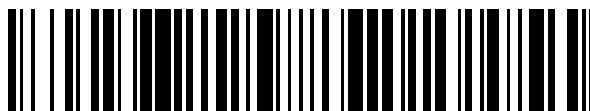


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 039**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)  
**C12N 15/113** (2010.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**A61P 7/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2010 PCT/IB2010/001166**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10125471**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010 E 10723305 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 2424571**

54 Título: **Vector génico**

30 Prioridad:

**30.04.2009 US 174124 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.10.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BIFFI, ALESSANDRA;**  
**GENTNER, BERNHARD, RUDOLF y**  
**NALDINI, LUIGI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 786 039 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

Vector génico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a vectores génicos para su uso en aplicaciones de transferencia y terapia génica, y usos de los mismos.

10 Antecedentes de la invención

El trasplante de células hematopoyéticas (HCT) de donantes normales es una terapia curativa para varios trastornos hereditarios y adquiridos. Sin embargo, el trasplante está limitado por la poca disponibilidad de donantes compatibles y la mortalidad asociada con el procedimiento alogénico (principalmente relacionado con la enfermedad de injerto contra huésped - GvHD). El HCT tiene una eficacia muy baja en algunos trastornos, tal como las enfermedades de almacenamiento lisosómico (LSD). Para mejorar la seguridad y la eficacia de los trasplantes alogénicos e identificar protocolos alternativos para pacientes que carecen de un donante compatible, se requiere un enfoque de terapia génica basado en el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) autólogas corregidas por genes.

20 Como alternativa al HCT alogénico, se puede corregir un defecto genético hereditario en las propias células hematopoyéticas del paciente mediante terapia génica. Sin embargo, la entrega de una copia funcional del gen relevante en todas las células afectadas del cuerpo es difícil. El concepto de terapia génica de células madre se basa en la modificación genética de un número relativamente pequeño de células madre, que permanecen a largo plazo en el cuerpo experimentando divisiones de autorrenovación, y generan enormes cantidades de progenie genéticamente corregida, lo que garantiza un suministro continuo de células corregidas para el resto de vida del paciente. Las células madre hematopoyéticas (HSC) constituyen una excelente población objetivo para la terapia génica, ya que pueden obtenerse de manera fácil y segura de la médula ósea (BM) o de la sangre periférica movilizada. Las HSC aisladas puede modificarse genéticamente y devolverse al paciente como un trasplante autólogo. El beneficio a largo plazo requiere el trasplante de una cantidad suficientemente alta de HSC modificadas por genes, que pueden repoblar la BM condicionada, dando lugar a células sanguíneas corregidas de todos los linajes hematopoyéticos. Las HSC alogénicas autólogas hacen que el procedimiento de trasplante esté disponible para todos los pacientes y evita los problemas de compatibilidad inmunológica que conducen a la GvHD. Además, algunas enfermedades, como las inmunodeficiencias primarias, requieren la corrección de una fracción de HSC y su progenie. La intensidad del régimen de acondicionamiento (el denominado régimen de acondicionamiento "no mieloablativo" o "mini") se reduce, lo que da como resultado una mejor tolerabilidad y menos efectos secundarios para el paciente. Un régimen de acondicionamiento reducido es menos compatible con un trasplante alogénico estándar, porque el quimerismo mixto de los donantes generalmente es inestable en el entorno alogénico debido al antagonismo inmunológico con las células inmunes derivadas del huésped.

40 La modificación génica eficiente a largo plazo de las HSC y su progenie requiere una tecnología que permita la integración estable del ADN correctivo en el genoma, sin afectar a la función de las HSC. Los sistemas de entrega más eficientes son los vectores virales. Por ejemplo, la transferencia y expresión génica en la célula progenitora hematopoyética (HSPC) de la enzima lisosómica galactocerebrosidasa (que carece de leucodistrofia globosa - GLD - o enfermedad de Krabbe) causa apoptosis y deterioro funcional de las células transducidas, evitando el desarrollo de enfoques de terapia génica basada en HSPC para tratar el trastorno (véase a continuación). Por lo tanto, los futuros casetes de expresión utilizados para la terapia génica deben parecerse a los patrones de expresión fisiológica y evitar la expresión transgénica ectópica y/o no fisiológica, lo que puede provocar la toxicidad, eliminación o incluso la transformación maligna de las células transducidas. Esto es particularmente importante para las células madre, el tipo de célula diana clave que garantiza la eficacia a largo plazo de la terapia génica, cuya biología no debe verse afectada por la intervención genética.

50 En resumen, las estrategias actuales de terapia génica hematopoyética requieren la transducción de HSC para garantizar la corrección a largo plazo del sistema hematopoyético, pero se beneficiarían significativamente de los casetes de expresión transgénica regulados que no expresan ectópicamente el producto transgénico en HSC, pero "se activan" solo en la progenie diferenciada que es el objetivo de la enfermedad genética, por ejemplo, linfocitos en SCID, granulocitos en CGD y monocitos/macrófagos en GLD. Tal sistema se describe, por ejemplo, en BLOOD CELLS, MOLECULES AND DISEASES, vol. 40, (2008), página 267 o NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 25, (2007), páginas 1457-1467.

60 Una forma de lograr esto es el uso de elementos de control transcripcional específicos de linaje, por ejemplo, el promotor endógeno del locus, para impulsar la expresión del gen terapéutico en el vector. Sin embargo, los promotores a menudo se extienden sobre un amplio rango de ADN y están mal caracterizados y, por lo tanto, no se pueden reconstituir fácilmente en su totalidad en una construcción vectorial. Además, los niveles de expresión de promotores específicos de tejido reconstituidos en vectores de transferencia génica a menudo no son suficientes para lograr la corrección fenotípica, muy probablemente debido a la reconstitución imperfecta y/o la influencia perjudicial de la cromatina en el sitio de integración de vector semialeatorio. Por lo tanto, se necesitan urgentemente estrategias

adicionales para regular un transgén.

Declaraciones de la invención

5 En un aspecto, la invención proporciona un vector génico para su uso en terapia génica que comprende al menos una secuencia diana de miARN correspondiente a mir-130a o mir-126 unida operativamente a un transgén que codifica interferón alfa, la enzima lisosómica galactocerebrosidasa o gp91 phox, en el que el vector génico se usa para impedir o reducir la expresión del transgén en una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.

10 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en terapia génica que comprende el vector génico de la invención, en la que la composición farmacéutica se usa para impedir o reducir la expresión del transgén en una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.

15 En otro aspecto, la invención proporciona una célula aislada para su uso en terapia génica, en la que la célula está infectada o se transduce con el vector génico de la invención, y en la que la célula es una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.

20 En otro aspecto, la invención proporciona el vector génico, la composición farmacéutica o la célula de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de leucodistrofia de células globoideas, enfermedad granulomatosa crónica, inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y tumores sólidos.

25 En otro aspecto, la invención proporciona el vector génico, la composición farmacéutica o la célula de la invención para su uso en el aumento de las posibilidades de supervivencia de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética en relación con la terapia génica.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso del vector génico o la composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para terapia génica, en el que el vector génico se usa para impedir o reducir la expresión del transgén en una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.

30 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de la célula aislada de la invención para la fabricación de un medicamento para terapia génica.

35 Según un aspecto de la descripción, se proporciona un vector génico para su uso en terapia génica que comprende al menos una secuencia diana de miARN unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que tiene un miARN correspondiente en una célula progenitora hematopoyética (HSPC) que impide o reduce la expresión de la secuencia de nucleótidos en una HSPC pero no en una célula diferenciada.

40 Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un vector génico para su uso en terapia génica que comprende al menos una secuencia diana de miARN unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que tiene un miARN correspondiente en una célula madre hematopoyética (HSC) que impide o reduce la expresión de la secuencia de nucleótidos en una HSC pero no en una célula diferenciada.

45 En otras palabras, la descripción proporciona un vector génico adecuado para su uso en terapia génica hematopoyética que comprende al menos una secuencia diana de miARN para un miARN que está presente en una cantidad eficaz en una célula progenitora hematopoyética o célula madre hematopoyética y opcionalmente un transgén. Por cantidad eficaz se refiere a que la concentración del miARN endógeno es suficiente para reducir o impedir la expresión de un transgén que está unido operativamente a la secuencia diana de miARN correspondiente. Por lo tanto, la presente invención emplea el uso de miARN que se expresa fuertemente en células, tales como HSPC y HSC, pero no en una progenie diferenciada de, por ejemplo, el linaje mieloide y linfoide, que impide o reduce la expresión de un transgén potencialmente tóxico en poblaciones sensibles de células madre, mientras se mantiene la expresión y la eficacia terapéutica en la progenie enferma.

50 El miARN está "unido operativamente" al transgén. El término "unido operativamente" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista.

55 Una célula madre puede diferenciarse en muchos tipos de células. Una célula que puede diferenciarse en todos los tipos de células se conoce como totipotente. En los mamíferos, solo el cigoto y las células embrionarias tempranas son totipotentes. Las células madre son células que se encuentran en la mayoría de los organismos multicelulares, si no en todos. Se caracterizan por la capacidad de renovarse a través de la división celular mitótica y la diferenciación en una amplia gama de tipos de células especializadas. Los dos tipos generales de células madre de mamífero son: 60 células madre embrionarias, que se aíslan de la masa celular interna de los blastocitos, y células madre adultas, que se encuentran en los tejidos adultos. En un embrión en desarrollo, las células madre pueden diferenciarse en todos los tejidos embrionarios especializados. En los organismos adultos, las células madre y las células progenitoras actúan como un sistema de reparación para el cuerpo, reponiendo células especializadas, pero también mantienen el recambio normal de los órganos regenerativos, tal como la sangre, la piel o los tejidos intestinales. 65

Las células madre hematopoyéticas (HSC) son células madre multipotentes que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas, incluyendo mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas), y linajes linfoides (linfocitos T, linfocitos B, células NK).

Las células progenitoras tienen la capacidad de diferenciarse en un tipo específico de célula. Sin embargo, a diferencia de las células madre, ya son mucho más específicas: se las fuerza a diferenciarse en su célula "diana". La diferencia más importante entre las células madre y las células progenitoras es que las células madre pueden replicarse indefinidamente, mientras que las células progenitoras solo pueden dividirse un número limitado de veces. Las HSPC se pueden distinguir rigurosamente de las HSC solo por un ensayo funcional *in vivo*, es decir, un trasplante y la demostración de que pueden dar lugar a todos los linajes sanguíneos durante periodos de tiempo prolongados. La detección de marcadores de la superficie celular tales como c-Kit (CD117), Sca-1, y la ausencia/baja expresión de un panel de marcadores de linaje, en combinación con un conjunto de moléculas recientemente descrito que pertenecen a la familia de receptores SLAM (CD150 y CD48), puede enriquecer las subpoblaciones de HSC y HSPC, alcanzando una pureza del 50 % cuando se ensayan frente a ensayos funcionales estándar (Kiel y col.).

Una célula diferenciada es una célula que se ha vuelto más especializada en comparación con la célula madre o la célula progenitora. La diferenciación tiene lugar durante el desarrollo de un organismo multicelular a medida que el organismo cambia de un solo cigoto a un sistema complejo de tejidos y tipos de células. La diferenciación también es un proceso común en adultos: las células madre adultas se dividen y crean células hijas completamente diferenciadas durante la reparación tisular y durante el recambio celular normal. La diferenciación cambia drásticamente el tamaño, la forma, el potencial de membrana, la actividad metabólica y la capacidad de respuesta de una célula a las señales. Estos cambios se deben en gran medida a modificaciones altamente controladas en la expresión génica. En otras palabras, una célula diferenciada es una célula que tiene estructuras específicas y realiza ciertas funciones debido a un proceso de desarrollo que implica la activación y desactivación de genes específicos. Aquí, una célula diferenciada incluye células diferenciadas del linaje hematopoyético tales como monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B y células NK. Por ejemplo, las células diferenciadas del linaje hematopoyético se pueden distinguir de HSC y HSPC mediante la detección de moléculas de la superficie celular que no se expresan o se expresan menos en células no diferenciadas. Ejemplos de marcadores de linaje adecuados, tales como CD11b, Gr1, CD19, Ter119 y CD3.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un vector génico para su uso en terapia génica que comprende al menos una secuencia diana de miARN correspondiente a un miARN seleccionado del grupo que comprende mir-130a, mir-126 y mir-223 unidos operativamente a una secuencia de nucleótidos.

La diana miR-126 bloquea la expresión más eficazmente en las HSPC más primitivas y (en seres humanos) en el linaje eritroide (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/128245 o BLOOD, vol. 112, (2008), página 193). miR-126 sería particularmente adecuado para aplicaciones de terapia génica que se basan en una expresión transgénica fuerte en el linaje mieloide y linfoide.

La diana miR-130a bloquea la expresión más eficazmente en las HSPC más primitivas (similar a miR-126), miR-130a sería especialmente adecuado para aplicaciones de terapia génica que se basan en la expresión transgénica fuerte en el linaje mieloide, linfoide y eritroide (véase, por ejemplo, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 103, (2006), páginas 5078-5083).

miR-126 puede ser más fuerte que miR-130a en células CD34 humanas, pero también puede tener actividad no específica en la progenie diferenciada. Una diana de combinación que comprende secuencias miR-130aT (preferentemente 2-4 copias) y la "mitad" de miR-126T (preferentemente 2 copias) maximiza la ventana operativa determinada por la relación de represión en HSPC y la expresión en la progenie mieloide. Además, cuando se usa la combinación objetivo, la regulación descendente del transgén en HSPC está asegurada por 2 miARN independientes, y el riesgo de interferir con la regulación de miARN endógeno se reduce, aumentando así la seguridad y la eficacia de la secuencia diana. La diana miR-223 bloquea la expresión más eficazmente en progenitores comprometidos con mieloides y al menos parcialmente en las HSPC más primitivas. Con una variación de miR-126 y miR-130a, la diana miR-223 bloquea total y fuertemente la expresión en células mieloides diferenciadas, incluyendo granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas mieloides. La diana miR-223 sería particularmente adecuada para aplicaciones de terapia génica que dependen de una expresión transgénica robusta en el linaje linfoide o eritroide. La diana miR-223 puede bloquear la expresión también de manera muy eficaz en HSC humanas.

Preferentemente, las dianas de la secuencia de miARN corresponden a mir-130a y mir-126.

En una realización, el vector génico comprende la secuencia de nucleótidos que controla la expresión del vector. En otras palabras, el microARN endógeno impide la expresión o proliferación del virus en ciertos tipos de células (HSC y HSPC) pero permite la expresión o proliferación en otros tipos de células. Por ejemplo, mir-126, mir-130 y mir-223 evitan la expresión de un vector génico o un virus oncolítico en una célula madre hematopoyética o una célula progenitora.

En una realización, el vector génico comprende la secuencia de nucleótidos que es un transgén.



En otra realización, el vector de transferencia génica está en forma de un vector de transferencia génica no viral. En esta realización, el vector de transferencia génica puede comprender, o estar en forma de, un vector de expresión o plásmido que comprende la secuencia diana de miARN unida operativamente a una secuencia de nucleótidos.

Los vectores de expresión, como se describen en el presente documento, comprenden regiones de secuencias que contienen ácido nucleico capaces de transcribirse. Por lo tanto, las secuencias que codifican ARNm, ARNt y ARNr se incluyen dentro de esta definición.

El vector génico o el vector de transferencia génica de la presente invención se pueden usar para entregar un transgén a un sitio o célula de interés. El vector de la presente invención puede entregarse a un sitio diana mediante un vector viral o no viral.

Un vector es una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad de un entorno a otro. A modo de ejemplo, algunos vectores utilizados en técnicas de ADN recombinante permiten que entidades, tales como un segmento de ADN (tal como un segmento de ADN heterólogo, tal como un segmento de ADNc heterólogo), se transfieran a una célula diana. Opcionalmente, una vez dentro de la célula diana, el vector puede servir entonces para mantener el ADN heterólogo dentro de la célula, o puede actuar como una unidad de replicación del ADN. Los ejemplos de vectores utilizados en técnicas de ADN recombinante incluyen plásmidos, cromosomas, cromosomas artificiales o virus.

Los sistemas de entrega no virales incluyen, pero sin limitación, procedimientos de transfección de ADN. Aquí, la transfección incluye un proceso que utiliza un vector no viral para entregar un gen a una célula diana de mamífero.

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

En una realización, el vector genético es un vector viral.

Los sistemas de entrega viral incluyen, pero sin limitación, un vector de adenovirus, un vector viral adenoasociado (AAV), un vector viral de herpes, un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector baculoviral. Otros ejemplos de vectores incluyen sistemas de entrega *ex vivo*, que incluyen, pero sin limitación, procedimientos de transfección de ADN tales como electroporación, biolística de ADN, transfección mediada por lípidos, transfección mediada por ADN compactado.

El término "partícula de vector" se refiere al vector retroviral empaquetado, que es preferentemente capaz de unirse y entrar en las células diana. Los componentes de la partícula, como ya se ha analizado para el vector, pueden modificarse con respecto al retrovirus de tipo natural. Por ejemplo, las proteínas Env en la capa proteica de la partícula pueden modificarse genéticamente para alterar su especificidad de direccionamiento o lograr alguna otra función deseada.

Preferentemente, el vector viral transduce preferentemente un cierto tipo de células o tipos de células.

Más preferentemente, el vector viral es un vector dirigido, es decir, tiene un tropismo tisular que está alterado en comparación con el virus nativo, de modo que el vector está dirigido a células particulares.

En una realización preferida, el vector génico puede obtenerse de un lentivirus.

En una realización, el vector génico comprende un promotor específico de tejido. Preferentemente, el promotor específico de tejido se selecciona del grupo que comprende CD11b y c-Fes, y los promotores derivados del locus de cadena pesada del citocromo b-245 (CYBB, gp91 phox) y TEK (Tie2). El promotor TEK (Tie2) podría combinarse con la secuencia diana miR-126, y esta combinación permitiría la expresión transgénica específica en un subconjunto de células mieloides infiltrantes de tumor.

En una realización, el vector génico comprende un transgén que codifica una enzima. Preferentemente, la enzima se selecciona del grupo de enzima lisosómica galactocerebrosidasa y gp91 phox. Según la presente invención, se puede usar para entregar moléculas inmunomoduladoras, tales como interferón alfa. Preferentemente, estos vectores entregan las moléculas inmunomoduladoras en las células tumorales tras el trasplante de médula ósea. Preferentemente, estos vectores contienen el promotor Tie2 más una secuencia miR-126T.

Es importante destacar que el promotor Tie2 posee actividad en las células madre hematopoyéticas, y se sabe que las moléculas inmunomoduladoras tal como interferón alfa, son tóxicas para las HSC. Por lo tanto, el uso de miRT específicas de HSC, como se describe en esta solicitud de patente, se vuelve obligatorio en lugar de una opción para entregar específicamente moléculas bioactivas mediante la expresión de Tie2, macrófagos infiltrantes de tumor sin

interferir con la función de HSC. Dado que el promotor Tie2 es más débil en HSC que el promotor PGK que se ha utilizado en estos estudios, se espera que las secuencias 126T/130aT eviten completamente la toxicidad de los transgenes expresados por el promotor Tie2 en HSC.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un conjunto de construcciones de ADN para producir una partícula de vector viral que comprende una construcción de ADN que codifica un genoma de vector viral empaquetable que comprende al menos una secuencia diana de miARN según la descripción, y opcionalmente un transgén. Por genoma de vector empaquetable se refiere a que el genoma de vector se encuentra en un entorno en el que puede empaquetarse en una partícula de vector viral. Esto generalmente requiere la presencia de Gag-Pol y Env.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un procedimiento para preparar una partícula de vector viral que comprende introducir el conjunto de construcciones de ADN de la descripción en una célula huésped, y obtener la partícula de vector viral.

En una realización, la célula huésped comprende el miARN correspondiente.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona una partícula de vector viral producida por el procedimiento de la descripción.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el vector génico o partícula según la presente invención junto con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona una célula infectada o transducida con el vector génico o partícula según la presente invención. La célula puede transducirse o infectarse en un escenario *in vivo* o *in vitro*. La célula puede derivarse o formar parte de un animal, preferentemente un mamífero, tal como un ser humano o un ratón. Por lo tanto, se apreciará que la descripción es útil para proporcionar animales transgénicos, por ejemplo, para su uso como modelos de enfermedad. En una realización, el mamífero es un mamífero no humano.

En una realización, la célula es una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona una combinación de al menos dos dianas de secuencia de miARN diferentes correspondientes a miARN seleccionados del grupo que comprende mir-130a, mir-126 y mir-223.

En una realización, las dianas de secuencia de miARN son para uso simultáneo, separado o secuencial.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un vector génico según la presente invención, una composición farmacéutica según la presente invención, o una célula según la presente invención para impedir o reducir la expresión de un transgén en una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un vector génico según la presente invención, una composición farmacéutica según la presente invención, o una célula según la presente invención para tratar una enfermedad seleccionada de leucodistrofia de células globoideas, enfermedad granulomatosa crónica e inmunodeficiencia combinada grave (SCID).

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un vector génico según la presente invención, una composición farmacéutica según la presente invención, o una célula según la presente invención para aumentar las posibilidades de supervivencia de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética en relación con la terapia génica.

Las posibilidades de supervivencia de una HSC o HSPC pueden aumentarse desdireccionando específicamente la expresión de genes

de estas células. En particular, el desdireccionamiento de la expresión de transgenes que son tóxicos para HSC o HSPC podría ser beneficioso para la supervivencia de estas células. Además, el desdireccionamiento de la expresión de transgenes que podría causar una reacción inmune no deseada en el huésped podría dar como resultado una mayor probabilidad de supervivencia de la célula.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un vector genético según la presente invención, una partícula según la descripción, una composición farmacéutica según la presente invención, una célula según la presente invención, o una combinación según la descripción para aumentar la seguridad y/o eficacia de la terapia génica.

