gatctacccg | 1680 |
|    | gactcagtgg  | aggacatgca | aaggaagggc | tactcggagc  | aggacctgga | agccatcctg | 1740 |
| 30 | gacgtcgtgc  | acctgcacca | catcctgcag | cgggaggag   | gttgggaggc | tatgtgtgac | 1800 |
|    | tggaaggacg  | tcctgtcggg | tggcgagaag | cagagaatcg  | gcatggccc  | catgttctac | 1860 |
|    | cacaggccca  | agtacgccct | cctggatgaa | tgcaccagcg  | ccgtgagcat | cgacgtggaa | 1920 |
| 35 | ggcaagatct  | tccaggcggc | caaggacgcg | ggcattgcc   | tgctctccat | caccacccgg | 1980 |
|    | ccctccctgt  | ggaaatacca | cacacacttg | ctacagttcg  | atggggaggg | cggctggaag | 2040 |
|    | ttcgagaagc  | tggactcagc | tgcccgctg  | agcctgacgg  | aggagaagca | gcggtggag  | 2100 |
| 40 | cagcagctgg  | cgggcattcc | caagatgcag | cggcgccctc  | aggagctctg | ccagatcctg | 2160 |
|    | ggcgaggccg  | tggccccagc | gcatgtgccg | gcacctagcc  | cgcaaggccc | tggtggcctc | 2220 |
|    | caggggtgcct | ccacctga   |            |             |            |            | 2238 |

<210> 18  
<211> 745  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Met Pro Val Leu Ser Arg Pro Arg Pro Trp Arg Gly Asn Thr Leu Lys  
1 5 10 15

Arg Thr Ala Val Leu Leu Ala Leu Ala Ala Tyr Gly Ala His Lys Val  
20 25 30

# ES 2 769 270 T3

Tyr Pro Leu Val Arg Gln Cys Leu Ala Pro Ala Arg Gly Leu Gln Ala  
 35 40 45  
 5  
 Pro Ala Gly Glu Pro Thr Gln Glu Ala Ser Gly Val Ala Ala Ala Lys  
 50 55 60  
 10  
 Ala Gly Met Asn Arg Val Phe Leu Gln Arg Leu Leu Trp Leu Leu Arg  
 65 70 75 80  
 15  
 Leu Leu Phe Pro Arg Val Leu Cys Arg Glu Thr Gly Leu Leu Ala Leu  
 85 90 95  
 20  
 His Ser Ala Ala Leu Val Ser Arg Thr Phe Leu Ser Val Tyr Val Ala  
 100 105 110  
 25  
 Arg Leu Asp Gly Arg Leu Ala Arg Cys Ile Val Arg Lys Asp Pro Arg  
 115 120 125  
 30  
 Ala Phe Gly Trp Gln Leu Leu Gln Trp Leu Leu Ile Ala Leu Pro Ala  
 130 135 140  
 35  
 Thr Phe Val Asn Ser Ala Ile Arg Tyr Leu Glu Gly Gln Leu Ala Leu  
 145 150 155 160  
 40  
 Ser Phe Arg Ser Arg Leu Val Ala His Ala Tyr Arg Leu Tyr Phe Ser  
 165 170 175  
 45  
 Gln Gln Thr Tyr Tyr Arg Val Ser Asn Met Asp Gly Arg Leu Arg Asn  
 180 185 190  
 50  
 Pro Asp Gln Ser Leu Thr Glu Asp Val Val Ala Phe Ala Ala Ser Val  
 195 200 205  
 55  
 Ala His Leu Tyr Ser Asn Leu Thr Lys Pro Leu Leu Asp Val Ala Val  
 210 215 220  
 60  
 Thr Ser Tyr Thr Leu Leu Arg Ala Ala Arg Ser Arg Gly Ala Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Ala Trp Pro Ser Ala Ile Ala Gly Leu Val Val Phe Leu Thr Ala Asn  
 245 250 255  
 Val Leu Arg Ala Phe Ser Pro Lys Phe Gly Glu Leu Val Ala Glu Glu  
 260 265 270  
 Ala Arg Arg Lys Gly Glu Leu Arg Tyr Met His Ser Arg Val Val Ala

# ES 2 769 270 T3

|    | 275                                                                                | 280 | 285 |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 5  | Asn Ser Glu Glu Ile Ala Phe Tyr Gly Gly His Glu Val Glu Leu Ala<br>290 295 300     |     |     |
| 10 | Leu Leu Gln Arg Ser Tyr Gln Asp Leu Ala Ser Gln Ile Asn Leu Ile<br>305 310 315 320 |     |     |
| 15 | Leu Leu Glu Arg Leu Trp Tyr Val Met Leu Glu Gln Phe Leu Met Lys<br>325 330 335     |     |     |
| 20 | Tyr Val Trp Ser Ala Ser Gly Leu Leu Met Val Ala Val Pro Ile Ile<br>340 345 350     |     |     |
| 25 | Thr Ala Thr Gly Tyr Ser Glu Ser Asp Ala Glu Ala Val Lys Lys Ala<br>355 360 365     |     |     |
| 30 | Ala Leu Glu Lys Lys Glu Glu Glu Leu Val Ser Glu Arg Thr Glu Ala<br>370 375 380     |     |     |
| 35 | Phe Thr Ile Ala Arg Asn Leu Leu Thr Ala Ala Ala Asp Ala Ile Glu<br>385 390 395 400 |     |     |
| 40 | Arg Ile Met Ser Ser Tyr Lys Glu Val Thr Glu Leu Ala Gly Tyr Thr<br>405 410 415     |     |     |
| 45 | Ala Arg Val His Glu Met Phe Gln Val Phe Glu Asp Val Gln Arg Cys<br>420 425 430     |     |     |
| 50 | His Phe Lys Arg Pro Arg Glu Leu Glu Asp Ala Gln Ala Gly Ser Gly<br>435 440 445     |     |     |
| 55 | Thr Ile Gly Arg Ser Gly Val Arg Val Glu Gly Pro Leu Lys Ile Arg<br>450 455 460     |     |     |
| 60 | Gly Gln Val Val Asp Val Glu Gln Gly Ile Ile Cys Glu Asn Ile Pro<br>465 470 475 480 |     |     |
|    | Ile Val Thr Pro Ser Gly Glu Val Val Val Ala Ser Leu Asn Ile Arg<br>485 490 495     |     |     |
|    | Val Glu Glu Gly Met His Leu Leu Ile Thr Gly Pro Asn Gly Cys Gly<br>500 505 510     |     |     |
|    | Lys Ser Ser Leu Phe Arg Ile Leu Gly Gly Leu Trp Pro Thr Tyr Gly<br>515 520 525     |     |     |