Un aumento en la seguridad de la terapia génica incluye la prevención o reducción de la expresión no deseada de transgenes o la expresión del vector en ciertos tipos de células tales como HSC y HSPC. El desdireccionamiento de la expresión de un transgén o vector de tipos de células específicas puede reducir la reacción no deseada o los efectos secundarios que pueden acompañar a la terapia génica. Un aumento en la eficacia de la terapia génica incluye que

los transgenes se expresan de manera más eficaz en los tipos de células deseados, tales como células hematopoyéticas diferenciadas, porque estas células se generan más eficazmente a partir de células no diferenciadas modificadas por genes que están protegidas de la toxicidad del transgén y las reacciones inmunes no deseadas por la secuencia diana de microARN. En particular, la terapia génica que implica el trasplante de HSC o HSPC puede ser más segura y más eficiente si se puede evitar la expresión del transgén hasta que las células se hayan diferenciado.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un vector genético según la presente invención, una partícula según la descripción, una composición farmacéutica según la presente invención, una célula según la presente invención o una combinación según la descripción para impedir la apoptosis de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética, por lo que la apoptosis es causada por la expresión del transgén.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un vector génico según la presente invención, una partícula según la descripción, una composición farmacéutica según la presente invención, una célula según la presente invención o una combinación según la descripción para monitorizar una etapa de diferenciación de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.

La presencia de mir-126, mir-223 y mir-130a es indicativa de una HSC o HSPC.

Más específicamente, mir-126 es indicativo de HSPC primitivas y, en seres humanos, también de células del linaje eritroide. Mir-130a es indicativo de las HSPC más primitivas. Mir-223 es indicativo de células progenitoras comprometidas mieloides y HSPC más primitivas. Mir-223 también es indicativo de células mieloides diferenciadas que incluyen granulocitos, monocitos, macrófagos y células dentríticas mieloides.

En una realización, el vector génico es para su uso en terapia de células hematopoyéticas. La terapia de células hematopoyéticas incluye el trasplante de células madre hematopoyéticas.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona una secuencia diana de miARN correspondiente a un miARN seleccionado del grupo de mir-130a, mir-126 y mir-223 para su uso en terapia génica.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un procedimiento para determinar la etapa de diferenciación de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética, que comprende determinar el nivel de expresión de un miARN en la célula, en el que el miARN corresponde a un secuencia diana de miARN unida operativamente a una secuencia de nucleótidos, en el que el miARN impide o reduce la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula progenitora hematopoyética (HSPC) o una célula madre hematopoyética (HSC) pero no en una célula diferenciada. Por ejemplo, la expresión de mir-130a y mir-126 indica que la célula es una HSPC o HSC, mientras que la expresión de miR-223 indica afiliación al linaje mielóide, es decir, granulocitos y monocitos, incluyendo sus precursores y derivados.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un procedimiento para determinar la etapa de diferenciación de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética, que comprende determinar el nivel de expresión de al menos dos miARN diferentes en la célula, en el que los miARN corresponden a secuencias diana de miARN unidas operativamente a secuencias de nucleótidos, en el que los miARN impiden o reducen la expresión de las secuencias de nucleótidos en una célula progenitora hematopoyética (HSPC) o una célula madre hematopoyética (HSC) pero no en una célula diferenciada y comparando el nivel de expresión de los diferentes miARN. Además, la expresión de dos microARN se puede ensayar de forma contemporánea e independiente entre sí utilizando un vector bidireccional que expresa dos genes marcadores, cada uno de los cuales contiene una secuencia diana de microARN diferente. Por ejemplo, los diferentes microARN podrían estar unidos a diferentes marcadores, tales como marcadores fluorescentes. Los diferentes colores indicarán diferentes mezclas de expresión de los microARN que representan diferentes etapas de diferenciación (por ejemplo, marcador verde+miR-126T, marcador rojo+miR-223T. Si las células son rojas o negras: -> HSPC; si las células son amarillas: -> linfocitos; si las células son verdes: células de linaje mielóide diferenciadas).

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un procedimiento para determinar la etapa de diferenciación de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética, que comprende determinar el nivel de expresión de un transgén en dicha célula madre hematopoyética o dicha célula progenitora hematopoyética, en el que el transgén está unido operativamente a una diana de secuencia de miARN, por lo que el miARN correspondiente impide o reduce la expresión del transgén en una célula progenitora hematopoyética (HSPC) o una célula madre hematopoyética (HSC) pero no en una célula diferenciada.

Además, los vectores indicadores para miARN seleccionados del grupo que contiene miR-126, miR-130a y miR-223 podrían aplicarse para identificar células madre hematopoyéticas y/o sus precursores inmediatos en sistemas de cultivo destinados a obtener células de linaje hematopoyético de células pluripotentes inducidas (iPS) o células madre embrionarias (ES).

Se describe también que los miARN utilizados en los procedimientos de la descripción comprenden el miARN seleccionado del grupo que comprende mir-130a, mir-126 y mir-223.

Algunas ventajas clave adicionales de la invención

La invención enseña cómo los vectores génicos adecuados para terapia génica pueden diseñarse para regularse por miARN endógenos para HSC y HSPC para controlar la expresión transgénica con el fin de lograr perfiles de expresión específicos del vector. La invención proporciona una amplia aplicación de estos vectores, ya que ayudarán a prevenir la toxicidad transgénica en HSC y HSPC y, por lo tanto, facilitarán el desarrollo de estrategias de terapia génica para el tratamiento de diversas enfermedades. Los vectores son particularmente adecuados para terapias génicas que implican la expresión de un transgén que es tóxico para HSC o HSPC.

La descripción proporciona un procedimiento novedoso para perfilar la actividad de miARN seleccionados a través de múltiples subconjuntos de células hematopoyéticas que incluyen poblaciones de HSPC raras, añadiendo así una nueva dimensión a los enfoques de perfiles de expresión de miARN convencionales, que son amplios pero limitados a una población masiva previamente purificada. Este procedimiento se basa en la transducción de HSPC con vectores indicadores de miARN lentivirales, que sirven como un indicador genético vivo para la actividad de un miARN, fácilmente cuantificable a nivel de células individuales y en múltiples poblaciones celulares en paralelo por citometría de flujo. Usando este enfoque, los inventores identificaron dos miARN que son altamente funcionales en HSPC de ratón y humanas, incluyendo subconjuntos enriquecidos en las células madre más primitivas. Tras la diferenciación, un miARN se regula negativamente rápidamente a nivel de las células progenitoras tempranas, mientras que el otro se induce adicionalmente durante la granulopoyesis y la monopoyesis, pero se regula negativamente de manera brusca en los linfocitos y durante la diferenciación de megacariocitos/eritrocitos.

Además, los inventores aplicaron uno de los dos miARN altamente expresados en HSPC para superar un problema importante que impide el tratamiento eficaz de la leucodistrofia globoide (GLD) (un trastorno de almacenamiento lisosómico debido a la actividad defectuosa de la enzima lisosómica galactocerebrosidasa - GALC) en el modelo murino mediante terapia génica de células madre hematopoyéticas basada en vectores lentivirales. A diferencia de otras enzimas lisosómicas, la transferencia y expresión génica de GALC en HSPC causa apoptosis y deterioro funcional de las células transducidas debido a un desequilibrio del contenido intracelular en los esfingolípidos bioactivos como consecuencia de la expresión enzimática. Las células diferenciadas de los linajes mieloides y linfoides no se ven afectadas por la expresión de GALC, lo que sugiere una sensibilidad única de HSPC a la toxicidad enzimática. Las secuencias sensibles a miARN utilizadas para los vectores indicadores permitieron regular el perfil de expresión del transgén GALC terapéuticamente relevante, desdireccionando la expresión del transgén de las células donde se expresa el miARN análogo (HSPC), permitiendo al mismo tiempo la expresión terapéutica completa en la progenie diferenciada que no se ve afectada por la toxicidad de la expresión de GALC. Las HSPC transducidas con los vectores lentivirales GALC regulados por miARN se protegieron de la toxicidad enzimática y conservaron su función tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados preliminares indican la eficacia terapéutica de este enfoque para corregir las manifestaciones de la enfermedad en el modelo de ratón.

Preferentemente, las siguientes secuencias diana de miARN se emplean para lograr la expresión transgénica regulada en el sistema hematopoyético humano: aplicaciones de terapia génica que requieren expresión en el linaje mieloide (por ejemplo, enfermedad granulomatosa crónica, trastornos de almacenamiento lisosómico tales como enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática, adrenoleucodistrofia, etc.): 126T/130aT (2+2 secuencias diana) - optimizado para la represión máxima en HSPC; 126T (2 secuencias diana) - optimizado para una actividad de fondo mínima en la progenie mieloide.

Aplicaciones de terapia génica que requieren expresión en el linaje eritroide (por ejemplo, talasemia, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enfermedad de células falciformes,...): 130aT (4 secuencias diana) o 223T (2 o 4 secuencias diana). La última diana podría exhibir alguna actividad (<5x) en BFU-E y CFU-E más primitivos.

Aplicaciones de terapia génica que requieren expresión en el linaje linfóide (por ejemplo, deficiencia de RAG1/RAG2, deficiencia de BTK, X-SCID, ADA-SCID): 223T (2 o 4 secuencias diana), posiblemente en combinación con 126T/130aT (2+2 secuencias diana) o 126T (2 secuencias diana).

Los vectores, tales como virales, incluyendo vectores lentivirales, para la expresión transgénica para la transferencia y la terapia génica pueden genomanipularse con la secuencia diana de miARN para reconocerse por las células de miARN endógenas a HSC y HSPC, regulando así la expresión transgénica en un subconjunto de células. Además, se pueden usar combinaciones de secuencias diana de miARN para obtener vectores con patrones de expresión celular altamente específicos.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto habitual en la técnica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. y col. (1995 y suplementos periódicos; Current Protocols in Molecular Biology, cap. 9, 13, y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization:

Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press; Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO. I de Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7);

Antibodies: A Laboratory Manual de Ed Harlow (Editor), David Lane (Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-314-2), 1855. Handbook of Drug Screening, editado por Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, Nueva York, NY, Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); y Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench, Editado por Jane Roskams y Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3.

#### Descripción de las figuras

Figura 1. Representación esquemática de vectores indicadores lentivirales regulados por miARN bidireccionales. Aquí se muestran estructuras representativas de los vectores bidireccionales regulados por miARN (Bd.LV), que contienen la proteína verde fluorescente (GFP) como indicador de miARN y una forma truncada del receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR) de baja afinidad humano como un normalizador expresado constitutivamente. Mientras que Bd.LV-ctr no contiene ninguna secuencia diana de miARN (miRT), Bd.LV-223T y Bd.LV-126T se construyeron mediante la adición de 4 repeticiones en tándem que contenían 21 pb perfectamente complementarias a miR-223 o miR-126, respectivamente.

Figura 2. Evaluación de Bd.LV indicadores de miARN en líneas celulares. a) Análisis cuantitativo de los niveles de expresión de miR-223 y miR-126 (copias/pg) en células HEK293T, U937 y HEK293T que expresan ectópicamente miR-126 por transducción con un LV que contiene el pri-mir-126 bajo el control de un promotor ubicuo (HEK293T.LV.miR-126). b) Análisis FACS representativo de células HEK-293T, U937, HUVEC y HEK293T.LV.miR-126, transducidas con los Bd.LV regulados por miARN indicados. Las células se analizan para determinar la expresión del "indicador de miARN" de GFP y del "normalizador" NGFR. c) Fórmula para el cálculo de la represión múltiplo mediada por miARN de la expresión del gen indicador a nivel de proteína y a nivel de ARN. Los histogramas muestran la actividad de miR-223 y miR-126 en líneas celulares calculada como valores de GFP FR a nivel de proteína. Los rombos representan la GFP FR a nivel de ARN.

Figura 3. Evaluación de BdLV indicadores de miARN *in vivo*. Las células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) de médula ósea (BM) de linaje-<sup>l<sup>tr</sup>w</sup> se transdujeron con vectores lentivirales indicadores de miARN bidireccionales (BdLV) para miR-223 y miR-126, y se trasplantaron en ratones receptores. Las células sanguíneas periféricas de ratones con injertos estables de células portadoras del indicador de miARN se analizaron por FACS. a) Estrategia de activación utilizada para identificar la principal población de leucocitos de sangre periférica murina: granulocitos (CD11b+, SSChigh), monocitos (CD11b+, SSCLow), linfocitos B (CD19+) y linfocitos T (CD11b-CD19b-). b) Análisis FACS representativo de la expresión de GFP y NGFR en subconjuntos de sangre periférica murina. c) Valores de GFP FR (media +/- DE) en subpoblaciones de sangre periférica de ratones trasplantados con HSPC transducidas con Bd.LV-ctr (n = 5), Bd.LV-223T (n = 6) o Bd.LV- 126T (n = 4).

Figura 4: (a) Las células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) de médula ósea (BM) de linaje-<sup>l<sup>tr</sup>w</sup> se transdujeron con vectores lentivirales indicadores de miARN bidireccionales (BdLV) y se trasplantaron en ratones irradiados letalmente. Los BdLV coexpresan un indicador de GFP desestabilizado (d4GFP) que responde a un miARN específico mediante 4 repeticiones en tándem de una secuencia diana de miARN (miRT) perfectamente complementaria, y un gen marcador NGFR truncado ( $\Delta$ NGFR). Los ratones se sacrificaron 8-12 semanas después del trasplante, y se identificaron prospectivamente múltiples subpoblaciones de BM HSPC mediante inmunofenotipado como se muestra (HSC: células madre hematopoyéticas; MPP: progenitores multipotentes; GMLP: progenitores de granulocitos-monocitos-linfocitos; GMP: progenitores de granulocitos-monocitos; eMEP: progenitores tempranos de megacariocitos-eritrocitos; EP: precursores de eritrocitos). (b) Los gráficos representativos de FACS muestran la expresión del BdLV de control (sin miRT o 133aT, una miRT específica de músculo) y los BdLV indicadores para miR-126 (126T), miR-130a (130aT), miR-196b (196bT), miR-10a (10aT), miR-223 (223T), miR-19a (19aT), miR-93 (93T), miR-17-5p (17T) y let-7a (Let7aT) en subpoblaciones de HSPC recién aisladas de la BM de ratones trasplantados como se describe en (a). Cada fila muestra un patrón representativo de expresión del indicador para el BdLV indicado en HSPC de las etapas de diferenciación mencionadas anteriormente. Los gráficos de barras a la derecha de cada fila muestran la represión múltiplo (FR) media  $\pm$  sem calculada a partir de las intensidades medias de fluorescencia del indicador (Control: n = 9; 126T: n = 10; 130aT: n = 4; 196bT: n = 4; 10aT: n = 4, excepto HSC y MPP1, donde n = 1, por lo tanto, estadísticas n/a; 223T: n = 6, de aquellos 5 con un indicador de eGFP; 19aT: n = 3; 93T: n = 2; 17T: n = 3; let7aT: n = 1 grupo de 3 ratones). Las comparaciones estadísticas de la actividad de miARN entre las subpoblaciones de HSPC se realizaron mediante una corrección posterior a la prueba Anova unidireccional y de Bonferroni, utilizando los EP de cada grupo de BdLV indicador como referencia (\*\*\*: p < 0,001; \*\*: 0,01 > p > 0,001; \*: p < 0,05).

Figura 5: (a) Actividad hematopoyética de 8 miARN según se mide por la represión múltiplo (FR) media de los BdLV indicadores indicados en múltiples poblaciones de células aisladas de ratones trasplantados. Subconjuntos



de BM de linaje<sup>+</sup>: como se describe en la figura 4; Subconjuntos de BM de linaje<sup>+</sup>: Pro B: CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>; CD43<sup>-</sup> B: CD19<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>; T Ly: CD3<sup>+</sup>; Mono: CD11b<sup>+</sup>CD48<sup>+</sup>; Granu: CD11b<sup>+</sup>CD48<sup>lo</sup>; Sangre periférica: Granu: Dispersión lateral<sup>hi</sup> de CD11b<sup>+</sup>; Mono: Dispersión lateral<sup>lo</sup> de CD11b<sup>+</sup>; B Ly: CD19<sup>+</sup>; T Ly: CD3<sup>+</sup>. (b) Una secuencia diana combinada que contenía 4 copias de miR-130aT y 2 copias de miR-126T (130a/126T; n = 4 ratones) se comparó con 4 copias de miR-126T (126T; n = 10 ratones) o 4 copias de miR-130aT (130aT; n = 4 ratones). Las barras muestran la represión múltiple  $\pm$  sem obtenida por estas secuencias miRT en poblaciones de médula ósea negativas con marcador de linaje (leyenda como en la figura 4) y en leucocitos de sangre periférica. Cabe apreciar que 130a/126T logra una mejor represión en HSC que 126T en solitario, mientras que la represión de fondo en los leucocitos PB se reduce.

Figura 6: Regulación de la expresión de un gen suicida por secuencias diana de miARN. (a) Se añadieron secuencias miRT perfectamente complementarias a miR-142, miR-223, miR-126 o miR-130a a un transcrito de timidina cinasa desestabilizada (dTK). Los vectores suicidas lentivirales monodireccionales (mitad derecha de cada dibujo de vector) se usaron para (b), mientras que los vectores suicidas bidireccionales que se acoplaron a un marcador GFP con respecto a la TK regulada por miARN, o un marcador NGFR con respecto a la TK de control en (c). (b) Las HSPC de linaje<sup>-/l<sup>w</sup></sup> se transdujeron con los vectores lentivirales indicados, y se puso en placas +/- ganciclovir (GCV) en medio semisólido (LV-GFP: n = 2; CTRL-TK: n = 8; TK-142T: n = 4; TK-223T: n = 6; TK-126T: n = 4; TK-130aT: n = 2). Después de 10 d, se contó el número de colonias mieloides (CFU-GM, CFU-G, CFU-GM) y eritroides (BFU-E, CFU-E). Los diagramas de caja y bigotes muestran el número de colonias en los cultivos que contienen GCV dividido por el recuento de colonias en los cultivos de control respectivos sin GCV (percentil 10-90). El punto de datos "sin GCV" muestra la variabilidad de placas (recuento de colonias de cada cultivo no tratado con GCV dividido por el recuento medio de colonias de todos los cultivos no tratados con GCV; n = 26). Se realizaron comparaciones estadísticas frente al grupo LV-GFP tratado con GCV; ns, no significativamente diferente; \*\*, 0,001 < p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001. (c) HSPC de linaje<sup>-/l<sup>w</sup></sup> de ratones CD45.1<sup>+</sup> se transdujeron con un vector de control TK (marcado con NGFR) o un vector TK regulado por miARN (marcado con GFP; Exp. N.º 1: TK.126T; Exp. N.º 2: TK.142T). Las células transducidas con LV.NGFR/TK de control y LV.GFP/TK-miRT se mezclaron en una relación 1:1 y se trasplantaron en ratones congénicos CD45.2<sup>+</sup> que se trataron con GCV (Exp. N.º 1: n = 6 ratones; Exp. N.º 2: n = 5 ratones) durante 7-14 d a partir del día 3 después del trasplante, o se dejaron sin tratar (Exp. N.º 1: n = 4; Exp. N.º 2: n = 3). Los gráficos FACS representativos muestran quimerismo de GFP/NGFR dentro de las células donantes CD45.1<sup>+</sup>. Los gráficos muestran la fracción de células que expresan GFP dentro de las células transducidas derivadas de donante en la sangre para los ratones tratados con GCV (rojo) y no tratados (negro), para cada tipo de célula sanguínea durante un periodo de tiempo de 7-8 meses. Cabe apreciar que significativamente más células son GFP<sup>+</sup> en el grupo GCV (\*\*\*, p < 0,001, Anova bidireccional), lo que indica protección contra el suicidio y la ventaja selectiva de HSC transducidas con GFP/TK.126T o GFP/TK.142T. Por lo tanto, la secuencia miR-126T añadida a un transgén supera la toxicidad de las HSPC que surge de transgenes altamente tóxicos incluso cuando se expresa a partir de promotores ubicuos, lo que tiene un potencial significativo para mejorar la seguridad y la eficacia de la terapia génica basada en HSPC. Además, estos resultados demuestran formalmente que miR-126 es activo en el injerto a largo plazo de células madre hematopoyéticas, como lo demuestra un ensayo de repoblación funcional.

Figura 7: (a) Para abordar la seguridad de aprovechar la regulación de miR-126 para la terapia génica, se creó una línea de ratón transgénico que contenía un indicador miR-126 (Tg.126T) por microinyección del LV ilustrado en el espacio perivitelino de los cigotos. El análisis FACS de la médula ósea de ratones transgénicos adultos jóvenes demostró que la expresión de GFP era más baja en las células Kit<sup>+</sup>Sca<sup>+</sup>marcador de linaje<sup>-</sup> (KSL) (gráfico azul en el gráfico del histograma), mientras que la expresión de GFP se activó en progenitores Kit<sup>+</sup>Sca<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (gráfico negro y rojo en el gráfico del histograma). Se midió la GFI MFI de ratones Tg.126T y ratones transgénicos GFP de control para calcular la FR del indicador miR-126 en las subpoblaciones de HSPC indicadas (media  $\pm$  sem, n = ratones 10 Tg.126T; \*\*\*, p < 0,001; \*\*, 0,01 > p > 0,001 en comparación con EP). (b) Mientras que los ratones portadores de dos alelos desactivados para miR-126 manifiestan una letalidad embrionaria significativa debido a defectos angiogénicos, la cría de esta colonia Tg.126T dio como resultado un tamaño de camada normal y una distribución esperada del número de copias de vector (VCN) en la descendencia que reflejaba la de la generación precursora, lo que sugiere que la expresión moderada de secuencias de miR-126T de un promotor PGK no interfirió con la regulación de las dianas miR-126 naturales durante el desarrollo. (c) Las células de BM de ratones CD45.2<sup>+</sup> Tg126T y ratones genéticamente intactos (WT) CD45.1<sup>+</sup> se enriquecieron en HSPC mediante selección positiva para CD117 y se trasplantaron competitivamente (relación 1:1) en receptores CD45.2<sup>+</sup> irradiados letalmente (n = 4). Los ratones trasplantados se desangraron a intervalos regulares, y se determinó el quimerismo CD45.1/CD45.2 en los diversos linajes de células de sangre periférica (Granu: Dispersión lateral<sup>hi</sup> de CD11b<sup>+</sup>; Mono: Dispersión lateral<sup>lo</sup> de CD11b<sup>+</sup>; linfocitos B: CD19<sup>+</sup>; linfocitos T: CD3<sup>+</sup>). Estos datos indican que existe una ventana terapéutica cómoda para aprovechar de forma segura la regulación de miR-126.