5 Gly Val Leu Tyr Lys Pro Pro Pro Gln Arg Met Phe Tyr Ile Pro Gln  
 530 535 540

10 Arg Pro Tyr Met Ser Val Gly Ser Leu Arg Asp Gln Val Ile Tyr Pro  
 545 550 555 560

15 Asp Ser Val Glu Asp Met Gln Arg Lys Gly Tyr Ser Glu Gln Asp Leu  
 565 570 575

20 Glu Ala Ile Leu Asp Val Val His Leu His His Ile Leu Gln Arg Glu  
 580 585 590

25 Gly Gly Trp Glu Ala Met Cys Asp Trp Lys Asp Val Leu Ser Gly Gly  
 595 600 605

30 Glu Lys Gln Arg Ile Gly Met Ala Arg Met Phe Tyr His Arg Pro Lys  
 610 615 620

35 Tyr Ala Leu Leu Asp Glu Cys Thr Ser Ala Val Ser Ile Asp Val Glu  
 625 630 635 640

40 Gly Lys Ile Phe Gln Ala Ala Lys Asp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Ser  
 645 650 655

45 Ile Thr His Arg Pro Ser Leu Trp Lys Tyr His Thr His Leu Leu Gln  
 660 665 670

50 Phe Asp Gly Glu Gly Gly Trp Lys Phe Glu Lys Leu Asp Ser Ala Ala  
 675 680 685

55 Arg Leu Ser Leu Thr Glu Glu Lys Gln Arg Leu Glu Gln Gln Leu Ala  
 690 695 700

60 Gly Ile Pro Lys Met Gln Arg Arg Leu Gln Glu Leu Cys Gln Ile Leu  
 705 710 715 720

65 Gly Glu Ala Val Ala Pro Ala His Val Pro Ala Pro Ser Pro Gln Gly  
 725 730 735

70 Pro Gly Gly Leu Gln Gly Ala Ser Thr  
 740 745

## REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la eficiencia de la transducción de células madre o progenitoras hematopoyéticas cultivadas con un lentivirus que comprende: cultivar las células madre o progenitoras hematopoyéticas y el lentivirus en un medio de cultivo que comprende prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) o 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>; en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas se cultivan en presencia de PGE<sub>2</sub> o 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> durante la transducción.
2. El método de la reivindicación 1, en el que antes o durante la transducción, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se cultivan en presencia de uno o más factores de crecimiento que promueven la expansión de las células.
3. El método de la reivindicación 1, en el que:
  - (a) por lo menos aproximadamente el 50% de las células madre o progenitoras hematopoyéticas se transducen;
  - (b) por lo menos aproximadamente el 75% de las células madre o progenitoras hematopoyéticas se transducen; o
  - (c) por lo menos aproximadamente el 90% de las células madre o progenitoras hematopoyéticas se transducen.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además cultivar las células madre o progenitoras hematopoyéticas y lentivirus en presencia de un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC), opcionalmente en donde el inhibidor de HDAC se selecciona del grupo que consiste de: Tricostatina A (TSA), ácido valproico (VPA), butirato de sodio, ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), fenilbutirato de sodio, depsipéptido, trapoxina (TPX), péptido 1 que contiene ácido hidroxámico cíclico (CHAP1), MS-275, LBH589 y PXD-101.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que:
  - (a) el lentivirus es un virus del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); y/o
  - (b) el lentivirus está pseudotipado con una proteína de envoltura de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G).
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las células madre o progenitoras hematopoyéticas se cultivan en presencia de PGE<sub>2</sub> o 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> durante la transducción durante por lo menos aproximadamente veinticuatro horas.
7. El método de la reivindicación 6, en el que las células madre o progenitoras hematopoyéticas se cultivan en presencia de PGE<sub>2</sub> o 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> durante:
  - (a) las primeras veinticuatro horas de la transducción; o
  - (b) las primeras cuarenta y ocho horas de la transducción.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el lentivirus comprende un vector que comprende:
  - (a) una LTR lentiviral izquierda (5');;
  - (b) una secuencia de control de expresión operativamente enlazada a un gen de interés; y
  - (c) una LTR lentiviral derecha (3').
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que:
  - (I) el lentivirus comprende un vector que comprende:
    - (a) una LTR de VIH-1 izquierda (5');;
    - (b) una secuencia de empaquetado Psi (Ψ +);
    - (c) una región central del tracto de polipurina/"ADN flap" de VIH-1 (cPPT/FLAP);
    - (d) un elemento de respuesta a Rev (RRE);
    - (e) un promotor de β-globina y una región controladora de locus (LCR) de β-globina enlazada operativamente a un gen de interés; y
    - (f) una LTR lentiviral derecha (3') que comprende:
      - i) uno o más elementos aisladores, o
      - ii) una secuencia políA de β-globina de conejo (rβgpA);
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que el lentivirus comprende un vector que

comprende:

- 5 (a) una LTR de VIH-1 izquierda (5');  
(b) un señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ );  
(c) una cPPT/FLAP;  
(d) un RRE;  
(e) un promotor de MND, enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido ABCD1 humano;
- 10 (f) una LTR de VIH-1 derecha (3'); y  
(g) una secuencia de poliadenilación de  $\beta$ -globina de conejo.

**11.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el lentivirus es defectuoso en la replicación.

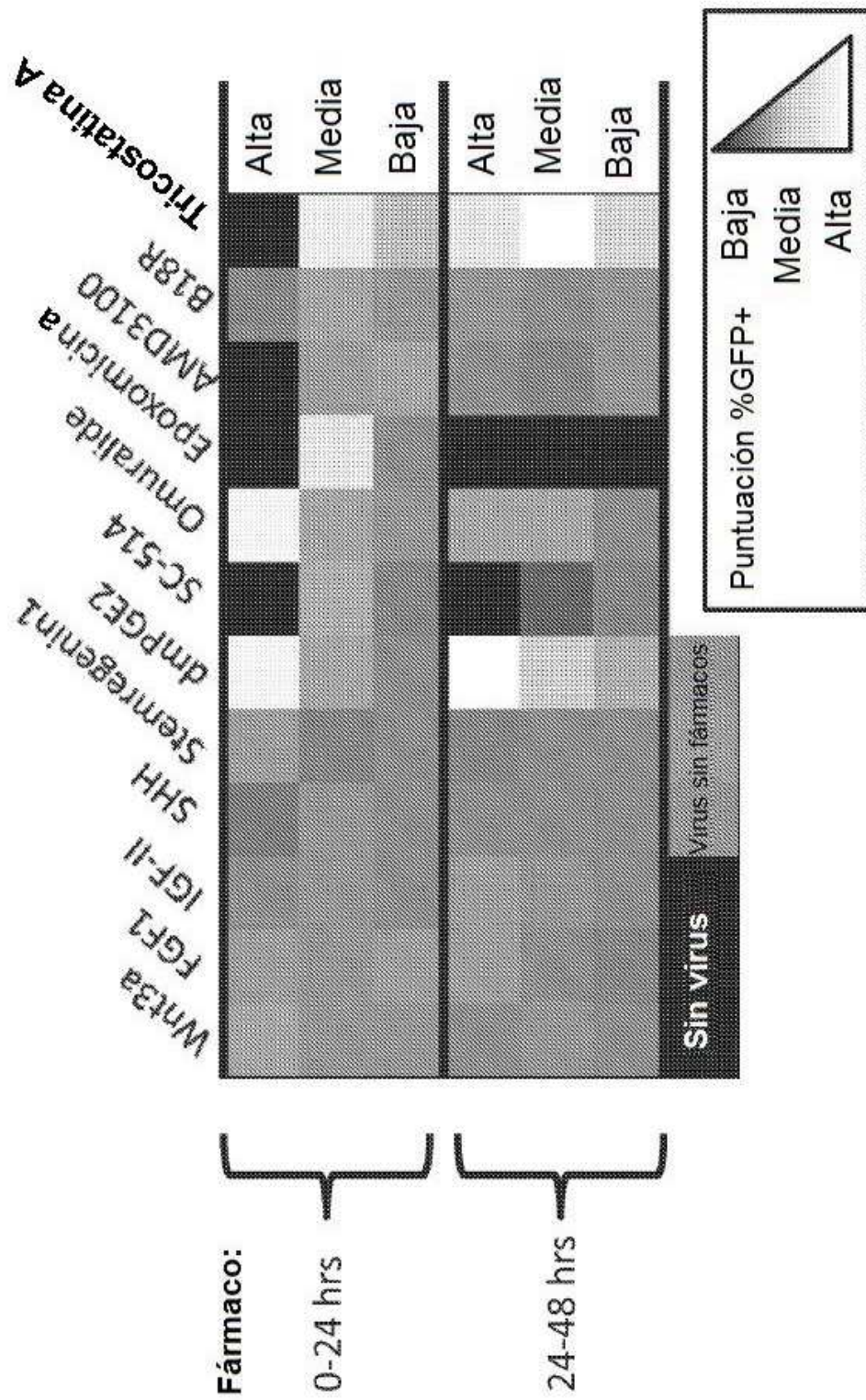


FIG. 1