Figura 8: (A) Las CD34<sup>+</sup> HSPC se purificaron de sangre de cordón umbilical (CB) humano y se transdujeron con el BdLV de control (Control) o BdLV indicadores de miARN para miR-126 (126T), miR-130a (130aT) o miR-223 (223T) (n = 3 repeticiones biológicas por grupo). Las células se mantuvieron en cultivo líquido en condiciones que soportan el mantenimiento a corto plazo de las HSPC, y la expresión del marcador de BdLV se midió 2 días después de la transducción en CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> HSPC y progenitores CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (primeras 2 columnas a la izquierda). Después, las células se diferenciaron, ya sea en cultivo líquido durante 6 días (células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>; columna central), o en



medio semisólido durante 16 días (células mieloides CD13<sup>+</sup>, células eritroides CD235<sup>+</sup>). Se muestran gráficos representativos de FACS. Los gráficos de barras en la parte inferior muestran la cuantificación de la actividad de miR-126, miR-130a y miR-223 en las subpoblaciones respectivas (n = 3; represión múltiple medio +/- sem; \*\*, 0,001 < p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001). (B) Las células CD34<sup>+</sup> de sangre de cordón umbilical se transdujeron con vectores suicidas bidireccionales regulados por control o miARN que contenían secuencias diana de miARN para miR-223 (TK-223T) o miR-126 (TK-126T, véase también la figura 2), y se pusieron en placas en ensayos CFC por cuadruplicado, en presencia o ausencia del profármaco GCV. El número de colonias eritroides GFP<sup>+</sup> (CFU-E, BFU-E) o mieloides (CFU-G, CFU-M, CFU-GM) se contó 14 días después de la colocación en placas, y se normalizó al número contado en el cultivo "sin GCV". Los diagramas de caja y bigotes muestran el percentil 10-90. El GCV evitó completamente el crecimiento de colonias transducidas con CTR-TK. (C) Las combinaciones de secuencias de miR-126T y miR-130aT (4+4 y 2+2 repeticiones en tándem, respectivamente), así como 2 repeticiones en tándem de miR-126T en solitario se compararon con el diseño estándar de miRT utilizando 4 repeticiones en tándem de miR-126T o miR-130aT, respectivamente. Las células sanguíneas de cordón umbilical humano se transdujeron con los respectivos BclV indicadores, y se determinó la represión múltiple del indicador en el compartimento primitivo de citoblastos/progenitoras (CD34+CD38-) y el compartimento de progenitoras (CD34+CD38+) 2 días después de la transducción, así como en la progenie mieloide (CD13+) y la progenie eritroide (CD235+) 10-14 días después de la transducción. 126T (4 dianas), 126T/130aT (4+4 dianas) y 126T/130aT (2+2 dianas) se suprimen igualmente bien en el compartimento de citoblastos/progenitoras. Sin embargo, 126T/130aT (4+4 dianas) tiene una mayor actividad supresora de fondo en la progenie mieloide. (D) Actividad supresora de 126T (4 dianas), 126T/130aT (2+2 dianas) y 126T (2 objetivos) en el compartimento primitivo (como en C), y en etapas de diferenciación mieloide tardías (mielocitos: CD11b+/CD16-; metamielocitos: CD11b+/CD16+/SSC<sub>low</sub>; granulocitos: CD11b+/CD16+/SSC<sub>high</sub>) tras la diferenciación *in vitro* inducida por G-CSF. Las etapas de diferenciación se verificaron en muestras de Cytospin teñidas con May-Grünwald/Giemsa del cultivo. El índice de regulación (gráfico de la derecha) se calcula dividiendo la represión múltiple de la miRT respectiva en el compartimento de citoblastos/multipotentes CD34+/CD38- por la represión múltiple en los metamielocitos. La mejor "liberación" de la expresión transgénica en la progenie mieloide se obtiene por 126T (2 dianas), mientras que la supresión en el compartimento de citoblastos/progenitoras es similar a 130aT (4 dianas), un poco menos en comparación con 126T (4 dianas) y 126T/130aT (2+2 dianas). Con respecto a las últimas 2 secuencias diana, 126T/130aT (2+2 dianas) es preferible a 126T (4 dianas), ya que ofrece el mayor índice de regulación. Además, la regulación descendente transgénica está asegurada por 2 miARN independientes, y el riesgo de interferir con la regulación de miARN endógeno se reduce aún más, aumentando así la seguridad y la eficacia de la miRT.

Figura 9. Sobreexpresión de la enzima lisosómica en HSPC. Nivel de expresión enzimática, normalizado a tipo natural, en mHSPC (A) y hHSPC (B) tras la transducción del LV. La expresión de GALC fue significativamente menor en comparación con ARSA e IDUA.

Figura 10. Función deteriorada de HSPC murinas tras la expresión de GALC mediada por LV. (A) Ensayo CFC en mHSPC transducidas con GALC y LV de control. Se contó el número (N.<sup>o</sup>) de colonias/placa (eje izquierdo Y, columnas) y se midió el número de copias de LV integradas/célula (VCN) (eje derecho Y, puntos). -/mHSPC transducidas con GALC.LV (n = 12 experimentos independientes) produjeron un número significativamente menor de colonias en comparación con células transducidas con GFP.LV (n = 10) y ARSA.LV (n = 8). Este deterioro no se observó cuando se transdujeron mHSPC con mirl42T GALC.LV (n = 6). \* p < 0,001 en Anova unidireccional tanto para el número de colonias/placa como para VCN. Se muestran los valores medios ± DE. Se obtuvieron resultados similares con mHSPC -/- y +/- (B) Actividad de GALC medida en mHSPC transducidas. Después de la transducción con GALC.LV, las GALC -/- (aquí -/-) (n = 5) y GALC +/- (aquí +/-) (n = 5) mHSPC mostraron un aumento de 2 veces en la actividad de GALC por encima de los niveles de tipo natural (mHSPC +/- transducidas con GFP.LV, n = 5). No se detectó aumento en la actividad en mHSPC transducidas con un GALC.LV regulado por mirl42 (mirl42T) (n = 3).

Figura 11. Función deteriorada de HSPC humanas tras la expresión de GALC mediada por LV. (A) Ensayo CFC en hHSPC transducidas con GALC y LV de control. Se contó el número (N.<sup>o</sup>) de colonias/placa (eje izquierdo Y, columnas) y se midió el número de copias de LV integradas/célula (VCN) (eje derecho Y, puntos). Las n.d. (n = 4) y GLD (n = 4) hHSPC transducidas con GALC.LV mostraron un deterioro significativo en la formación de colonias en comparación con las células de control (n = 5), que no se observó después de la transducción con mirl42T GALC.LV (n = 4). Las colonias obtenidas de hHSPC transducidas con GALC.LV mostraron un contenido de vector significativamente menor, en comparación con los controles GFP/ARSA/GALC<sub>mir</sub>142T.LV. \* p < 0,001 en Anova unidireccional tanto para el número de colonias/placa como para VCN. Se muestran los valores medios ± DE. (B) Actividad de GALC medida en hHSPC transducidas. La transducción con GALC.LV permitió la reconstrucción de la actividad GALC a niveles n.d. en GLD hHSPC (n = 3), mientras que la transducción de n.d. hHSPC (n = 4 para CB y n = 3 para BM) condujo a una sobreexpresión de la enzima por encima de los niveles de transducción con GFP.LV (n = 3). No se detectó aumento en la actividad en hHSPC transducidas con un GALC.LV regulado por mirl42 (mirl42T) (n = 3).

Figura 12. Supervivencia de dos ratones tras HSCT. (A) Representación esquemática de GFP.LV y GALC.LV. (B) Supervivencia media de ratones twi que recibieron HSCT. Ratones twi trasplantados con BM total (TBM) (n = 12) o con +1+ mHSPC transducidas con GFP.LV y progenitores Scal- no transducidos (GFP.LV +1+ Lin- y +1+ Scal-

n = 7) o con +1+ mHSPC transducidas con GFP.LV y progenitores Scal- transducidos con GFP.LV (GFP.LV +1+ Lin- y GFP.LV +1+ Scal-, n = 5) lograron una mayor supervivencia en comparación con los controles no tratados (UT) (n = 10). Los ratones que recibieron -1- mHSPC transducidas con GALC.LV y progenitores +1+ Scal- (n = 7) mostraron una esperanza de vida significativamente mayor con respecto a ratones trasplantados con TBM o +1+ Lin- y Scal-. Por el contrario, el trasplante con -1- Lin- y -1- Scal- en transducción con GALC.LV (n = 13) no dio como resultado una esperanza de vida prolongada. Grupos de control: Ratones trasplantados con +1+ HSPC transducidas con GFP.LV (+1+ Lin-) (n = 10); ratones trasplantados con progenitores +1+ Scal- transducidos con GFP.LV (n = 8). \* p <0,01 en la prueba de Anova unidireccional. (C) Gráfico representativo que muestra el porcentaje de células injertadas con GFP<sup>+</sup> en la sangre periférica de un ratón twi trasplantado con +1+ mHSPC transducidas con GFP.LV y progenitores Scal-.

Figura 13. Deterioro de la función *in vivo* de mHSPC en ratones FVB/twi. Supervivencia media de ratones que recibieron trasplante de mHSPC, como se indica. Los ratones -/- trasplantados con mHSPC +/- transducidas con GFP.LV (n = 11) lograron una supervivencia más prolongada en comparación con los controles no tratados (UT); por el contrario, los ratones -/- (n = 9) y +/- (°) (n = 5) trasplantados con mHSPC -/- transducidas con GALC.LV no sobrevivieron después de la irradiación letal. Tabla 2. Promedio de VCN DE detectado en la BM de ratones -/- o +/- trasplantados con las mHSPC enumeradas (transducidas con GALC.LV o GFP.LV) 20 y 120 días después del trasplante (n = 3 puntos de tiempo). (°) huésped +/- (°) Se obtuvieron resultados similares usando mHSPC +/-.

Figura 14. Apoptosis de HSPC murinas y humanas que expresan GALC. (A-B) Ensayo TUNEL en mHSPC -/- (izquierda) y hHSPC (derecha) (de n.d. CB y GLD BM) 2 y 5 días después de la transferencia génica. Se indica el % de núcleos TUNEL<sup>+</sup> sobre el número total de células nucleadas. Se contaron 8 campos y 100 células por condición. Se obtuvieron resultados similares usando mHSPC +/- (A) La gran mayoría de mHSPC y hHSPC transducidas con GALC.LV fueron TUNEL positivas tanto a los 2 como a los 5 días después de la transducción. (B) Ensayo TUNEL (rojo) y tinción ToPro (TPH, azul) para núcleos en mHSPC y hHSPC a los 2 y (mHSPC) días después de la transducción con el LV indicado: Imágenes representativas (las imágenes se adquirieron por microscopio confocal de tres láseres - Radiance 2100, BioRad; las señales fluorescentes de secciones ópticas individuales se adquirieron secuencialmente y se analizaron por el software Adobe Photoshop CS; aumento 100x). (C) Análisis citofluorimétrico de la tinción con Anexina V en mHSPC (paneles superiores) (de ratones donantes -/-) y hHSPC (paneles inferiores) (de n.d. CB). La fracción de células apoptóticas es mayor entre mHSPC y hHSPC transducidas con GALC.LV en comparación con los controles transducidos con GFP. CMT = control positivo tratado con camptotecina. La adquisición se realizó con FACS Calibur 2, Beckton Dickinson. Se puntuaron al menos 10.000 eventos y el software FlowJo 8.5.3 procesó los datos. Se muestran datos de mHSPC -/- y n.d. CB (y GLD BM para TUNEL), pero se obtuvieron hallazgos similares después de la transducción con GALC de mHSPC +/- en comparación con las células -/- y en n.d. BM (TUNEL y Anexina V) y GLD BM (Anexina V) hHSPC en comparación con las células CB.

Figura 15. El tratamiento con IGF1 impide la apoptosis de HSPC que expresan GALC. (A) Ensayo CFC en mHSPC transducidas con GALC.LV y ARSA.LV tratadas o no con IGF 1. Se contó el número (N.º) de colonias/placa (eje izquierdo Y, barras) y se midió el número de copias de vector lentiviral integradas/célula (VCN) (eje derecho Y, puntos). El tratamiento con IGF 1 indujo el crecimiento de un mayor número de colonias, en comparación con las células no tratadas transducidas con GALC.LV (n = 4 experimentos independientes). Tras el tratamiento antiapoptótico, el VCN de las células transducidas con GALC.LV se acercó al de las células de control transducidas con ARSA.LV (tanto para el número de CFC como para el Anova unidireccional de VCN: \* = p <0,001 para la comparación de mHSPC transducidas con GALC tratadas con células transducidas con GALC.LV no tratadas; p > 0.05 para la comparación de mHSPC transducidas con GALC.LV tratadas con células transducidas con ARSA.LV). (B) Las colonias cultivadas a partir de mHSPC tratadas también mostraron un aumento de tamaño (imágenes a la derecha, aumento de 5x). (C) Ensayo TUNEL en mHSPC transducidas con GALC.LV y ARSA.LV tratadas o no con IGF1. Se contaron 8 campos y 100 células por condición. La gran mayoría de las células tratadas fueron negativas para TUNEL (Anova unidireccional: p <0,001 para la comparación con células transducidas con GALC.LV no tratadas; p >0,05 para la comparación con células transducidas con ARSA.LV). (D) Actividad de GALC medida en mHSPC transducidas de ratones -/- o +/- . El tratamiento con IGF1 no afectó significativamente a los niveles de expresión de GALC (n = 3) en comparación con los controles no tratados transducidos (n = 6). Se muestran los valores medios DE.

Figura 16. Análisis de la activación de catepsina D en células transducidas. Análisis de transferencia de Western para catepsina D en mHSPC transducidas con GFP.LV o GALC.LV y células U937 a diferentes intervalos después de la transferencia génica, como se indica. La forma activada corresponde a la isoforma unida a la membrana de 30 kDa, como se indica por la flecha. No se observó acumulación significativa de la forma activa de catepsina D en las células transducidas con GALC.LV después de la transferencia génica, en comparación con las células transducidas con GFP.LV. El precursor (48 kDa, flecha) se acumuló en las células transducidas con GFP después de 7 días de cultivo (GFP 7 d), mientras que su acumulación fue menos pronunciada en presencia de GALC (GALC 5 d), que culminó con la desaparición tanto de las formas precursoras como maduras después de 7 días. Se usó un anti-actina como control para la carga de proteínas.

Figura 17. Actividad de GALC basal en diferentes tipos de células. La actividad de GALC basal se normalizó al

nivel de mHSPC de tipo natural. Tanto los oligodendrocitos primarios de tipo natural (n = 4) como la microglía (n = 4) mostraron una mayor actividad de GALT en comparación con mHSPC.

Figura 18. Sensibilidad a la expresión de GALT *de novo* en células mieloides. Resultados del ensayo TUNEL (% de células TUNEL+ sobre las células nucleadas totales, en el eje Y izquierdo, barras), determinación de la actividad de GALT (en el eje Y derecho, puntos) y, cuando sea posible, tinciones dedicadas, realizadas en (A) monocitos humanos, (B) la línea celular humana monocítica U, (C) macrófagos murinos y D) microglía murina, 5 días después de la transducción. En todas las condiciones ensayadas, la tinción TUNEL demostró la aparición de apoptosis menor/nula (se contaron  $\geq 6$  campos y  $\geq 250$  células por condición), a pesar de la transducción eficiente (evaluada por tinción anti-HA en macrófagos en (C)), y se obtuvo la expresión sostenida de GALT por encima de los niveles basales en todas las demás muestras (células transducidas con ARSA.LV o GFP.LV). Se muestran los valores medios  $\pm$  DE. (C y D) Imágenes representativas del ensayo TUNEL en macrófagos transducidos con GALT/GALT-HA.LV o GFP.LV (C) y microglía (D). Las imágenes se adquirieron por microscopio confocal de tres láseres (Radiance 2100, BioRad). Las señales fluorescentes de secciones ópticas individuales se adquirieron secuencialmente y se analizaron por el software Adobe Photoshop CS. Aumento: 80x en C, 100x en D.

Figura 19. Sensibilidad a la expresión de GALT *de novo* en linfocitos. Resultados del ensayo TUNEL (% de células TUNEL+ sobre el total de células nucleadas, en el eje Y izquierdo, barras), determinación de la actividad de GALT (en el eje Y derecho, puntos), realizado en linfocitos T y B, 5 días después de la transducción. La tinción TUNEL demostró la aparición de apoptosis menor/nula (se contaron  $\geq 6$  campos y  $\geq 250$  células por condición), a pesar de la transducción eficiente (véase la expresión sostenida de GALT por encima de los niveles basales). Se muestran los valores medios  $\pm$  DE.

Figura 20. Sensibilidad a la expresión de GALT *de novo* en oligodendrocitos. (A) Ensayo TUNEL (% de células TUNEL+ sobre el total de células nucleadas, en el eje Y izquierdo, barras), determinación de la actividad de GALT (en el eje Y derecho, puntos), realizado 5 días después de la transducción. La tinción TUNEL demostró la aparición de apoptosis menor/nula (se contaron  $\geq 6$  campos y  $\geq 250$  células por condición), a pesar de la transducción eficiente (véase la expresión sostenida de GALT por encima de los niveles basales). Se muestran los valores medios  $\pm$  DE. (B) Imágenes representativas del ensayo TUNEL en oligodendrocitos transducidos con GALT.LV o GFP.LV. La pureza de la preparación de oligodendrocitos se verificó mediante tinción con NG2 y Gal-Cer en células no transducidas (UT), mientras que la microglía se tiñó con F4/80 en células transducidas con GALT.LV; se usó ToPro (TPIII) para teñir los núcleos. Las imágenes se adquirieron por microscopio confocal de tres láseres (Radiance 2100, BioRad). Las señales fluorescentes de secciones ópticas individuales se adquirieron secuencialmente y se analizaron por el software Adobe Photoshop CS. Aumento: 40x.

Figura 21. Regulación de la expresión de GALT por miRNA126. (A) Representación esquemática de GALT.miRNA126Tag.LV. (B-C) Ensayo de actividad de GALT y ensayo CFC realizados en -1- mHSPC transducidas con GALT.miRNA126Tag.LV (GALT.126miT) o con GALT.LV o GFP.miRNA126Tag.LV. (B) La actividad se normalizó con respecto a los niveles +1+ (primera columna). Las células transducidas con GALT.miRNA126Tag.LV sobreexpresan GALT a niveles suprafisiológicos. (C) Se contó el número (N.º) de colonias/placa (eje izquierdo Y, barras) y se midió el número de copias de vector lentiviral integradas/célula (VCN) (eje derecho Y, puntos). La represión de la expresión de GALT por miRNA126 permitió el crecimiento de un mayor número de colonias, en comparación con las células transducidas con GALT.LV (n = 4 experimentos independientes). \* p < 0,01 en la prueba de Anova unidireccional.

Figura 22. La regulación de miRNA126 de la expresión de GALT impide la apoptosis de mHSPC. (A) Ensayo TUNEL en GALT.miRNA126Tag.LV o GALT.LV y mHSPC transducidas con GFP.miRNA126Tag.LV. Se contaron  $\geq 8$  campos y  $\geq 100$  células por condición. La gran mayoría de las células transducidas con GALT.miRNA126Tag.LV fue negativa para TUNEL. (B) Ensayo TUNEL (rojo) y tinción ToPro (TPIII, azul) para núcleos en mHSPC -/- transducidas con GALT.miRNA126Tag.LV o GALT.LV 5 días después de la transducción: Imágenes representativas (las imágenes se adquirieron por microscopio confocal de tres láseres - Radiance 2100, BioRad; las señales fluorescentes de secciones ópticas individuales se adquirieron secuencialmente y se analizaron por el software Adobe Photoshop CS; aumento 40x).

Figura 23. Toxicidad de la expresión de GALT *de novo* en HSPC y rescate por regulación de miR-126. Los LV indicados (A) se usaron para transducir HSPC murinas y humanas obtenidas de ratones *Galc-1- (-/-)* y genéticamente intactos (+/+), así como sangre de cordón umbilical (CB) y médula ósea (BM) de donantes normales, respectivamente. La actividad de GALT (B) y el número de copias de vector (VCN) (C) se midieron en la progenie de cultivo *in vitro* de HSPC murinas (paneles superiores) y humanas (paneles inferiores) transducidas (se muestran datos agrupados de HSPC -/- y +/+ en el panel superior C). (D) Se informa el número (N.º) de colonias recuperadas de los ensayos clonogénicos (CFC) realizados al final de la transducción con el LV indicado en HSPC murinas -/- (panel superior) y humanas (panel inferior). (E) El ensayo TUNEL se realizó dos días después de la transducción con el LV indicado en HSPC -/- murinas (panel superior) y células CD34+ de CB y BM de donantes normales (panel inferior). Se evaluó la frecuencia de la apoptosis entre las células transducidas (% células TUNEL+). Cada punto representa una muestra individual (B-E). En E, se contaron  $\geq 8$  campos y  $\geq 100$  células para cada muestra. \*: p < 0,05 \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001. (F) Se muestra la tinción TUNEL representativa en HSPC

transducidas con GFP LV y GALC LV. Aumento 100X.

Figura 24. Mejora de la supervivencia de ratones GLD después de la terapia génica con HSC. Las HSPC murinas Galc -/- o +/- se transdujeron con los vectores indicados y se trasplantaron por vía intravenosa en ratones Trs según el esquema experimental en **(A)**. Se muestran la supervivencia promedio  $\pm$  DE y el injerto promedio de las células transducidas, medido como % de células GFP<sup>+</sup> o VCN detectado en la BM de ratones trasplantados ( $\pm$  DE) a los 120 días o al morir (n = 4-26 por grupo). (§) Se obtuvieron resultados similares usando mHSPC +/- . La supervivencia de ratones GLD no tratados se muestra en la primera fila (\* = Sin irradiación; n.a. = no aplicable). **(B)** Los monocitos primarios humanos, los linfocitos B y T y la microglía murina se transdujeron con los vectores indicados. La actividad de GALC (expresada como múltiplo de células no transducidas - UT) se midió en las células cultivadas  $\geq 5$  días después de la transducción (panel central), y el ensayo TUNEL (expresado como % de células TUNEL<sup>+</sup>) se realizó 2 días después de la transducción (panel derecho). Los datos de HSPC murinas y humanas transducidas con GALC (de la figura 5) y el % de células TUNEL<sup>+</sup> en microglía transducida con GFP se informan con fines comparativos. Cada punto representa una muestra individual, en la que se contaron  $\geq 6$  campos y  $\geq 250$  células. **(C)** Imágenes representativas de la tinción TUNEL en células de microglía transducidas con GALC LV o GFP LV, como se indica, y teñidas para el marcador de microglía F4/80 (células transducidas con GALC) o GFP. Los núcleos se marcaron con ToproIII (TPIII). Aumento 100X. **(D)** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones Trs trasplantados con Galc -/- HSPC transducidas con GALC-126T LV (n = 26) o Galc +/- HSPC transducidas con GFP LV (n = 10) y de controles afectados no tratados (UT) (n = 15). GALC-126T frente a GFP en pruebas de rango logarítmico para comparación por pares: p = 0,002; GALC-126 frente a UT: p < 0,0001. **(E)** Los ratones trasplantados con GALC-126T se dividieron en dos grupos según el VCN medido en las células de BM totales en el momento de la muerte. La supervivencia se muestra para animales que portan menos (media  $\pm$  DE = 67  $\pm$  13 días) o más (media  $\pm$  DE = 117  $\pm$  43 días) de 5 copias de LV en células de BM, siendo 5 el VCN promedio medido en la BM de toda la población de ratones tratados. **(F-I)** La actividad de GALC (azul claro) se evaluó cualitativamente en secciones de cerebro de ratones trasplantados con GALC-126T y de control. Se muestran secciones representativas del hipocampo (F, G) y pons (H, I) de ratones trasplantados con GALC-126T, en comparación con ratones WT y Trs no tratados. El ensayo GALC se acopló al marcador de microglía/macrófago Iba1 (F, G) y al marcador hematopoyético CD45 (H, I). Una marcada infiltración de células hematopoyéticas activadas está presente en ratones Trs no tratados y trasplantados con GALC-126T, mostrando estos últimos actividad de GALC tanto dentro de la progenie hematopoyética de HSPC transducidas (mostrando las puntas de flecha en G e I tinción conjunta de GALC [en azul] e Iba1 [G] y CD45 [I] en marrón) y en células Iba1<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> no hematopoyéticas. Aumento 20x en (F, H) y 40x en (G, I).

#### MicroARN (miARN)

Durante mucho tiempo ha sido un dogma central de la biología que la información genética fluya del ADN al ARNm a la proteína. En otras palabras, se supone que los genes codifican proteínas, y que las proteínas cumplen todas las funciones celulares, incluida la regulación de los programas de expresión génica. Sin embargo, solo una minoría de transcripciones de ARN (2-3 %) codifican proteínas en eucariotas superiores, lo que pone en duda el dogma central de que las proteínas son los únicos efectores de la función celular (Mercer y col., 2009). De hecho, ahora hay evidencia emergente de que una clase de ARN pequeños no codificantes, llamados "microARN", cumplen un papel fundamental en la regulación de la expresión génica. Los microARN (miARN) son (Biffi y col., 2004; Sadelain M., 2006; Sadelain y col., 2005; Gaziev y col., 2005; Yesilipek MA., 2006; Abonour y col., 2000) ARN de nucleótidos largos, no codificantes que regulan negativamente la expresión génica a nivel postranscripcional al desencadenar un proceso llamado interferencia de ARN (ARNi, véase más abajo) (Bartel DP., 2004). Los microARN se descubrieron por primera vez en *Caenorhabditis elegans* en forma de lin-4 y let-7, y se demostró que regulan la temporización del desarrollo larvario. (Lee y col., 1993; Reinhart y col., 2000). Este hallazgo condujo a la búsqueda de ARN no codificantes similares que controlasen la expresión génica en eucariotas superiores. El descubrimiento de que todos los organismos expresan miARN, muchos de los cuales se conservan filogenéticamente entre especies, se ha concebido como una revolución en el campo de la biología. Según la base de datos de microARN de referencia (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)695 se han identificado diferentes miARN en seres humanos en el momento de la redacción. Los microARN han estado implicados en casi todos los procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis (Xiao y Rajewsky, 2009). También desempeñan un papel importante en enfermedades tales como el cáncer, la insuficiencia cardíaca y los trastornos metabólicos (Xiao y col., 2009; Divaka y col., 2008; Krutzfeldt y col., 2006).

Los genes de microARN están dispersos en todos los cromosomas humanos, excepto el cromosoma Y. Se pueden ubicar en regiones no codificantes del genoma o dentro de intrones de genes codificantes de proteínas. Aproximadamente el 50 % de los miARN aparecen en conglomerados que se transcriben como transcritos primarios policistrónicos (Lagos-Quintana y col., 2003). De manera similar a los genes codificantes de proteínas, los miARN generalmente se transcriben a partir de los promotores de la polimerasa-II, generando el llamado transcrito de miARN primario (pri-miARN). A continuación, este pri-miARN se procesa a través de una serie de etapas de escisión endonucleolítica, realizadas por dos enzimas que pertenecen a la familia de ARNasa Tipo III, Drosha y Dicer. Del pri-miARN, un bucle del tallo de aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, llamado precursor de miARN (pre-miARN), se extirpa por un complejo nuclear específico, compuesto por el gen de la región crítica del Drosha y síndrome de DiGeorge (DGCR8), que cultiva ambas hebras cerca de la base del bucle primario del tallo y deja un 5' fosfato y un saliente de 2 pb de longitud, 3'. A continuación, el pre-miARN se transporta activamente desde el núcleo al citoplasma



por RAN-GTP y Exportin- (Yi y col., 2003; Lund y col., 2004). A continuación, Dicer realiza un corte bicatenario al final del bucle del tallo no definido por el corte de Drosha, generando un dúplex de 19-24 pb, que está compuesto por el miARN maduro y la hebra opuesta del dúplex, que se denomina miARN\* (Bartel DP., 2004). Según la regla de asimetría termodinámica, solo una hebra del dúplex se carga selectivamente en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), y se acumula como el microARN maduro. Esta hebra generalmente es aquella cuyo extremo 5' está menos estrechamente emparejada con su complemento, como se demostró por los desajustes de un solo nucleótido introducidos en el extremo 5' de cada hebra de dúplex de ARNip (Tomari y col., 2005). Sin embargo, hay algunos miARN que admiten la acumulación de ambas cadenas de dúplex en un grado similar (Schwarz y col., 2003).

Los microARN desencadenan ARNi, muy similares a los ARN interferentes pequeños (ARNip) que se utilizan ampliamente para la desactivación génica experimental. La principal diferencia entre miARN y ARNip es su biogénesis. Una vez cargada en el RISC, la hebra guía de la molécula de ARN pequeño interactúa con las secuencias diana de ARNm que se encuentran preferentemente en la región 3' no traducida (3'UTR) de los genes codificantes de proteínas. Se ha demostrado que los nucleótidos 2-8 contados desde el extremo 5' del miARN, la llamada secuencia semilla, son esenciales para desencadenar el ARNi (Brennecke y col., 2005). Si toda la secuencia de la hebra guía es perfectamente complementaria con la diana de ARNm, como suele ser el caso de los ARNip y los miARN vegetales, el ARNm se escinde endonucleolíticamente mediante la participación de la proteína Argonaute (Ago), también llamada "cortadora" del dúplex de ARN pequeño en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). DGRC (gen 8 de la región crítica del síndrome de DiGeorge) y TRBP (proteína de unión a ARN de TAR (VIH) 2) son proteínas de unión a ARN bicatenario que facilitan la biogénesis de miARN maduro por las enzimas Drosha y Dicer RNasa III, respectivamente. La hebra guía del dúplex de miARN se incorpora al complejo efector RISC, que reconoce dianas específicas a través del emparejamiento de bases imperfecto e induce el silenciamiento génico postranscripcional. Se han propuesto varios mecanismos para este modo de regulación: Los miARN pueden inducir la represión del inicio de la traducción, marcar los ARNm diana para determinar la degradación por desadenilación, o secuestrar dianas en el cuerpo P citoplasmático.

Por otro lado, si solo la semilla es perfectamente complementaria con el ARNm diana, pero las bases restantes muestran emparejamiento incompleto, el ARNi actúa a través de múltiples mecanismos que conducen a la represión traslacional (Bartel DP., 2004; Pillai RS., 2005; Bartel DP., 2009). La degradación del ARNm eucariota se produce principalmente a través del acortamiento de la cola de poliA en el extremo 3' del ARNm, y el desencapuchado en el extremo 5', seguido de la digestión por exonucleasa 5'-3' y la acumulación del miARN en áreas citoplasmáticas discretas, los llamados cuerpos P, enriquecidos en componentes de la vía de descomposición del ARNm (Lui y col., 2005).

Los miARN que son útiles en la presente invención son miARN que se expresan en células madre y/o progenitoras hematopoyéticas pero que no se expresan ampliamente en células diferenciadas. Los ejemplos preferidos incluyen mir-130a, mir-126 y mir-223. Otros microARN adecuados incluyen microARN expresados en células madre embrionarias y las llamadas células iPS. Por ejemplo, miR-302a, miR-373 y miR-292 se expresan específicamente en células pluripotentes (ES, iPS) pero no en células madre de tipo adulto o células diferenciadas. Los microARN de la familia let-7 se expresan en todas las células excepto en las pluripotentes (ES, iPS). miR-124a se expresa específicamente en las neuronas.

#### Vectores génicos

El miARN se puede usar con un vector génico adecuado, es decir, un vector adecuado para entregar un gen (transgén) de interés, tal como un vector viral. Los vectores virales adecuados para la terapia génica se conocen bien en la técnica. Ejemplos de vectores virales útiles para la presente invención se describen en el documento WO2007/000668.

Los virus de varias familias diferentes se han modificado para generar vectores virales para la entrega de genes. Los virus que pueden usarse en la presente invención incluyen retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus de herpes simple, picornavirus y alfavirus. La presente invención emplea preferentemente retrovirus, incluyendo lentivirus.

La presente invención se puede usar para controlar la expresión de un transgén incluido en el vector. La invención también se puede usar para controlar la expresión del vector. Por ejemplo, un vector que puede controlarse por los mir-ARN de la presente invención es un virus oncolítico.

#### Trasplante de células madre hematopoyéticas

El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) es el trasplante de células madre sanguíneas derivadas de la médula ósea (en este caso conocido como trasplante de médula ósea) o sangre. El trasplante de células madre es un procedimiento médico en los campos de hematología y oncología, que se realiza con mayor frecuencia en personas con enfermedades de la sangre, la médula ósea, o ciertos tipos de cáncer.

Con la disponibilidad de los factores de crecimiento de células madre GM-CSF y G-CSF, la mayoría de los procedimientos de trasplante de células madre hematopoyéticas se realizan ahora utilizando células madre recogidas

de la sangre periférica, en lugar de la médula ósea. La recolección de células madre de sangre periférica proporciona un injerto más grande, no requiere que el donante se someta a anestesia general para recoger el injerto, da como resultado un tiempo más corto para el injerto, y puede proporcionar una tasa de recidiva a largo plazo más baja.

5 El trasplante de células madre hematopoyéticas sigue siendo un procedimiento arriesgado con muchas posibles complicaciones; tradicionalmente se ha reservado para pacientes con enfermedades potencialmente mortales. Si bien ocasionalmente se usa experimentalmente en indicaciones no neoplásicas y no hematológicas, tal como enfermedad autoinmune discapacitante grave y enfermedad cardiovascular, el riesgo de complicaciones fatales parece demasiado alto para obtener una mayor aceptación.

10 Muchos receptores de HSCT son pacientes con mieloma múltiple o leucemia que no se beneficiarían del tratamiento prolongado con quimioterapia, o que ya son resistentes a ella. Los candidatos para HSCT incluyen casos pediátricos en los que el paciente tiene un defecto congénito, tal como inmunodeficiencia combinada grave o neutropenia congénita con células madre defectuosas, y también niños o adultos con anemia aplásica que han perdido sus células madre después del nacimiento. Otras afecciones tratadas con trasplantes de células madre incluyen enfermedad de células falciformes, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, linfoma, sarcoma de Ewing, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas y enfermedad de Hodgkin. Más recientemente, se han desarrollado procedimientos no mieloablativos, o el llamado "mini trasplante", que requieren dosis más pequeñas de quimioterapia preparatoria y radiación. Esto ha permitido que el HSCT se realice en ancianos y otros pacientes que de otro modo se considerarían demasiado débiles para soportar un régimen de tratamiento convencional. La presente invención tiene como objetivo ampliar la aplicación terapéutica de dichos tratamientos mejorando su seguridad y/o eficacia.

#### Enfermedades

25 La presente invención es particularmente útil en terapia génica. En particular, aquellas terapias que implican la expresión de un transgén potencialmente tóxico. Las enfermedades que pueden tratarse según la presente invención incluyen trastornos de almacenamiento lisosómico (LSD) tales como leucodistrofia de células globoides (GLD). Otro ejemplo de una enfermedad tratable por la presente invención es enfermedad granulomatosa crónica (CGD).

30 La leucodistrofia de células globoides (GLD), o enfermedad de Krabbe, es causada por mutaciones en el gen GALT, lo que causa una deficiencia de una enzima llamada galactosilceramidasa. La acumulación de lípidos no metabolizados afecta al crecimiento de la vaina protectora de mielina del nervio (la cubierta que aísla muchos nervios) y causa una grave degeneración de las habilidades motrices. Como parte de un grupo de trastornos conocidos como leucodistrofias, la enfermedad de Krabbe es resultado del crecimiento y desarrollo imperfecto de la mielina. Un tratamiento de terapia génica de GLD implica inducir el gen GALT en el paciente. Por ejemplo, la GALT podría introducirse en HSPC o HSC, que a continuación se trasplanta al paciente. Los presentes inventores encontraron toxicidad y deterioro funcional *in vitro* e *in vivo* de las HSPC murinas y humanas después de la transferencia y expresión génica de GALT mediadas por LV. Esta toxicidad podría superarse usando los vectores genéticos de la presente invención.

40 La entrega de uno o más genes terapéuticos por un sistema de vectores según la presente invención puede usarse en solitario o en combinación con otros tratamientos o componentes del tratamiento.

45 Por ejemplo, el vector de la presente invención puede usarse para entregar uno o más transgenes útiles en el tratamiento de los trastornos enumerados en el documento WO-A-98/05635. Para facilitar la referencia, ahora se proporciona parte de esa lista: cáncer, inflamación o enfermedad inflamatoria, trastornos dermatológicos, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación y respuesta de fase aguda, caquexia, anorexia, infección aguda, infección por VIH, estados de choque, reacciones de injerto contra huésped, enfermedad autoinmune, lesión por reperfusión, meningitis, migraña y antitrombosis dependiente de aspirina; crecimiento tumoral, invasión y diseminación, angiogénesis, metástasis, neoplasia, ascitis y derrame pleural maligno; isquemia cerebral, cardiopatía isquémica, osteoartritis, artritis reumatoide, osteoporosis, asma, esclerosis múltiple, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, ictus, vasculitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; periodontitis, gingivitis; psoriasis, dermatitis atópica, úlceras crónicas, epidermolisis ampollosa; ulceración corneal, retinopatía y cicatrización de heridas quirúrgicas; rinitis, conjuntivitis alérgica, eccema, anafilaxia; reestenosis, insuficiencia cardíaca congestiva, endometriosis, aterosclerosis o endosciosis.

Además, o como alternativa, el vector de la presente invención se puede usar para entregar uno o más transgenes útiles en el tratamiento de trastornos enumerados en el documento WO-A-98/07859. Para facilitar la referencia, ahora se proporciona parte de esa lista: actividad de citocinas y proliferación/diferenciación celular; actividad inmunosupresora o inmunoestimulante (por ejemplo, para tratar la inmunodeficiencia, incluyendo infección con el virus de la inmunodeficiencia humana; regulación del crecimiento de linfocitos; tratar el cáncer y muchas enfermedades autoinmunes, y para impedir el rechazo de trasplante o inducir inmunidad tumoral); regulación de la hematopoyesis, por ejemplo, tratamiento de enfermedades mieloides o linfoides; promover el crecimiento de hueso, cartílago, tendón, ligamento y tejido nervioso, por ejemplo, para curar heridas, tratamiento de quemaduras, úlceras y enfermedad periodontal y neurodegeneración; inhibición o activación de la hormona folículo estimulante (modulación de la fertilidad); actividad quimiotáctica/quimiocinética (por ejemplo, para movilizar tipos de células específicos a sitios de



lesión o infección); actividad hemostática y trombolítica (por ejemplo, para tratar la hemofilia e ictus); actividad antiinflamatoria (para tratar, por ejemplo, choque séptico o enfermedad de Crohn); como antimicrobianos; moduladores, por ejemplo, del metabolismo o el comportamiento; como analgésicos; tratar trastornos de deficiencia específicos; en el tratamiento de, por ejemplo, psoriasis, en medicina humana o veterinaria.

Además, o como alternativa, el vector retroviral de la presente invención se puede usar para entregar uno o más transgenes útiles en el tratamiento de trastornos enumerados en el documento WO-A-98/09985. Para facilitar la referencia, ahora se proporciona parte de esa lista: actividad inhibidora de macrófagos y/o inhibidora de linfocitos T y, por lo tanto, actividad antiinflamatoria; actividad autoinmune, es decir, efectos inhibidores contra una respuesta inmune celular y/o humoral, que incluye una respuesta no asociada con inflamación; inhibir la capacidad de los macrófagos y los linfocitos T para adherirse a los componentes de la matriz extracelular y la fibronectina, así como la expresión del receptor Fas regulada positivamente en los linfocitos T; inhibir la reacción inmune no deseada y la inflamación, incluida la artritis, incluida la artritis reumatoide, inflamación asociada con hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedades del colágeno y otras enfermedades autoinmunes, inflamación asociada con la aterosclerosis, arterosclerosis, enfermedad ateosclerótica del corazón, lesión por reperfusión, arresto cardíaco, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome de distrés respiratorio, u otras enfermedades cardiopulmonares, inflamación asociada con úlcera péptica, colitis ulcerosa y otras enfermedades del tracto gastrointestinal, fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas, tiroiditis u otras enfermedades de las glándulas, glomerulonefritis u otras enfermedades renales y urológicas, otitis u otras enfermedades otorrinolaringológicas, dermatitis u otras enfermedades de la piel, enfermedades periodontales u otras enfermedades de los dientes, orquitis o epididimoorquitis, infertilidad, traumatismo orquídico u otras enfermedades testiculares inmunorrelacionadas, disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, aborto habitual, eclampsia, preeclampsia y otras enfermedades ginecológicas inmunorrelacionadas y/o inflamatorias/inflamatorias, uveítis posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, coriorretinitis, uveorretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, por ejemplo, retinitis o edema macular cistoide, oftalmía simpática, escleritis, retinitis pigmentosa, componentes inmunes e inflamatorios de la enfermedad del gorro frigio degenerativa, componentes inflamatorios de traumatismo ocular, inflamación ocular causada por infección, vitreorretinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrices excesivas, por ejemplo, después de la cirugía de filtración de glaucoma, reacción inmune y/o de inflamación frente a implantes oculares y otras enfermedades oftálmicas inmunorrelacionadas e inflamatorias/inflamatorias, inflamación asociada con enfermedades o afecciones o trastornos autoinmunes donde, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en cualquier otro órgano, la supresión inmune y/o de inflamación sería beneficiosa, enfermedad de Parkinson, complicación y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, demencia relacionada a SIDA, encefalopatía compleja relacionada a SIDA, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades, afecciones o trastornos degenerativos del SNC, componentes inflamatorios de apoplejías, síndrome postpolio, componentes inmunes e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante aguda, encefalomiелitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillain-Barre, corea de Sydenham, miastenia gravis, pseudotumor cerebral, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, componentes inflamatorios de compresión del SNC o traumatismo del SNC o infecciones del SNC, componentes inflamatorios de atrofas y distrofias musculares, y enfermedades, afecciones o trastornos inmunorrelacionados e inflamatorios/inflamatorios, del sistema nervioso central y periférico, inflamación postraumática, choque séptico, enfermedades infecciosas, complicaciones inflamatorias o efectos secundarios de la cirugía, trasplante de médula ósea u otras complicaciones y/o efectos secundarios de trasplantes, complicaciones inflamatorias e inmunes y efectos secundarios de terapia génica, por ejemplo, debido a la infección con un vehículo vírico, o la inflamación asociada a SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta humoral y/o celular, para tratar o mejorar enfermedades proliferativas de monocitos o leucocitos, por ejemplo, leucemia, reduciendo la cantidad de monocitos o linfocitos, para la prevención y/o tratamiento del rechazo del injerto en casos de trasplante de células, tejido y órganos naturales o artificiales, tales como la córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido de piel natural o artificial.

La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica para tratar a un individuo mediante terapia génica, en la que la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del vector de la presente invención que comprende uno o más transgenes terapéuticos y/o de diagnóstico entregables o una partícula viral producida por u obtenida de la misma. La composición farmacéutica puede ser para uso humano o animal. Típicamente, un médico determinará la dosis real que será más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del individuo en particular.

La composición puede comprender opcionalmente un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del vehículo farmacéutico, excipiente o diluyente puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, el vehículo, excipiente o diluyente cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante y otros agentes portadores adecuados que puedan ayudar o aumentar la entrada viral en el sitio diana (tal como, por ejemplo, un sistema de entrega de lípidos).

Cuando sea adecuado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por uno cualquiera o más de: inhalación, en forma de supositorio o pesario, por vía tópica en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvos de uso externo, mediante el uso de un parche para la piel, por vía oral en forma de comprimidos que contienen

excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intracavernosa, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden usarse mejor en forma de una solución acuosa estéril, que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o monosacáridos para hacer que la solución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas que pueden ser formuladas de manera convencional.

La entrega de uno o más genes terapéuticos por un sistema de vectores según la invención puede usarse en solitario o en combinación con otros tratamientos o componentes del tratamiento. Las enfermedades que se pueden tratar incluyen, pero sin limitación: cáncer, enfermedades neurológicas, enfermedades hereditarias, enfermedades cardíacas, ictus, artritis, infecciones virales y enfermedades del sistema inmunitario. Los genes terapéuticos adecuados incluyen aquellos que codifican proteínas supresoras de tumores, enzimas, enzimas activadoras de profármacos, moléculas inmunomoduladoras, anticuerpos, moléculas de tipo inmunoglobulinas genomanipuladas, proteínas de fusión, hormonas, proteínas de membrana, proteínas vasoactivas o péptidos, citocinas, quimiocinas, proteínas antivirales, ARN antisentido y ribozimas.

#### Ejemplos

Secuencias de nucleótidos: en negrita: secuencia diana complementaria al miARN. En general, se usan 4 copias de dianas de miARN separadas por un enlazador de 4-6 nucleótidos. Sin embargo, esto puede optimizarse.

miR-126: UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG:  
Secuencia de miR-126T:

**GCATTATTACTCACGGTACGACGATGCATTATTACTCACGGTACGAAC**  
**GCGTGCATTATTACTCACGGTACGATCACGCATTATTACTCACGGTAC**  
**GA**

miR-130a: CAGUGCAAUGUUAAGGGCAU:  
Secuencia de miR-130aT:

**ATGCCCTTTTAACATTGCACTGTTTCGAAATGCCCTTTTAACATTGCACT**  
**GACGCGTATGCCCTTTTAACATTGCACTGATGCATATGCCCTTTTAACA**  
**TTGCACTG**

miR-223: UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA  
Secuencia de miR-223T:

**GGGGTATTTGACAACTGACACGATGGGGTATTTGACAACTGACAAC**  
**CGGTGGGGTATTTGACAACTGACATCACGGGGTATTTGACAACTGA**  
**CA**

Combinación 2/2 de 126T/130aT:

**GCATTATTACTCACGGTACGACGATGCATTATTACTCACGGTACGAAC**  
**GCGTATGCCCTTTTAACATTGCACTGATGCATATGCCCTTTTAACATTG**  
**CACTG**

126T (2 dianas):

**GCATTATTACTCACGGTACGA**CGAT**GCATTATTACTCACGGTACGA**

Diana de combinación triple (126T/130aT/223T, 2 dianas cada uno):

GCATTATTACTCACGGTACGACGATGCATTATTACTCACGGTACGAAC  
GCGTATGCCCTTTTAACATTGCACTGATGCATATGCCCTTTTAACATTG  
CACTGCCCCGGTGGGGTATTGACAACTGACATCACGGGGTATTGGA  
CAAACCTGACA

Ejemplo 1

5 Construcción y validación de vectores indicadores lentivirales de microARN

Con el fin de determinar la actividad de miARN en células hematopoyéticas que incluyen poblaciones raras y mal caracterizadas como HSC, se aprovecha la observación previa de que los transgenes expresados a partir de vectores lentivirales pueden regularse negativamente por miARN endógeno para el cual los sitios de unión artificial (miRT, sitios diana de miARN) se añaden al casete transgénico (Brown BD., 2006). Por lo tanto, el objetivo es construir vectores indicadores lentivirales de miARN que lean la actividad de miARN en tiempo real y a una resolución de células individuales. Los vectores lentivirales bidireccionales (Bd.LV) permiten la expresión coordinada de dos genes indicadores impulsados por un promotor constitutivo con actividad bidireccional, compuestos por el promotor de la fosfoglicerato cinasa humana (PGK) fusionado a una caja TATA en forma de un promotor de citomegalovirus (CMV) mínimo en orientación opuesta (Amendola M., 2005). Dado que este diseño permite que ambos indicadores se expresen como dos transcritos independientes, uno de ellos puede responder a la actividad de miARN añadiendo miRT a la 3'UTR ("indicador de miARN"), mientras que el otro, no equipado con miRT, no se verá afectado por el miARN y servirá como control interno ("normalizador"). Se clonó un panel de dichos Bd.LV que contenían la proteína verde fluorescente (GFP) como el indicador de miARN y una versión truncada del receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR) de baja afinidad humano como un normalizador expresado constitutivamente.

Se eligió investigar dos miARN que se cree que se expresan en el tejido hematopoyético, miR-223 y miR-126-3p. Se informó que miR-223 se expresaba de forma elevada y específica en células mieloides diferenciadas, pero estaba ausente en los linfocitos (Fazi F., 2005), lo que permite evaluar el rendimiento de los Bd.LV indicadores en linajes bien caracterizados. Además, se desea explorar cómo se expresaba miR-223 en las poblaciones de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC). Desde la perspectiva de la terapia génica, sería muy relevante identificar los miARN que se expresan fuertemente en HSPC pero no en la progenie diferenciada, para evitar la expresión del transgén inespecífica en poblaciones de células madre sensibles y al mismo tiempo mantener la corrección terapéutica de la progenie enferma. La clonación de miARN a gran escala ha sugerido que miR-126 podría cumplir estos criterios, ya que se detectó específicamente en CD34<sup>+</sup> HSPC humanas, pero no en otra población de células hematopoyéticas (Landgraf y col., 2007).

Se produjeron Bd.LV indicadores para miR-223 y miR-126-3p (Bd.LV-223T y Bd.LV-126T, respectivamente), así como un Bd.LV de control que no contenía ninguna miRT (figura 1). A continuación, estos vectores se evaluaron en un panel de diferentes tipos de células (figura 2). Las células de riñón embrionario HEK293T, las células monocíticas U937 y las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se transdujeron con dosis compatibles de Bd.LV-ctr, Bd.LV-223T y Bd.LV-126T, y se analizaron para determinar la expresión del indicador mediante citometría de flujo (FACS) varios días después de la transducción. Las células HEK293T expresan niveles bajos a indetectables de miR-223 o miR-126, mientras que las células U937 expresan fuertemente miR-223 pero no miR-126 (figura 2a) y las HUVEC expresan miR-126 pero no miR-223 (Kuehbach y col., 2007). Como control adicional, se genomanipularon células HEK293T para expresar ectópicamente miR-126 (figura 2a) mediante transducción con un LV que contenía pri-mir-126 bajo el control de un promotor ubicuo (ahora denominado HEK293T.LV.miR-126, a diferencia de las células HEK293T de tipo natural).

En las células HEK293T, la intensidad de fluorescencia media (MFI) de GFP de las células transducidas que expresan NGFR fue idéntica para los tres Bd.LV (figura 2b, columna izquierda), confirmando que ni miR-223 ni miR-126-3p se expresaron en estas células. En marcado contraste, las células U937 transducidas con Bd.LV.223T mostraron una reducción sustancial en la GFP MFI en comparación con Bd.LV.126T o Bd.LV.ctrl, lo que indica que miR-223, pero no miR-126, era biológicamente activo en células U937. Por el contrario, las HUVEC mostraron una represión de GFP específicamente para Bd.LV-126T en comparación con el vector de control. De manera similar, las células HEK293T.LV.miR-126 transducidas con el indicador Bd.LV-126T regularon fuertemente la expresión descendente de GFP en comparación con las células HEK293T de tipo natural (comparar el último con el primer gráfico en la tercera fila de la figura 2b).

Para describir la actividad de miARN en términos más cuantitativos, se calculó un valor de "represión múltiplo de proteínas" (FR) basado en las intensidades de fluorescencia medias (MFI) normalizadas del Bd.LV indicador de miARN con respecto al Bd.LV de control (figura 2c). Para tener en cuenta los diferentes niveles de transferencia génica entre los grupos de vectores, se usó el normalizador interno, NGFR, que se transcribe en cantidades estequiométricas con el indicador de miARN, GFP. Por lo tanto, se activó el análisis FACS en las células NGFR positivas, y se calculó una "relación transgénica" (TGR), dividiendo la NGFR MFI por la GFP MFI para cada Bd.LV. La TGR obtenida para los vectores indicadores de miARN (Bd.LV.223T o Bd.LV.126T, respectivamente) se dividió entonces por la TGR del

Bd.LV de control. Este cociente, que se denominará "represión múltiplo" de ahora en adelante, es independiente de la dosis del vector y el nivel de transducción (al menos dentro de la porción lineal de la curva de respuesta a la dosis del vector) y proporciona una lectura cuantitativa de la actividad de miARN en las células analizadas (figura 2c). Las miRT se diseñaron para ser perfectamente complementarias al miARN análogo. Por lo tanto, se esperaba que los transcritos reconocidos por el miARN se degradaran. Para probar esto, se midieron los transcritos de ARNm de NGFR y GFP por RT-QPCR en células U937 y HEK293T.LV.miR-126, y se calculó una "represión múltiplo de ARN" como se describe en la figura 2c. De hecho, los transcritos de GFP se redujeron en relación con los transcritos de NGFR en las células U937.Bd.LV.223T, así como en las células HEK293T.LV.miR-126.Bd.LV.126T, como se muestra por los valores calculados de represión múltiplo de ARN de 7 y 14, respectivamente (figura 2c, rombos).

Tomados en conjunto, estos resultados indican que estos Bd.LV regulados por miARN informaron fielmente la actividad de miARN en las líneas celulares, según los propios datos de expresión de miARN publicados previamente. Además de las técnicas convencionales de creación de perfiles de miARN, estos vectores informan no solo de la presencia de un miARN, sino también de su bioactividad. El análisis FACS de las células portadoras de este indicador de Bd.LV permite evaluar la actividad de miARN a nivel de células individuales y, por lo tanto, es adecuado para analizar mezclas de células heterogéneas, que pueden subdividirse adicionalmente mediante inmunofenotipado.

Caracterización de la actividad de miR-223 y miR-126 en el sistema hematopoyético de ratón

Una vez que se demostró la fiabilidad de los Bd.LV indicadores en la medición de la actividad de miARN en las líneas celulares, se pasó a investigar la actividad de los miARN mencionados anteriormente en células hematopoyéticas primarias. Con este objetivo, se aprovecha el modelo murino porque está ampliamente disponible, se manipula fácilmente en un entorno experimental y está bien caracterizado. De hecho, cuando se pretende definir la actividad de miARN en poblaciones raras de HSPC, el sistema hematopoyético murino, bien caracterizado por marcadores de superficie, representa una gran ventaja. Este enfoque experimental fue enriquecer las HSPC murinas de médula ósea mediante el agotamiento de las células positivas de marcador de linaje, para transducirlas con vectores indicadores de miARN lentivirales y trasplantar estas células en ratones receptores congénicos irradiados letalmente. A continuación, la actividad de microARN se monitorizó en leucocitos de sangre periférica en el tiempo para determinar su actividad en células diferenciadas. Una vez alcanzado el injerto estable, se sacrificó a los ratones y se determinó la actividad de miARN en múltiples poblaciones de médula ósea definidas por inmunofenotipado de superficie. De esta manera, se desea evaluar si estos miARN se expresaban en HSPC identificadas prospectivamente. En particular, se desea determinar si miR-126 está presente en el compartimento de HSC más primitivas. El primer conjunto de ratones fue trasplantado con HSPC transducidas por los Bd.LV indicadores previamente descritos (véase la figura 1; Bd.LV-ctr, n = 5 ratones trasplantados; Bd.LV-223T, n = 6 ratones; o Bd.LV-126T, n = 4 ratones).

Se tomaron muestras de sangre periférica (PB) 8 semanas después del trasplante, y las poblaciones de leucocitos se clasificaron según parámetros físicos y marcadores de superficie en granulocitos (dispersión lateralhi de CD11b+SSChi), monocitos (CD11b+SSClo), linfocitos B (CD19+) y linfocitos T (CD11b-CD19-) (figura 3a). La expresión del indicador de miARN de GFP y normalizador NGFR se cuantificó dentro de estos subconjuntos de leucocitos mediante FACS (figura 3b). Si bien la GFP se expresó de manera similar en todos los subconjuntos de leucocitos derivados de HSPC transducidas con Bd.LV-ctr y Bd.LV-126T, cabe apreciar una regulación descendente profunda de GFP específicamente en células mieloides de PB pero no en linfocitos dentro del grupo Bd.LV-223T. La cuantificación de la actividad de miR-223 indicó una represión de 30 y 17 veces en granulocitos y monocitos, respectivamente, mientras que miR-126 no estaba activo en los leucocitos PB (figura 3c). Para caracterizar el perfil de miR-223 y miR-126 en distintos subconjuntos de HSPC, se sacrificaron ratones indicadores de Bd.LV y se sometió su médula ósea a un análisis de inmunofenotipado multicolor para identificar prospectivamente subpoblaciones de células madre y progenitoras distintas. Esto se hizo para los ratones descritos anteriormente, pero también en un experimento posterior en ratones trasplantados con HSPC que expresaban un indicador de miARN más sensible basado en una variante de GFP desestabilizada. Este indicador contiene una secuencia rica en prolina-glutamato-serina-treonina (PEST) fusionada con el extremo C-terminal de GFP. El motivo PEST media la degradación proteasómica rápida y el recambio rápido de la proteína, acortando la semivida de la GFP de aproximadamente 26 h a 4 h (Kitsera y col., 2007). Esta corta semivida de la dGFP permitió detectar con mayor precisión los cambios en la expresión de miARN, que posiblemente tengan lugar durante el tránsito de HSC hacia progenitores comprometidos. Para determinar de manera fiable la señal de dGFP, que es más baja que la de la GFP estándar, la autofluorescencia en cada subpoblación individual se restó de la GFP MFI incluyendo un grupo de ratones portadores de un vector Bd.LV-NGFR que no contenía el gen GFP. Los gráficos FACS en la figura 4 siguiente se obtuvieron a partir de la BM de ratones trasplantados con los vectores Bd.dGFP más sensibles. Sin embargo, la determinación de la actividad de miARN en los ratones portadores del indicador estándar de GFP dio resultados muy similares, de modo que la represión múltiplo en la figura 3c podría calcularse sobre los datos combinados de los dos experimentos independientes realizados (Bd-ctr, n = 10; Bd-223T, n = 9; Bd-126T, n = 13 ratones).

#### Huella de la actividad del microARN en HSPC murinas y su progenie

A continuación, se cuantificaron los niveles de proteína indicadora de BdLV en múltiples subpoblaciones hematopoyéticas identificadas prospectivamente aisladas de los ratones reconstituidos. El compartimento de HSPC se definió como células de médula ósea (BM) que tienen un inmunofenotipo c-Kit<sup>hi</sup> de marcadores de linaje<sup>flw</sup>, y se



subdividió en fracciones con diferente potencial de autorrenovación y diferenciación basado en la expresión de Sca-1, CD150, CD48 y CD45. Cabe destacar que se informó que 3 de 5 células con el inmunofenotipo c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> (KSL) CD150<sup>hi</sup> CD48<sup>-</sup> tenían potencial de repoblación multilínea a largo plazo tras el trasplante de células individuales, y, por lo tanto, representan HSC *bona fide* (Kiel MJ., 2005). Además, basándose en la bibliografía (Pronk CJ., 2007) y estos propios hallazgos, se subdividieron las células Kit<sup>+</sup> Sca<sup>-</sup> Linaje<sup>-</sup> en subconjuntos enriquecidos en progenitores de granulocitos/monocitos (GMP) frente a progenitores de megacariocitos y eritrocitos (EP), y se evaluó la expresión de miARN. Curiosamente, miR-126, miR-130a y miR-196b mostraron la mayor actividad en fracciones enriquecidas en las HSC más primitivas, y esta actividad se perdió durante las primeras etapas de diferenciación (figura 4). Es importante destacar que miR-126, miR-130a y miR-196b están en gran parte inactivos en las células diferenciadas de los linajes linfoides y mieloides, con la excepción de los granulocitos diferenciados terminalmente, que parecen restablecer algún grado de actividad de miR-126. El miR-223 se expresó en la mayoría de las células KSL, y en todos los progenitores mieloides (GMP), pero se reguló negativamente en los EP. Como era de esperar, miR-223 se aumentó progresivamente durante la diferenciación mieloides, mientras que los linfocitos B y T estaban desprovistos de éste (figura 5a). Además, los miembros del conglomerado miR-17-92 (miR-19, miR-93a, miR-17-5p) dieron como resultado una alta expresión en HSPC. Sin embargo, su actividad supresora se mantuvo durante la diferenciación adicional, y disminuyó hasta cierto punto solo en linfocitos B diferenciados terminalmente y granulocitos (figura 5a). Finalmente, let-7a retuvo una actividad supresora sustancial en todos los tipos de células hematopoyéticas, incluyendo HSC *bona fide*, consistente con su patrón de expresión ubicuo.

## Protección de las HSC del suicidio condicional por miR-126

Las huellas de actividad de miARN mencionadas anteriormente se basaron en el aislamiento prospectivo de poblaciones de células hematopoyéticas según el inmunofenotipo. Para establecer de manera concluyente la actividad de miARN seleccionados en subconjuntos de células funcionalmente definidos, se diseñó un sistema de suicidio condicional basado en vectores lentivirales que expresaban el gen timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple regulado por diferentes secuencias miRT (figura 6a). Dado que la TK es muy estable con una semivida de -35 horas, se desestabilizó la proteína TK (ahora llamada dTK) fusionando el dominio PEST de d4GFP con el extremo C-terminal de la TK. Las HSPC se transdujeron con uno de los vectores suicidas indicados o con un vector de control de GFP, y se colocaron en placas en medio semisólido, en presencia o ausencia de GCV (figura 6b). Las HSPC transducidas con el vector TK de control no dieron lugar a colonias en presencia de GCV. La adición de secuencias de miR-142T al transcrito de dTK rescató por completo la formación de colonias, en línea con la expresión pan-hematopoyética de este miARN (Brown BD., 2006). En cambio, miR-223T restableció, al menos parcialmente, el crecimiento de colonias mieloides, mientras que el número de colonias eritroides se redujo significativamente ( $p < 0,001$ ) y no difirió estadísticamente de las células transducidas con TK de control. También se obtuvo un rescate parcial de colonias mieloides con el miR-126T, aunque a un nivel más bajo que el obtenido con miR-223T. El GCV evitó completamente el crecimiento de las colonias tanto mieloides como eritroides en los grupos miR-130aT, en línea con la fuerte regulación descendente de miR-130a durante las primeras etapas de diferenciación.

A continuación, se desarrolló un ensayo de suicidio *in vivo* para demostrar la actividad de miARN en HSC definidas funcionalmente. El sistema suicida de TK/GCV requiere la división celular para volverse tóxico. Experimentos piloto que cotrasplantaron células transducidas con TK con células de soporte de BM no transducidas indicaron que un ciclo de tiempo de 1 semana de GCV administrado dentro de las primeras 2 semanas de injerto elimina de manera eficiente las HSC de repoblación a largo plazo transducidas con TK (datos no mostrados). A continuación, se transdujeron HSPC con un vector suicida bidireccional regulado por miARN que expresaba dTK-126T o dTK-142T y GFP, o un vector suicida bidireccional de control que expresaba dTK y  $\Delta$ NGFR. Las células transducidas con el control o uno de los vectores suicidas regulados por miARN se transplantaron conjuntamente a continuación en ratones congénicos, que recibieron o no GCV durante la fase de injerto (figura 6c). El análisis a largo plazo del quimerismo de sangre periférica indicó que la mayoría de las células NGFR<sup>+</sup> se eliminaron de manera eficiente en ratones tratados con GCV, mientras que las células GFP<sup>+</sup> persistieron en números relativos aumentados. Esto se observó en múltiples linajes (granulocitos, monocitos, linfocitos B y T) y durante un periodo de tiempo >7 meses, tanto para las células transducidas con dTK-126T como con dTK-142T. Estos datos establecen que tanto miR-126 como miR-142 se expresan en HSC de repoblación a largo plazo a niveles suficientes para evitar la expresión de proteína TK y la muerte celular inducida por GCV.

## Seguridad para aprovechar la regulación de miR-126 para terapia génica

A continuación, se derivó una línea de ratón transgénico (ratones Tg.126T) que albergaba integraciones de línea germinal de un vector lentiviral que expresaba un transcrito d4GFP.126T del mismo promotor utilizado en los estudios de BdLV descritos anteriormente. El análisis FACS de células de BM Lin<sup>-</sup> de ratones Tg.126T adultos jóvenes mostró un patrón similar de actividad de miR-126 como se observó en los ratones trasplantados (figura 7a). Esto confirma que miR-126 se expresa fisiológicamente en HSC. Se sabe que miR-126 se expresa en células endoteliales, y la pérdida de función durante el desarrollo dio como resultado mortalidad fetal debido a una angiogénesis defectuosa (Fish JE., 2008). No hubo anomalías fenotípicas graves en ratones Tg.126T. Cuando los ratones Tg.126 se entrecruzaron, se obtuvieron camadas de tamaño normal que mantuvieron el número promedio de integrantes de vector de sus padres (figura 7b). Estos datos indican que la expresión de las secuencias de miR-126T del promotor de fosfoglicerato cinasa 1 (PGK) no interfirió con el desarrollo del ratón, y argumenta en contra de la hipótesis de que la expresión de miR-

126T podría interferir con la regulación de las dianas naturales de miR-126 en las células endoteliales en estas circunstancias. Para descartar aún más este último problema en las células hematopoyéticas, se configuró un experimento competitivo de repoblación. Las CD45.1<sup>+</sup> HSPC se inyectaron conjuntamente con números iguales de CD45.2<sup>+</sup> HSPC de ratones Tg.126T en receptores CD45.1<sup>+</sup> irradiados letalmente. El quimerismo de sangre periférica fue estable y se mantuvo durante al menos 1 año (último tiempo de análisis) en aproximadamente el 40-50 % de las células CD45.2<sup>+</sup> (n = 4) para todos los linajes sanguíneos principales (figura 7c). Juntos, estos datos indican que miR-126 se expresa en HSC primitivas y el enfoque de biosensor proporciona un medio potente y no tóxico para identificar células hematopoyéticas a nivel de células individuales en función de la expresión de miARN.

#### **Caracterización de la actividad de miARN candidata en células hematopoyéticas humanas**

La caracterización de la actividad de miR-223, miR-130a y miR-126 en el sistema hematopoyético murino propuso estos miARN como reguladores endógenos prometedores para limitar la toxicidad transgénica en HSPC mientras se permite la expresión terapéutica en células mieloides y linfoides diferenciadas. A continuación, se buscó investigar la actividad de estos miARN en células hematopoyéticas humanas, que son los objetivos reales para la terapia génica. Se transdujeron células CB CD34<sup>+</sup> humanas con Bd.LV indicadores para miR-126, miR-130a, miR-223 (figura 8A). Las células se cultivaron *in vitro* en condiciones que proporcionan soporte para el mantenimiento a corto plazo de HSPC, y las subpoblaciones basadas en la expresión de CD34/CD38 se identificaron por citometría de flujo. La diferenciación mieloide (CD13<sup>+</sup>) y eritroide (CD235<sup>+</sup>) se ensayó usando el ensayo de metilcelulosa. miR-126, miR-130a y miR-223 suprimieron sus respectivos transcritos indicadores en la población de CD34<sup>+</sup> HSPC. Tras la diferenciación, miR-223 mantuvo la actividad en el linaje mieloide, mientras que disminuyó durante la diferenciación eritroide. Por el contrario, miR-126 perdió su actividad durante la diferenciación mieloide, pero la mantuvo en la progenie eritroide. Estos patrones de expresión se verificaron funcionalmente por ensayo de suicidio condicional (figura 8b). miR-130a perdió su actividad tanto en los linajes mieloides como en los eritroides. La cuantificación de la actividad de miARN en las poblaciones respectivas (figura 8A) indicó que, entre los miARN ensayados, miR-126 era el miARN más potente en las fracciones de CB CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> enriquecidas en HSPC primitivas. La figura 8c/d muestra una optimización adicional de la secuencia miRT combinando secuencias de miR-126T y miR-130aT.

#### **Ejemplo 2**

##### **Expresión de GALC forzada en HSPC**

Para evaluar la viabilidad de la sobreexpresión de GALC en HSPC murinas (mHSPC), se aislaron células Lin- de ratones FVB/twi (GALC -/-). Las mHSPC se transdujeron a MOI 100 con GALC.LV en presencia de una combinación de citocinas optimizada (Biffi y col., 2004). Después de la transducción, las células se cultivaron 10-14 días *in vitro* para evaluar la actividad enzimática y el número de copias del vector (VCN) por Q-PCR. Se comparó el nivel de expresión de GALC con la sobreexpresión de otras enzimas lisosómicas, arilsulfatasa A (ARSA) e -Iduronidasa (IDUA), obtenidas mediante la transducción de mHSPC con los vectores de control ARSA.LV e IDUA.LV. Todos los vectores expresaron el transgén del mismo casete de expresión que contenía el promotor PGK humano. Dado que el objetivo era comparar la sobreexpresión enzimática en HSPC -/- transducidas con respecto a los niveles enzimáticos fisiológicos en HSPC de tipo natural, se usaron mHSPC obtenidas de ratones ARSA KO y de ratones IDUA KO para la transducción con ARSA.LV e IDUA.LV, respectivamente. La transducción de mHSPC reconstituyó la actividad enzimática lisosómica en células -/- y condujo a la sobreexpresión enzimática con respecto a los niveles de tipo natural en la progenie cultivada de mHSPC -/- transducidas (figura 9A). Sin embargo, el aumento en la expresión de GALC (2 veces por encima del tipo natural) fue significativamente menor en comparación con el aumento en IDUA y ARSA obtenido por los controles IDUA.LV y ARSA.LV (320 y 5,6 veces sobre el tipo natural, respectivamente), a pesar del VCN similar.

Se realizó un experimento similar en HSPC humanas (hHSPC), aisladas a través de la selección CD34<sup>+</sup> de CB obtenida de donantes normales (n.d.). Las hHSPC se transdujeron a MOI 100 con GALC.LV, ARSA.LV e IDUA.LV, utilizando protocolos de transducción optimizados previamente 105. De manera similar a las mHSPC, se evaluó la reconstitución de la actividad enzimática y el VCN tras el cultivo *in vitro* de las células transducidas. La transducción con GALC.LV de las HSPC a partir de n.d. CB (n = 4) condujo a una sobreexpresión limitada de la enzima en la progenie de células cultivadas en comparación con los controles IDUA.LV (n = 3) y ARSA.LV (n = 6) (figura 9B).

##### **Deterioro de la función *in vitro* de HSPC que expresan GALC tras la expresión de GALC mediada por LV**

Los efectos de la transducción y la expresión enzimática sobre el potencial clonogénico de las mHSPC se evaluaron mediante ensayo CFC. Se sembró el mismo número de mHSPC transducidas con GALC/GFP/ARSA.LV para el ensayo de colonias. Se eligió ARSA como enzima lisosómica de control, ya que previamente se demostró que no afectaba a la función de las HSPC (Capontondo y col., 2007). En 12 experimentos independientes, las mHSPC -/- y +/- transducidas con GALC.LV dio lugar a un número significativamente reducido de colonias en comparación con las células transducidas con GFP.LV y ARSA.LV (figura 10A para células GALC -/-). Las colonias de mHSPC transducidas con GALC.LV tenían un tamaño notablemente reducido en comparación con los controles (figura 24B). Estos resultados sugirieron que la sobreexpresión de GALC tras la transducción del LV deterioró el potencial clonogénico de las mHSPC. La proporción relativa de colonias eritroides y mieloides tras la transducción con GALC.LV fue similar a



la de los controles (no mostrados), lo que sugiere que la expresión enzimática altera los diferentes linajes hematopoyéticos en la misma medida.

El potencial clonogénico reducido de mHSPC transducidas con GALT.LV podría ser resultado de la muerte de progenitores hematopoyéticos que sobreexpresan GALT altamente transducidos. Para investigar la posible aparición de una selección negativa de mHSPC altamente transducidas, se cuantificó el VCN de las colonias por Q-PCR. El análisis por Q-PCR se realizó en el ADN extraído de cada grupo de 4 colonias (los grupos se hicieron para tener una cantidad suficiente de material para el análisis). Las colonias obtenidas de mHSPC transducidas con GALT.LV mostraron un contenido de vector significativamente menor en comparación con los controles (figura 10A), lo que sugiere la aparición de una selección negativa de progenitores altamente transducidos.

Según estos datos, no se pudo discriminar si el deterioro funcional y la selección *in vitro* se debieron a un efecto tóxico de transducción o a la presencia de contaminantes liberados por las células productoras de vectores y copurificados con el vector. Debe mencionarse que, durante la producción de GALT.LV, las células 293T se desprenden de las placas, lo que sugiere que la expresión de GALT es tóxica también para estas células. Por esta razón, no se pudo excluir la incorporación de moléculas tóxicas derivadas de células 293T muertas en la preparación del vector. Para abordar este problema, se generó un vector de control regulado por un microARN específico de células hematopoyéticas, GALTmir142T.LV 56. Cuatro secuencias diana para el microARN 142 incorporadas aguas abajo del transgén permiten suprimir la expresión en las mHSPC y en su progenie sin afectar a la expresión de GALT en las células no hematopoyéticas, tal como las células productoras de LV 293T. Esta tecnología se basa en la regulación postranscripcional de microARN: el microARN 142, expresado solo por las células hematopoyéticas, reconoce su secuencia diana aguas abajo del transgén e inhibe la traducción del transcrito y la expresión del transgén. Como se esperaba, la transducción de mHSPC con GALTmir142T.LV no se asoció a un aumento de la actividad de GALT (figura 10B). Además, las mHSPC transducidas con GALTmir142T.LV (n = 6) mostraron un potencial clonogénico no afectado y un contenido de vector similar en comparación con los controles, confirmando así que el deterioro observado previamente depende de la expresión de GALT (figura 10A).

Se investigó el efecto de la sobreexpresión de GALT también en HSPC humanas. Las hHSPC se aislaron de n.d. CB y BM y de la BM recogida de un paciente con GLD que estaba programado descartar. Se transdujo un número igual de hHSPC con GALT.LV o ARSA.LV o se sembraron vectores de control GFP.LV para el ensayo CFC, con el fin de evaluar el potencial clonogénico de las hHSPC transducidas. Como en el caso de las células murinas, las hHSPC n.d. y de GLD transducidas con GALT.LV mostraron un potencial clonogénico deteriorado (figura 11A). Las colonias de hHSPC transducidas con GALT.LV mostraron un contenido de vector significativamente menor, en comparación con los controles, un tamaño reducido y una proporción eritroide-mieloide conservada, lo que sugiere de nuevo una selección negativa de los progenitores altamente transducidos (figura 11A). También en este caso, se usó el vector de control GALTmir142T.LV para descartar un efecto tóxico específico de la transducción. Como en el caso de las células murinas, las hHSPC transducidas con GALTmir142T.LV (n = 4) mostraron actividad de GALT y potencial clonogénico similar a los observados en las células de control (figura 11A y B).

En general, estos datos indican que la expresión forzada de GALT *de novo* tras la transducción del LV ejerce un efecto perjudicial tanto sobre HSPC murinas como humanas, lo que conduce a una selección negativa de células que sobreexpresan GALT y a un deterioro funcional.

Deterioro de la función *in vivo* de las HSPC tras la expresión de GALT mediada por LV Se realizaron experimentos *in vivo* con el objetivo de evaluar el potencial de repoblación de las mHSPC y las hHSPC tras la transducción de GALT.LV y la expresión de GALT *de novo*. Se realizaron estudios *in vivo* en ratones twi y FVB/twi para las mHSPC, y en ratones Rag2c para las hHSPC.

Los experimentos iniciales se realizaron en ratones twi, un modelo grave de GLD, como se describe en la sección Procedimientos. Se dedicó un primer conjunto de experimentos a establecer la condición de HCT en ratones twi. Se realizó un trasplante total de BM de donantes de tipo natural en estos ratones, dando como resultado un aumento significativo de su esperanza de vida de hasta 100 días, según lo informado previamente en 115. Estos experimentos preliminares permitieron definir la dosis de irradiación óptima. El uso de HSC de donante que portaban el alelo CD45.1 permitió evaluar el injerto de células de donante, ya que los ratones twi portan el alelo CD45.2. Debido a que el objetivo era transducir twi HSC, se trató de establecer el trasplante de Lin- HSPC, a fin de reducir el número de células a transducir y trasplantar en comparación con el uso de células de BM totales. Las HSPC de ratones genéticamente intactos (+/+) se transdujeron a MOI 100 con PGK\_GFP.LV (GFP.LV), en presencia de una combinación optimizada de citocinas (Biffi y col., 2004) (figura 12A). Después de la transducción, las células se trasplantaron en ratones twi letalmente irradiados de 8 días o controles +/- . Los grupos de control incluyeron también ratones twi trasplantados con células de BM de tipo natural o Lin-. Sorprendentemente, y de manera diferente a los animales de control, los ratones twi +/- trasplantados con HSPC no sobrevivieron después del acondicionamiento letal, lo que sugiere que las células Lin- en solitario no podrían repoblar ratones twi (figura 12B).

Por lo tanto, se decidió apoyar el injerto de HSPC transducidas con GFP.LV mediante el trasplante conjunto de progenitores comprometidos con células hematopoyéticas derivados de BM no transducidos, con agotamiento de HSC. Estas células se obtuvieron por agotamiento magnético de las células Sca1+ de la BM total de ratones +/-.

Curiosamente, los ratones twi trasplantados con células +/+ Lin- transducidas con GFP.LV y células +/+ Sca1- no transducidas alcanzaron una supervivencia similar a la obtenida con el trasplante de BM +/+ total (figura 12B). El injerto de HSPC transducidas con GFP.LV se evaluó mediante citometría de flujo en sangre periférica. Cinco-seis semanas después del trasplante, el análisis citofluorimétrico reveló un elevado injerto de células derivadas de GFP<sup>+</sup> HSPC (figura 12C). Por lo tanto, el trasplante conjunto de progenitores +/+ Sca1- rescató el injerto defectuoso de HSPC purificadas y permitió la prolongación de la esperanza de vida y la mejora del fenotipo de ratones twi de forma similar a como se obtuvo con el trasplante de +/+ BM total (Yeager y col., 1993; Wu y col., 2000).

Una vez que los procedimientos de trasplante se habían optimizado con HSPC +/+ y GFP.LV, se trasplantaron dos ratones con HSPC -/- transducidas con GALC.LV y con células +/+ o -/- Sca1- transducidas con GALC.LV. Los ratones Twi que recibieron HSPC -/- transducidas con GALC.LV y células +/+ no transducidas sobrevivieron significativamente más tiempo que los ratones trasplantados con +/+ BM total o con HSPC +/+ y progenitores Sca1-, y mostraron una mejora de su fenotipo y una progresión de la enfermedad más lenta (figura 12B). Estos datos sugirieron que el trasplante de HSPC que sobreexpresan GALC proporciona un beneficio terapéutico único en comparación con el HSCT convencional. Sin embargo, cuando se evaluó la presencia de células transducidas con GALC.LV en la BM de estos ratones mediante Q-PCR, se encuentra un bajo número de copias de vector (VCN), entre 0,8 y 1, lo que sugiere que solo las células transducidas con GALC.LV con un VCN bajo habían podido injertarse.

Sin embargo, los ratones twi que recibieron células -/- Lin- y Sca1-, ambas transducidas con GALC.LV, murieron después del acondicionamiento letal o tuvieron una esperanza de vida similar a la de los ratones no tratados. Estos resultados sugirieron que los progenitores transducidos con GALC.LV no pudieron soportar el injerto de HSPC, dando como resultado un fallo del injerto y la reconstitución autóloga de la hematopoyesis.

Se decidió usar ratones FVB/twi en lugar del modelo twi habitual de GLD para aprovechar el modelo ligeramente menos grave: Experimentos anteriores demostraron que el trasplante exitoso de células Lin- sin la necesidad de células de soporte de Seal- era posible en este modelo. Además, los ratones FVB/twi tienen camadas más grandes, lo que permite así tener una mayor cantidad de ratones -/- para aislar mHSPC.

Las mHSPC transducidas se trasplantaron a receptores FVB/twi -/- letalmente irradiados de 8 días y heterocigotos (+/-) (figura 13). Para reducir la variabilidad biológica, se trasplantaron camadas -/- y +/- . Los ratones del grupo control se trasplantaron con células +/+ transducidas con GFP.LV. Para este grupo de control, la eficiencia de transducción se evaluó por citofluorimetría 7 días después de la transducción en el cultivo *in vitro*, mientras que el injerto de células transducidas se evaluó por citofluorimetría en sangre periférica 6 semanas después del HSCT. La eficiencia de transducción fue muy alta, variando entre el 75 % y el 93 % de las células GFP<sup>+</sup>. Todos los animales trasplantados con GFP mostraron un alto injerto de células trasplantadas (entre el 63 % y el 85 %), y todos los controles de irradiación (ratones irradiados letalmente que no recibieron HSCT) murieron en las 3 semanas posteriores al acondicionamiento, confirmando así la configuración correcta de las condiciones del HSCT. -/ratones que recibieron mHSPC +/+ transducidas con GFP.LV lograron una supervivencia prolongada después del acondicionamiento letal (hasta 150 días), en comparación con los ratones control no trasplantados. La supervivencia de los ratones FVB/twi no tratados y trasplantados con GFP fue más larga con respecto a la observada en los respectivos grupos de ratones twi, confirmando así la influencia del trasfondo genético en la gravedad del fenotipo. El injerto de mHSPC transducidas también se evaluó mediante Q-PCR en ADN extraído de ratones trasplantados con BM en el sacrificio. Se observó un injerto significativo de mHSPC transducidas con GFP.LV, medido como VCN por genoma (Tabla 2). Sorprendentemente, los ratones tanto -/- como +/- trasplantados con mHSPC -/- o +/+ transducidas con GALC.LV no sobrevivieron a la irradiación letal (muerte en 21 días, similar a la de los controles de irradiación) (figura 13 y datos no mostrados). El análisis por Q-PCR reveló un VCN muy bajo a indetectable en su BM (Tabla 2). Estos resultados indicaron un deterioro funcional de las mHSPC transducidas con GALC, que se volvieron incapaces de repoblar un huésped acondicionado letalmente.

Apoptosis de HSPC murinas y humanas que expresan GALC.

Habiendo detectado un deterioro funcional de las HSPC transducidas con GALC.LV, se evaluó si esto podría deberse a la apoptosis de las células transducidas mediada por la expresión de GALC *de novo*. La aparición de apoptosis se evaluó en dos puntos de tiempo diferentes, 2 y 5 días después de la transducción, cuando la expresión transgénica alcanza presumiblemente el estado estable (véase la expresión de GFP en la figura 14B) mediante tinción con Anexina V y ensayo TUNEL. La primera técnica etiqueta las células apoptóticas tempranas, y la segunda, las células apoptóticas tardías. Las mHSPC y las hHSPC se transdujeron con GALC.LV y control GFP/ARSA.LV. Después de la transducción y el lavado, las células se colocaron en placas en cubreobjetos recubiertos con matrigel para el ensayo TUNEL o se colocaron en placas habituales y se tiñeron con Anexina V y TUNEL. En la microscopía confocal, la gran mayoría de las mHSPC transducidas con GALC.LV fueron TUNEL positivas y presentaron núcleos agrandados con cromatina condensada, lo que demuestra la aparición generalizada de apoptosis en ambos puntos de tiempo (figura 14A-B). Por el contrario, las células transducidas con ARSA/GFP.LV fueron principalmente TUNEL negativas. La tinción con Anexina V confirmó la aparición de apoptosis, mostrando una mayor fracción de células apoptóticas entre mHSPC y hHSPC transducidas con GALC, en comparación con los controles (figura 14C).

La sensibilidad a la toxicidad de la expresión de GALC depende de la diferenciación y el linaje celular

Los macrófagos y la microglía representan la progenie efectora de HSPC que reconstituye la actividad enzimática en los tejidos afectados, incluyendo el sistema nervioso, en los enfoques de terapia génica de HSPC para LSD. Se evaluó si una línea celular monocítica prototípica (U937), monocitos humanos primarios, macrófagos murinos primarios y microglía podrían experimentar toxicidad de la expresión de GALT tras la transferencia génica mediada por LV. Además, para diseccionar aún más la especificidad de la apoptosis inducida por GALT a lo largo de la diferenciación hematopoyética, se ensayaron los linfocitos T y B. Para permitir la inmunodetección de GALT y estimar la eficiencia de la transducción, en algunos experimentos se utilizó un transgén marcado en el extremo C-terminal, en el que el gen se fusiona en marco con la secuencia que codifica el péptido HA de la proteína hemaglutinina del virus de influenza humana. La enzima etiquetada con HA tenía una actividad específica comparable con la de la enzima no modificada, y se clasificó adecuadamente en el compartimento lisosómico (datos no mostrados). Después de la transducción, se evaluó en diferentes puntos de tiempo la aparición de apoptosis mediante un ensayo TUNEL y la actividad de GALT. Como se esperaba, todos los tipos de células analizadas mostraron un nivel diferente de actividad de GALT basal (figura 17).

Los macrófagos murinos se obtuvieron como la fracción adherente de la colección de células peritoneales. Los cultivos primarios de microglía se aislaron del cerebro de ratones +/+ y -/- FVB/twi mediante protocolos establecidos (Armstrong RC., 1998; Gritti y col., 1996). Además, se ensayaron tanto los monocitos primarios como la línea celular monocítica U937. Los monocitos humanos se aislaron de PBMC mediante selección positiva para el marcador monocítico CD14. Las condiciones de transducción se establecieron usando GFP.LV y analizando la eficiencia de transducción por citofluorimetría (cuando fue posible) o por microscopía confocal. Una vez optimizado el protocolo de transducción, la microglía y los macrófagos se transdujeron eficientemente con GALT.LV/GALT-HA.LV y vectores de control a MOI 50 y 200, respectivamente, y expresaron GALT por encima de los niveles basales (figura 18). Incluso cuando se lograron altos niveles de expresión (hasta 40 veces a nivel natural), el ensayo TUNEL demostró una apoptosis de baja frecuencia o nula después de la transducción de GALT.LV y la sobreexpresión de GALT en todas las células ensayadas (figura 18). No se observó diferencia entre la microglía +/+ y -/- (figura 18 y otros datos no mostrados). Estos resultados demuestran que las células efectoras de la terapia génica de HSC no son sensibles a la toxicidad de GALT, lo que sugiere que, para desarrollar una estrategia de terapia génica de HSC para GLD, se debe evitar la expresión de GALT en las HSPC, mientras que se debe promover en células mieloides hematopoyéticas diferenciadas, capaces de dirigir la enzima a los tejidos afectados.

Se obtuvieron linfocitos T y B humanos tras la estimulación con PHA y la transformación de EBV de PBMC totales, respectivamente. De manera similar a los experimentos con monocitos y macrófagos, la transducción se optimizó utilizando GFP.LV y citometría de flujo. Los linfocitos B se transdujeron eficazmente con GALT.LV/GALT-HA.LV y vectores de control a MOI 100, mientras que se utilizaron dos eventos a MOI 100 para los linfocitos T. A pesar del aumento sostenido de la actividad de GALT tras la transducción, no se detectó apoptosis en todos los puntos de tiempo examinados (figura 19), lo que respalda aún más la noción de que las células hematopoyéticas diferenciadas no son detectablemente sensibles a la sobreexpresión de GALT.

#### Regulación *in vitro* sobre la expresión de GALT por miRNA126.

Para evaluar el efecto de la expresión de GALT regulada por miRNA126 en HSPC, se transdujeron mHSPC con GALT.miR126T.LV o con GFP.miR126T.LV o GALT.LV a MOI 100. Después del lavado, las células se sembraron para el ensayo CFC o se cultivaron *in vitro* durante dos semanas para ensayo de actividad de GALT y el análisis por Q-PCR. La transducción con GALT.miR126T.LV permitió una reconstitución de la actividad de GALT a niveles suprafisiológicos en la progenie de mHSPC diferenciada, hasta 2 veces sobre los niveles de tipo natural (figura 35B). Es importante destacar que el número de colonias obtenidas de mHSPC transducidas con GALT.miR126T.LV fue similar a los controles y fue casi el doble con respecto a las colonias de GALT.LV (figura 21C), lo que sugiere que la regulación de la expresión de GALT por miRNA126 permitió conservar el potencial clonogénico de las mHSPC transducidas. Estos resultados alentadores llevaron a evaluar si el potencial clonogénico no afectado se debió al rescate de la apoptosis de las mHSPC transducidas con GALT.miR126T.LV. Después de la transducción, las mHSPC se sembraron sobre cubreobjetos recubiertos con matrigel y se realizó el ensayo TUNEL después de 2 y 5 días de cultivo. El nivel de apoptosis se evaluó por microscopía confocal. El ensayo TUNEL en células transducidas con GALT.miR126T.LV mostró una apoptosis menor o nula en ambos puntos de tiempo (1%1 y 3%2 a los 2 y 5 días respectivamente), de manera similar a lo observado en las células transducidas con el LV de control (figura 22A-B). Estos datos demostraron que la supresión de la expresión de GALT por miRNA126 podría rescatar las mHSPC de la apoptosis inducida por GALT.

#### Regulación *in vivo* sobre la expresión de GALT por miRNA126.

El efecto de la expresión de GALT regulada por miRNA126 sobre el potencial de repoblación de las mHSPC se evaluó en ratones +/- FVB/twi. Los ratones irradiados letalmente de 8 días de edad se trasplantaron con mHSPC -/- transducidas con GALT.miR126T.LV o con células transducidas PGK GALT.LV, y se evaluó la supervivencia tanto a corto como a largo plazo. De manera similar a lo observado con CD11b\_GALT.LV, los ratones +/- FVB/twi trasplantados con mHSPC transducidas con GALT.miR126T.LV fueron rescatados de la letalidad y sobrevivieron a largo plazo (más de 3 meses después del HSCT), de manera diferente a los ratones trasplantados con PGK\_GALT.LV

que no sobrevivieron después del acondicionamiento letal. Cuando los ratones se trasplantaron con mHSPC transducidas con GALT.miR126T.LV se sacrificaron a la edad de 80 días y se realizó un análisis Q-PCR en la BM, se encontró un VCN promedio de 5, confirmando así la presencia de células transducidas en la BM a largo plazo después del HCT.

En general, estos resultados, junto con los observados con las células transducidas con CD11b\_GALT.LV, muestran un rescate exitoso de la deficiencia de GALT y protección contra la expresión de GALT *de novo* en HSPC por estas estrategias mejoradas de terapia génica regulada.

La expresión forzada de GALT es tóxica para las HSPC pero no para células hematopoyéticas diferenciadas

Para desarrollar un modelo de terapia génica, se transdujeron HSPC de ratones genéticamente intactos y GLD, que portaban una mutación puntual que daba como resultado <5 % de actividad enzimática residual (*Trs*)<sup>45</sup>, con un vector lentiviral que expresaba GALT o GFP (figura 23A). La transducción con el vector GALT reconstituyó la actividad de GALT en la progenie cultivada de células de GLD, lo que condujo a una sobreexpresión de ~2 veces en comparación con las células de tipo natural transducidas con GFP (figura 23B). Se observaron niveles de expresión similares tras la transducción de HSPC murinas de tipo natural, así como CD34<sup>+</sup> HSPC humanas de CB o BM normales (figura 23B). Inesperadamente, la expresión forzada de GALT perjudicó a la actividad clonogénica de HSPC tanto murinas como humanas en comparación con las células transducidas con GFP (figura 23D y datos no mostrados). El ensayo TUNEL realizado dos días después de la transducción mostró que la mayoría de las HSPC transducidas con GALT pero no con GFP, eran TUNEL positivas y exhibían núcleos agrandados con cromatina condensada (figura 23E y F). Estos hallazgos sugieren que el deterioro clonogénico de las HSPC transducidas con GALT se debió a la inducción de la apoptosis, como también lo confirmó la tinción con Anexina V (no mostrada). El deterioro funcional de las HSPC fue causado directamente por la expresión forzada/de novo de GALT y no por la toxicidad relacionada con la preparación del vector, ya que las HSPC transducidas con un vector lentiviral que codifica GALT regulado por miR-142 mostró actividad clonogénica normal y ausencia de apoptosis. De hecho, la secuencia 142T suprimió la expresión enzimática de GALT en las células hematopoyéticas pero no en las células productoras de LV<sup>33</sup> (figura 23B). La expresión forzada/de novo de GALT también fue tóxica para las células de injerto a largo plazo, ya que las HSPC murinas transducidas con GALT no pudieron rescatar a los ratones *Trs* de la irradiación letal (figura 24A).

Tras el trasplante de HSC, los macrófagos y la microglía son la progenie efectora responsable de reconstituir la actividad de GALT en los tejidos afectados. Para probar si la toxicidad por la expresión forzada/de novo de GALT también afectó a las células diferenciadas, se transdujeron monocitos primarios humanos, linfocitos T y B, así como células de microglía de ratón con vectores GALT o de control (figura 24B). Si bien se logró una transducción eficiente y una sobreexpresión de GALT en todos los tipos de células, el ensayo TUNEL mostró una apoptosis baja o nula en los cultivos (figura 24B y C). Por lo tanto, la sensibilidad a la expresión de GALT es una característica única de las HSPC, que no se observó en células hematopoyéticas maduras.

La regulación de miR-126 rescata las HSPC de la toxicidad de la expresión de GALT y permite la terapia génica de GLD

La toxicidad selectiva de la expresión de GALT *de novo* en las HSPC destaca la necesidad de regular estrictamente la expresión transgénica en las HSPC para una terapia génica exitosa de GLD. Por lo tanto, se ensayó la eficacia de este novedoso sistema regulador basado en miR-126 y se comparó con una estrategia transcripcional basada en el promotor CD11b específico mielóide para dirigir la expresión de GALT a la progenie de HSPC diferenciadas. Ambas estrategias rescataron las HSPC transducidas de la toxicidad inducida por GALT (véase la figura 23B-E). Sin embargo, la actividad de GALT reconstituida fue sustancialmente mayor (hasta 2 veces el nivel de tipo natural) en la progenie de las células transducidas con el lentivector GALT-126T (en el que la expresión de GALT es impulsada por el promotor *PGK*) que en las células transducidas con CD11b-GALT, incluso cuando se compararon cultivos transducidos con respecto a un número de copias de vectores similar (figura 23B y C). También se verificó que el vector lentiviral GALT.126T protegió eficazmente las HSPC humanas de la toxicidad de GALT (figura 23C y D). Dado el probable beneficio de la actividad enzimática suprafisiológica en las células hematopoyéticas maduras, se seleccionó el vector regulado por miARN para estudios *in vivo* de terapia para GLD.

Las HSPC de ratones *Trs* se transdujeron con el vector lentiviral GALT-126T y se trasplantaron a ratones *Trs* recién nacidos. Los ratones trasplantados se injertaron con éxito (figura 24A) y mostraron una supervivencia significativamente más larga no solo con respecto a los ratones *Trs* no tratados ( $p < 0,0001$ ), sino también con respecto a los ratones trasplantados con HSPC transducidas con GFP de tipo natural ( $p = 0,002$ ; figura 24A y D). Además, cuando se estratificaron los ratones tratados con terapia génica según el número de copias de vector medido en la BM, los animales con el mayor contenido de vectores mostraron una supervivencia significativamente más prolongada (figura 6E), lo que sugiere fuertemente que la expresión enzimática suprafisiológica en células hematopoyéticas aumenta la eficacia terapéutica del trasplante de HSC. De hecho, se observó la entrega eficaz de la enzima GALT funcional al cerebro afectado y la reconstitución de la actividad defectuosa en el cerebro de ratones *Trs* tratados con terapia génica (figura 24F-I). En el sistema nervioso central de los ratones tratados, se detectó actividad de GALT tanto dentro de las células hematopoyéticas infiltrantes Iba1<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, como dentro de las células no hematopoyéticas Tha1<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> (figura 24F-I), lo que demuestra la corrección cruzada de las células residentes probablemente debido a



secreción enzimática por la progenie de las HSPC trasplantadas y transducidas. Es importante destacar que la reconstitución de la actividad enzimática y el aumento de la supervivencia se asociaron a un fenotipo significativamente mejorado de los ratones tratados en comparación con los controles afectados no tratados, con capacidades para caminar conservadas y *espasmos* reducidos (temblores intencionales asociados a GLD).

## ANÁLISIS

### Perfiles profundos de la expresión de miARN en el sistema hematopoyético

Los vectores indicadores de miARN utilizados en este trabajo ofrecen la oportunidad de medir la bioactividad de miARN en lugar de depender solo de los niveles de expresión de miARN, proporcionando así una lectura cuantitativa biológicamente significativa de la función de miARN. Brown y col. han propuesto que se debe alcanzar un nivel umbral de expresión de miARN para que se produzca una actividad supresora significativa frente a las dianas de miARN, lo que podría ser el resultado de una maquinaria limitante de ARNi disponible dentro de una célula (Brown y col., 2007). Si los ARN pequeños compiten por complejos efectores de ARNi limitado, puede ser necesario un nivel de expresión suficientemente alto para garantizar la incorporación del miARN en un RISC activo. Por lo tanto, estas especies de miARN, que se expresan en niveles muy bajos, pueden tener poca o ninguna actividad ya que no forman parte de un RISC en funcionamiento. Los estudios de perfiles de miARN a menudo consideran solo diferencias relativas en la expresión de miARN y, por lo tanto, pueden indicar diferencias estadísticamente significativas que, sin embargo, pueden ser irrelevantes para la regulación génica. La combinación de la amplitud del análisis de expresión de miARN en todo el genoma (por ejemplo, mediante micromatrices o secuenciación profunda) con el enfoque de Bd.LV indicadores de miARN añade otra dimensión al estudio de los microARN. Permite validar estrictamente la importancia biológica de la expresión diferencial de miARN y puede usarse para estudiar longitudinalmente la expresión de un miARN seleccionado en múltiples poblaciones celulares, con resolución de células individuales y en células vivas. Se utilizó este enfoque para estudiar la expresión de miARN seleccionados en poblaciones células raras y poco accesibles como las HSC. Estos estudios de vectores indicadores de miARN no solo confirmaron datos sobre los perfiles de expresión de miR-223 y miR-126 descritos en la bibliografía, sino que añadieron información adicional sobre la actividad de estos miARN en subpoblaciones de HSPC altamente puras y su progenie. Se ha descrito previamente que miR-223 se expresa abundantemente en el linaje mielóide de ratones y seres humanos (Chen y col., 2004; Fazi y col., 2005; Rosa y col., 2007). De hecho, estos datos de vectores indicadores encontraron la mayor actividad de miR-223 en los granulocitos. Además, la actividad de miR-223 también se reveló en monocitos y en una jerarquía de HSPC, en particular progenitores comprometidos con el linaje de granulocitos-monocitos. Estos datos sugieren que al menos algunas células hematopoyéticas pluripotentes expresan miR-223, tanto en ratones como en seres humanos. Una posibilidad es que estas células estén preparadas para un destino de granulocítico-monocítico. Estos vectores indicadores bidireccionales permiten fraccionar estas poblaciones de HSPC según la expresión de miR-223 y probar su potencial de diferenciación. Estos estudios pueden proporcionar una nueva forma de identificar prospectivamente los progenitores mieloides que se basan no solo en marcadores de superficie, y posiblemente también investigar las primeras etapas del compromiso del linaje.

La expresión de miR-126 en el sistema hematopoyético estaba mal caracterizada hasta ahora. Un amplio estudio de perfiles de miARN basado en secuenciación profunda la asignó ampliamente a las CD34<sup>+</sup> HSPC. Ahora se muestra que miR-126 es activo en HSPC murinas y humanas, y en particular dentro de los subconjuntos enriquecidos en las HSC más primitivas. Durante las primeras etapas de diferenciación, la actividad de miR-126 disminuye progresivamente. La asociación de miR-126 con HSC humanas se corrobora aún más mediante un análisis de CB HSPC transducidas con BdLV.126T recién aisladas de ratones NOD/SCID realizado por el colaborador en UHN, Toronto (Lechman y col., 2008, ASH Abstract). Estos datos apoyan un patrón de expresión específica de células madre/progenitoras tempranas para miR-126, con silenciamiento en la mayoría de los linajes posteriores.

Curiosamente, un subgrupo de leucemia mielógena aguda (AML) caracterizada por mutaciones en el "factor de unión al núcleo" (CBF) expresa altos niveles de miR-126 121. Los autores identificaron la cinasa tipo polo (PLK-2 como una diana validada de miR-126. PLK-2 se ha reconocido como un regulador del ciclo celular y podría actuar como un gen supresor tumoral en neoplasias hematológicas. Dada la estrecha asociación de miR-126 con las HSC, se está estudiando, en colaboración con el grupo de John Dick en UHN, Toronto, la actividad de miR-126 en las células madre leucémicas (LSC), una subpoblación rara que se encuentra en el vértice de la jerarquía de desarrollo de la AML, que se cree que es responsable de la resistencia a la quimioterapia y la recidiva (Barabe y col., 2007; Kennedy y col., 2007). Los resultados preliminares sugieren que las muestras de AML, en particular las que pertenecen a otros subgrupos que los de CBF-AML, manifiestan un gradiente de expresión de miR-126, siendo el más alto en la fracción CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> enriquecida en LSC y baja en fracciones no injertantes. Este patrón de actividad de miR-126 se mantiene tras el trasplante de LSC en ratones NOD/SCID inmunocomprometidos. Por lo tanto, la actividad de miR-126, visualizada por un Bd.LV indicador lentiviral, podría servir como un nuevo biomarcador y diana potencialmente terapéutica para las células madre leucémicas de AML (Lechman y col., 2008, ASH Abstract).

Fuera del sistema hematopoyético, miR-126 ha sido ampliamente descrito como un regulador positivo de la señalización angiogénica en las células endoteliales. La angiogénesis describe la formación de nuevos vasos sanguíneos a través del crecimiento de vasos preexistentes. Las señales que promueven la angiogénesis incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), que activan

cascadas de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y de fosfoinositida 3-cinasa (PI3K), que regulan la motilidad y la proliferación de células endoteliales y el brote de vasos consiguiente. miR-126 tiene dos dianas validadas involucradas en el proceso angiogénico, la proteína que contiene el dominio EVH1 relacionado con Sprouty (Sprd1) y una subunidad reguladora de PI3K, ambos reguladores negativos de la señalización de VEGF/FGF. Las células endoteliales que carecen de miR-126 no responden a las señales angiogénicas. La desactivación de miR-126 en el pez cebra dio como resultado la pérdida de integridad vascular y hemorragia durante el desarrollo embrionario (Fish y col., 2008), mientras que la eliminación de miR-126 en ratones causa vasos con fugas, hemorragia y letalidad embrionaria parcial, debido a una pérdida de integridad vascular y defectos en la proliferación, migración y angiogénesis de células endoteliales (Wang y col., 2008).

En resumen, miR-126 se expresa a niveles biológicamente relevantes en células endoteliales angiogénicas, así como en células madre hematopoyéticas y su progenie inmediata. Curiosamente, la expresión de miR-126 es otro factor que las células endoteliales y las HSC tienen en común. De hecho, durante el desarrollo embrionario, la aparición simultánea de células endoteliales y hematopoyéticas (glóbulos rojos) en el saco vitelino, y la aparición sucesiva de HSC y células endoteliales en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM) subrayan el origen común de estos 2 linajes, que surgen de una población de células llamadas "hemangioblastos". No es sorprendente que haya una lista creciente de genes, originalmente pensados para expresarse exclusivamente en el endotelio vascular, que han aparecido en las HSC y factores de transcripción y receptores de membrana tal como el receptor Tie2, Sca-1, VEGFR-(Flt-1), VEGFR-(Flk-1) y CD31.

Dada la asociación funcional y anatómica entre la microvasculatura y las HSC a través del desarrollo y en la médula ósea adulta, miR-126 puede contribuir a la homeostasis del nicho hematopoyético y regular la proliferación de sus componentes tanto endoteliales como de HSC.

#### Interferencia del LV regulado por miARN con la función de miARN

Una preocupación acerca de aprovechar la regulación de miARN es la posibilidad de interferir con la regulación de las dianas de miARN naturales mediante la sobreexpresión de transcritos que contienen secuencias diana de miARN. Para comprender la biología y la seguridad del LV regulado por microARN, se cuantificó el requisito de dosis para saturar la actividad de un miARN (Gentner y col., 2009). Al medir la pérdida de regulación de los indicadores sensibles y una diana de miARN natural tras exponer las células a dosis crecientes de transcritos que contienen secuencias diana de miARN, se encuentra que el umbral para interferir con la regulación fisiológica de miARN es generalmente alto y solo se puede alcanzar cuando se impulsa la expresión desde fuertes promotores virales. Las secuencias diana de miARN expresadas a partir de un promotor moderado como el promotor de fosfoglicerato cinasa (PGK) no saturaron la actividad de miARN, incluso con un alto número de copias de vector (hasta 50 integraciones). Esto sugirió que la regulación de miARN podría aprovecharse de manera segura para la terapia génica de HSC cuando se expresa el transcrito regulado de miARN de un promotor moderado y de un número limitado de integraciones por célula. Sin embargo, se encontró que los vectores lentivirales pueden genomanipularse para interferir deliberadamente con la actividad de miARN y, por lo tanto, usarse como una herramienta para caracterizar la función de miARN.

Cuando se sobreexpresaron secuencias diana de miARN de promotores fuertes, se demostró que la actividad de miARN podría estar saturada, dando como resultado la pérdida de la regulación de las dianas naturales para ese miARN 126. Además, se encontró que la saturación podría favorecerse cambiando el diseño de estas secuencias diana. Para estos vectores regulados por genes, tal como el que se describe en esta tesis, se aprovecharon sitios de unión a miARN perfectamente complementarios que dan como resultado principalmente la degradación del transcrito de ARNm (véase la figura 2c), similar al modo de acción del ARNsi (Brown y col. al., 2007). Como este proceso está ocurriendo con una cinética rápida (Haley y col., 2004), el complejo miARN-RISC en realidad funciona como una enzima con una alta tasa de recambio, lo que hace que sea inherentemente difícil que se sature. Por otro lado, cuando se introduce un desajuste entre los nucleótidos 9 y 11 del miARN en la secuencia diana de miARN, la degradación del transcrito se ve afectada 57, redirigiendo el complejo miRISC/mARN a la ruta de "represión traduccional" que también se utiliza principalmente por los miARN naturales en células animales. Dado que la represión traslacional probablemente tiene lugar a un ritmo más lento que la degradación, se demostró que las dianas imperfectas resultaron más eficientes en el bloqueo competitivo de la actividad de miARN con respecto a las dianas perfectamente complementarias (Gentner y col., 2009). Es importante destacar que la tecnología basada en vectores lentivirales permite una integración estable de dichos casetes de expresión diseñados para la desactivación de miARN en el genoma, que representa así una plataforma, que permite una interferencia estable con la actividad de miARN. Se aprovechó con éxito esta tecnología para obtener una desactivación estable de miR-223. El trasplante de ratones con células de BM transducidas con un vector de desactivación miR-223 a un número elevado de copias de vector dio como resultado una expansión de las células mieloides, lo que sugiere que miR-223 actúa sobre los precursores de granulocitos-monocitos como un regulador negativo de la mielopoyesis. Además, se encontró una patología inflamatoria pulmonar en ratones que se reconstituyeron con BM que contenía el vector de desactivación miR-223, lo que sugiere funciones adicionales de miR-223 en la regulación de las células mieloides inflamatorias (Gentner y col., 2009). Sorprendentemente, estos ratones fenocopiaron una línea de ratón desactivado miR-223 recientemente descrita (Johnnidis y col., 2008). Además de las desactivaciones genéticas, los estudios de pérdida de función de miARN se limitaban hasta ahora a la transfección transitoria de moléculas antisentido de miARN químicamente modificadas llamadas "antagomirs" (Kruzfeldt y col., 2005). Si bien es eficaz, su uso se limita a las células, que pueden transfectarse fácilmente, lo que



no es el caso para la mayoría de las células primarias. Además, la desactivación es transitoria y, por lo tanto, no es fácilmente aplicable a los sistemas de modelos genéticos. Se prevén amplias aplicaciones para LV que median la desactivación estable de miARN. Constituirán herramientas importantes para investigar el papel fisiológico del miARN.

## 5 Aplicaciones de vectores regulados por microARN para terapia génica de células madre hematopoyéticas

El patrón de expresión del gen indicador que se describe en este trabajo también tiene implicaciones relevantes para la terapia génica. La mayoría de las construcciones clínicas de terapia génica contienen promotores de expresión ubicua que garantizan una expresión fuerte del transgén en los tipos de células objetivo, pero también dan como resultado una expresión inespecífica. Esta expresión ectópica puede provocar toxicidad, contraselección de células modificadas por genes, desencadenamiento de una respuesta inmunitaria dirigida contra el producto transgénico, o incluso transformación oncogénica (Weil y col., 1997; Ott y col., 2006; Brown y col., 2006; Brown y col., 2007; Woods y col., 2006).

Añadir secuencias diana miR-223 a un transgén terapéutico entregado a las HSC evitaría la expresión en la progenie mielóide, incluyendo los progenitores de granulocitos-monocitos y al menos una subfracción de las HSC. Es importante destacar que esta estrategia daría como resultado una expresión terapéutica completa en el linaje linfóide y de glóbulos rojos.

La identificación de miR-126, que se expresa fuertemente en las HSPC pero no en la progenie diferenciada del linaje mielóide y linfóide, permite impedir la expresión de un transgén potencialmente tóxico en poblaciones de células madre sensibles, mientras se mantiene la expresión y la eficacia terapéutica en la progenie enferma.

## Toxicidad de la expresión de GALC *de novo*

Aplicaciones de reemplazo enzimático y de terapia génica en pacientes con LSD (Rohrbach y col., 2007; Brady y col., 2004) y modelos animales (Biffi y col., 2006; Sano y col., 2005; Hofling y col., 2004; Sands y col., 1997) han demostrado generalmente la falta de toxicidad de la administración de enzimas lisosómicas y la expresión por encima de los niveles normales. En el caso de la leucodistrofia metacromática (MLD), se demostró la seguridad de la sobreexpresión mediada por LV de ARSA, que cataliza la etapa aguas arriba de GALC en el metabolismo de sulfatida en mHSPC, hHSPC y ratones transgénicos (Biffi y col., 2004; Capontondo y col., 2007), lo que promovió pruebas clínicas de la terapia génica de HSPC para esta enfermedad. Aquí, se informa del hallazgo inesperado de toxicidad manifiesta y deterioro funcional *in vitro* e *in vivo* de las HSPC murinas y humanas después de la transferencia y expresión génica de GALC mediadas por LV. Las HSPC murinas transducidas con GALC.LV mostraron un potencial clonogénico deteriorado y no lograron injertar y repoblar a largo plazo a los receptores de trasplante mieloablado. Esto se asoció a la selección negativa y a la apoptosis de HSPC altamente transducidas. La falta de apoptosis y el deterioro funcional observado en HSPC murinas y humanas, transducidas con un vector de control en el que la expresión de GALC está regulada por el microARN (Mechtcheriakova y col., 2007) (expresado exclusivamente en células de linaje hematopoyético) (Brown y col., 2006), confirmó el papel único de la GALC expresada en la determinación de la muerte de las células transducidas.

## Las células diferenciadas son menos sensibles a la toxicidad relacionada con GALC

Cabe apreciar que las células diferenciadas del linaje hematopoyético (linfocitos, monocitos, macrófagos y microglía) y las células de otros linajes (oligodendrocitos, así como progenitores neurales) (Gritti y col., comunicación personal), no se ven afectadas por la sobreexpresión de GALC mediada por LV. Por lo tanto, las HSPC parecen tener una sensibilidad única al control de la supervivencia celular mediado por GALC y esfingolípidos, que aparentemente se pierde durante la diferenciación en células mieloides, linfocitos T y B maduros, y que se limita al linaje hematopoyético. Una posible explicación para esto podría ser la muy baja actividad basal de GALC detectada en HSPC, en comparación con otros tipos de células, tales como la microglía u oligodendrocitos. Además, el papel del metabolismo de los esfingolípidos y las consecuencias de una alteración en el contenido de Cer y moléculas derivadas tales como So y SIP, pueden variar según los tipos de células y las etapas de diferenciación. Por ejemplo, el efecto de la acumulación intracelular de Cer en los oligodendrocitos se estudió en profundidad, con resultados contradictorios. Un estudio reciente informó que la inducción de la esfingomielinasa ácida, que es responsable de la producción de Cer a partir de la degradación de la esfingomielina, dio como resultado la acumulación de Cer y la inducción de apoptosis (Chudakova y col., 2008). La misma vía parece estar involucrada en la muerte de las células oligodendrocíticas inducida por el estrés oxidativo o por la acumulación de péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer (Jana y col., 2007; Lee y col., 2004). Sin embargo, los oligodendrocitos maduros también se describieron como resistentes a algunos estímulos proapoptóticos, lo que induce la acumulación de Cer. De manera similar, se observó una respuesta diferencial a la estimulación de TNF proapoptótica en precursores oligodendrocíticos, donde se observó un alto nivel de apoptosis y en oligodendrocitos maduros, que parecían ser resistentes a la estimulación apoptótica (Scurlock y col., 1999). Los oligodendrocitos maduros también son resistentes a la apoptosis inducida por la administración de IL-1 (Brogi y col., 1997). Esto sugiere que el aumento de Cer intracelular podría manejarse de diferentes maneras, según las vías activadas en ese tipo de célula particular y en esa etapa particular de diferenciación. Apoyando esta hipótesis, se ha informado que el aumento de Cer intracelular en el tejido neural, se maneja por la alta actividad de la ceramidasa ácida (Huang y col., 2004). Esta enzima cataliza la degradación de Cer a So, que, a su vez, se fosforila en SIP. S1 P

rescata células de la apoptosis inducida por Cer (Betito y col., 2006) e induce la proliferación en células progenitoras neurales (Harada y col., 2004). Se ha planteado la hipótesis de que un mecanismo similar fue responsable de la sensibilidad reducida de los oligodendrocitos a la apoptosis relacionada con la sobreexpresión de GALC. La vía metabólica de los esfingolípidos también es muy activa en los oligodendrocitos, que participan en la mielinización para producir los glucosfosfolípidos de mielina (GalCer y Sulfatida). Además, estas moléculas participan en interacciones carbohidrato-carbohidrato, formando glicosinasas (para una revisión véase (Boggs y col., 2008).

La sensibilidad reducida a la apoptosis inducida por expresión de GALC *de novo* observada en monocitos y macrófagos podría explicarse tanto por la actividad de la ceramidasa como por su acción secretora. Los informes muestran que, en las células endoteliales y las células del sistema inmunitario, Cer se convierte rápidamente en So y SIP, que se secretan. En el plasma, estas moléculas se unen a la albúmina y actúan como señales para receptores específicos en los linfocitos (para una revisión véase 78 142 143 Hannun y col., 2008; Mechtcheriakova y col., 2007; Rivera y col., 2008).

#### Regulación postranscripcional de la expresión de GALC para una terapia génica de GLD segura y eficaz

La regulación de la expresión transgénica es de gran interés en el campo de la terapia génica. En particular, la posibilidad de regulación postranscripcional por micro ARN (miARN), recientemente ha abierto nuevas perspectivas para ajustar el nivel de expresión del transgén, según el tipo de célula y la diferenciación (Gentner y col., 2008). En este estudio, se aplicó esta tecnología innovadora para suprimir la expresión de GALC en las HSPC, que se ha demostrado que son las células más sensibles a la toxicidad de sobreexpresión de GALC, al tiempo que se permite la sobreexpresión enzimática en células diferenciadas, que son responsables de la secreción de GALC y la corrección cruzada de oligodendrocitos. En particular, se seleccionaron el microRNA126, que se informó que se expresaba más altamente en las HSPC, en comparación con las células mononucleares de sangre periférica 145. Estos datos demostraron que la regulación de la expresión de GALC por el miRNA126 específico de HSC protege a las HSPC de la apoptosis inducida por GALC *de novo in vitro*, y la transducción de GALC -/- HSPC con GALC.miR126T.LV permitió la reconstitución de la actividad enzimática en su progenie diferenciada a niveles suprafisiológicos, sin afectar al potencial clonogénico de los progenitores multipotentes, según lo evaluado por el ensayo CFC. Estos datos confirmaron que miRNA126 suprime la expresión de GALC solo en HSPC y no en su progenie diferenciada. El potencial clonogénico no afectado puede indicar que la expresión de GALC se reprime no solo en HSC, sino también en progenitores multipotentes responsables de la formación de colonias hematopoyéticas en el ensayo CFC.

Además, el trasplante de HSPC transducidas con GALC.miR126T.LV en ratones GALC +/- FVB/twi, dio como resultado la supervivencia a largo plazo de los animales tratados. Estos datos demuestran que la supresión de la actividad de GALC en el HSC más primitivas por miRNA126, permite preservar su potencial de repoblación y diferenciación a largo plazo. La presencia de células altamente transducidas en la BM diez semanas después del HSCT, confirmó adicionalmente que las HSC a largo plazo fueron rescatadas de la apoptosis de sobreexpresión de GALC.

Es importante destacar que la regulación postranscripcional por miARN específico de HSC, permitió el uso de un promotor fuerte, tal como PGK, alcanzando así el mismo nivel de expresión del transgén en la progenie de HSPC diferenciadas, como el obtenido con el PGK\_GALC.LV no regulado. Como se ha analizado anteriormente, no se conoce el nivel de expresión de GALC requerido para que la terapia génica de HSC sea eficaz. Sin embargo, incluso si un nivel bajo de expresión enzimática puede ser suficiente para obtener un beneficio clínico, el uso de un promotor más fuerte puede permitir que se reduzca el número de copias de vector, pero alcanzar la expresión enzimática deseada. Este problema podría ser relevante para la seguridad de la traducción clínica de la terapia génica de HSC.

#### CONCLUSIONES

La plataforma de vectores lentivirales representa una herramienta versátil y muy útil para estudiar la función de microARN. Los vectores indicadores de miARN bidireccionales desarrollados permiten medir la actividad de miARN a nivel de las células individuales en mezclas de células complejas, añadiendo una nueva dimensión a los enfoques de perfiles de expresión de miARN convencionales. Con este enfoque, se disecciona la expresión de varios miARN en poblaciones de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) con una resolución sin precedentes. El cambio del diseño del promotor y la diana de miARN puede dar como resultado vectores lentivirales capaces de lograr una desactivación estable de miARN, útil para generar fenotipos de pérdida de función como base para elaborar el papel fisiológico de un miARN. El análisis proteómico después de la desactivación estable de miARN permitirá la identificación de dianas clave para ese miARN que se modulan en el entorno natural.

Además de abordar estas preguntas básicas de biología, los vectores regulados por miARN tienen un potencial terapéutico significativo. Añadidas a la 3'UTR de un transgén terapéutico, las secuencias diana de miARN pueden reducir la expresión transgénica ectópica y así aliviar o evitar la toxicidad del transgén. En particular, la biología de las células madre hematopoyéticas (HSC) no debe verse afectada por el tratamiento de terapia génica, ya que las HSC representan el aval de la corrección de la enfermedad a largo plazo mediante el suministro continuo de células hijas modificadas genéticamente. Los miARN caracterizados aquí, miR-126, miR-130a y miR-223 restringen la expresión transgénica no deseada en HSPC, mientras las permiten en la progenie diferenciada, y se desarrollarán adicionalmente en protocolos clínicos de terapia génica.

Bibliografia

- 5 Abonour R, Williams DA, Einhorn L, et al. Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term rep opulating hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2000;6:652-658.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* 2000;404:1 93-197.
- 10 Amendola, M., Venneri, M.A., Biffi, A., Vigna, E. & Naldini, L. Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. *Nature biotechnology* 23, 108-116 (2005).
- Armstrong RC. Isolation and characterization of immature oligodendrocyte lineage cells. *Methods* 1998;16:282-292.
- 15 Barabe F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science.* 2007;316:600-604.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116:281-297.
- 20 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136:21 5-233.
- Betito S, Cuvillier O. Regulation by sphingosine 1-phosphate of Bax and Bad activities during apoptosis in a MEK-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340:1273-1277.
- 25 Biffi A, Capotondo A, Fasano S, et al. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J Clin Invest.* 2006;1 16:3070-3082.
- Biffi A, De Palma M, Quattrini A, et al. Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J Clin Invest.* 2004;113:1118-1129.
- 30 Biffi A, De Palma M, Quattrini A, et al. Correction of Metachromatic Leukodystrophy in the Mouse Model by Transplantation of Genetically Modified Hematopoietic Stem Cells. *J Clin Invest.* 2004;113:1118-1129.
- 35 Boggs JM, Gao W, Hirahara Y. Myelin glycosphingolipids, galactosylceramide and sulfatide, participate in carbohydrate-carbohydrate interactions between apposed membranes and may form glycosynapses between oligodendrocyte and/or myelin membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1 78 0:445-455.
- Brady RO, Schiffmann R. Enzyme-replacement therapy for metabolic storage disorders. *Lancet Neurol.* 2004;3:752-756.
- 40 Brady RO. Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Annu Rev Med.* 2006;57:283-296.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005;3:e85.
- 45 Brogi A, Strazza M, Melli M, Costantino-Ceccarini E. Induction of intracellular ceramide by interleukin-1 beta in oligodendrocytes. *J Cell Biochem.* 1 997;66:532-541.
- Brown BD, Cantore A, Annoni A, et al. A microRNA -regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemo-philia B mice. *Blood.* 2007;110:4144-4152.
- 50 Brown BD, Gentner B, Cantore A, et al. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol.* 200 7;25:1 457-1467.
- 55 Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi L, Naldini L. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med.* 2006;12:585-591.
- Capotondo A, Cesani M, Pepe S, et al. Safety of Arylsulfatase A Overexpression for Gene Therapy of Metachromatic Leukodystrophy. *Hum Gene Ther.* 200 7;[Epub ahead of print] PMID: 17845130.
- 60 Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 2004;303:83-86.
- Chudakova DA, Zeidan YH, Wheeler BW, et al. Integrin-associated Lyn kinase promotes cell survival by suppressing acid sphingomyelinase activity. *J Biol Chem.* 2008;283:28806-28816.
- 65

- Divakaran V, Mann DL. The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res.* 2008;103:1072-1083.
- 5 Fazi F, Rosa A, Fatica A, et al. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NF1-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell.* 2005;123:819-831.
- Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell.* 2008;15:272-284.
- 10 Gaziev J, Lucarelli G. Stem cell transplantation and gene therapy for hemoglobinopathies. *Curr Hematol Rep.* 2005;4:126-131.
- Gentner B, Schira G, Giustacchini A, et al. Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nat Methods.* 2009;6:63-66.
- 15 Gentner B, Schira G, Giustacchini A, et al. Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nat Methods.* 2008.
- Gritti A, Parati EA, Cova L, et al. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci.* 1996;16:1091-1100.
- 20 Haley B, Zamore PD. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2004; 11:599-606.
- Harada J, Foley M, Moskowitz MA, Waechter C. Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *J Neurochem.* 2004;88:1026-1039.
- 25 He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network-another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:819-822.
- Hofling AA, Devine S, Vogler C, Sands MS. Human CD34+ hematopoietic progenitor cell-directed lentiviral-mediated gene therapy in a xenotransplantation model of lysosomal storage disease. *Mol Ther.* 2004;9:856-865.
- 30 Huang Y, Tanimukai H, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Elevation of the level and activity of acid ceramidase in Alzheimer's disease brain. *Eur J Neurosci.* 2004;20:3489-3497.
- 35 Jana A, Pahan K. Oxidative stress kills human primary oligodendrocytes via neutral sphingomyelinase: implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007;2:184-193.
- Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature.* 2008;451:1125-1129.
- 40 Kennedy JA, Barabe F, Poepl AG, Wang JC, Dick JE. Comment on "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells". *Science.* 2007;318:1722; author reply 1722.
- 45 Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121:1109-1121.
- Kitsera N, Khobta A, Epe B. Destabilized green fluorescent protein detects rapid removal of transcription blocks after genotoxic exposure. *Biotechniques.* 2007;43:222-227.
- 50 Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.* 2005;438:685-689.
- Krutzfeldt J, Stoffel M. MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab.* 2006;4:9-12.
- 55 Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res.* 2007;101:59-68.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA.* 2003;9:175-179.
- 60 Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell.* 2007;129:1401-1414.
- 65 Lee JT, Xu J, Lee JM, et al. Amyloid-beta peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *J Cell Biol.* 2004;164:123-131.



Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843-854.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303:95-98.

Mechtcheriakova D, Wlachs A, Sobanov J, et al. Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2 is induced during inflammatory responses. *Cell Signal*. 2007;19:748-760.

Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009;10:155-159.

Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996;272:263-267.

Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of *MDS1*, *PRDM16* or *SETBP1*. *Nat Med*. 2006;12:401-409.

Ott MG, Seger R, Stein S, Siler U, Hoelzer D, Grez M. Advances in the treatment of Chronic Granulomatous Disease by gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2007;7:155-161.

Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*. 2005;11:1753-1761.

Pronk CJ, Rossi DJ, Mansson R, et al. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell*. 2007;1:428-442.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403:901-906.

Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:753-763.

Rohrbach M, Clarke JT. Treatment of lysosomal storage disorders : progress with enzyme replacement therapy. *Drugs*. 2007;67:2697-2716.

Rohrbach M, Clarke JT. Treatment of lysosomal storage disorders : progress with enzyme replacement therapy.

*Drugs*. 2007;67:2697-2716.

Rosa A, Ballarino M, Sorrentino A, et al. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:19849-19854.

Sadelain M, Lisowski L, Samakoglu S, Rivella S, May C, Riviere I. Progress toward the genetic treatment of the beta-thalassemias. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1054:78-91.

Sadelain M. Recent advances in globin gene transfer for the treatment of beta-thalassemia and sickle cell anemia. *Curr Opin Hematol* 2006;13:142-148.

Sands MS, Vogler C, Torrey A, et al. Murine mucopolysaccharidosis type VII: long term therapeutic effects of enzyme replacement and enzyme replacement followed by bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 1997;99:1596-1605.

Sano R, Tessitore A, Ingrassia A, d'Azzo A. Chemokine-induced recruitment of genetically modified bone marrow cells into the CNS of GM1-gangliosidosis mice corrects neuronal pathology. *Blood*. 2005;106:2259-2268.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115:199-208.

Scurlock B, Dawson G. Differential responses of oligodendrocytes to tumor necrosis factor and other pro-apoptotic agents: role of ceramide in apoptosis. *J Neurosci Res*. 1999;55:514-522.

Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single lineage-committed CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> progenitor cells. *Blood*. 1991;77:1218-1227.

Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*. 2005;19:517-529.

- Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008;15:261-271.
- 5 Weil WM, Linton GF, Whiting-Theobald N, et al. Genetic correction of p67phox deficient chronic granulomatous disease using peripheral blood progenitor cells as a target for retrovirus mediated gene transfer. *Blood*. 1997;89:1754-1761.
- 10 Woods NB, Bottero V, Schmidt M, von Kalle C, Verma IM. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature*. 2006;440:1123.
- Wu YP, Matsuda J, Kubota A, Suzuki K, Suzuki K. Infiltration of hematogenous lineage cells into the demyelinating central nervous system of twitcher mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59:628-639.
- 15 Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*. 2009;136:26-36.
- Yeager AM, Brennan S, Tiffany C, Moser HW, Santos GW. Prolonged survival and remyelination after hematopoietic cell transplantation in the twitcher mouse. *Science*. 1984;225:1052-1054.
- 20 Yeager AM, Shinn C, Shinohara M, Pardoll DM. Hematopoietic cell transplantation in the twitcher mouse. The effects of pretransplant conditioning with graded doses of busulfan. *Transplantation*. 1993;56:185-190.
- Yesilipek MA. Stem cell transplantation in hemoglobinopathies. *Hemoglobin*. 2007;31:251-256.
- 25 Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17:3011-3016.

## REIVINDICACIONES

1. Un vector génico para su uso en terapia génica que comprende al menos una secuencia diana de miARN correspondiente a mir-130a o mir-126 unida operativamente a un transgén que codifica interferón alfa, la enzima lisosómica galactocerebrosidasa o gp91 phox, en el que el vector génico se usa para impedir o reducir la expresión del transgén en una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.
2. El vector génico para su uso según la reivindicación 1, que comprende al menos una secuencia diana de miARN correspondiente a mir-130a y al menos una secuencia diana de miARN correspondiente a mir-126.
3. El vector génico para su uso según la reivindicación 2, en el que el número de copias de la secuencia diana de miARN correspondiente a mir-130a es dos veces el número de copias de la secuencia diana de miARN correspondiente a mir-126.
4. El vector génico para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el vector es un vector viral.
5. El vector génico para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el vector se puede derivar de un lentivirus.
6. El vector génico para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el vector comprende un promotor específico de tejido.
7. El vector génico para su uso según la reivindicación 6, en el que el promotor específico de tejido es un promotor CD11b, c-Fes, CYBB o TEK.
8. El vector génico para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el transgén codifica interferón alfa.
9. Una composición farmacéutica para su uso en terapia génica que comprende el vector génico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la composición farmacéutica se usa para impedir o reducir la expresión del transgén en una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.
10. Una célula aislada para su uso en terapia génica, en la que la célula está infectada o se transduce con el vector génico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y en la que la célula es una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.
11. El vector génico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, la composición farmacéutica como se define en la reivindicación 9, o la célula como se define en la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de leucodistrofia de células globoideas, enfermedad granulomatosa crónica, inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y tumores sólidos.
12. El vector génico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, la composición farmacéutica como se define en la reivindicación 9, o la célula como se define en la reivindicación 10, para su uso en el aumento de las posibilidades de supervivencia de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética en relación con la terapia génica.
13. Uso del vector génico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o la composición farmacéutica como se define en la reivindicación 9, para la fabricación de un medicamento para terapia génica, en el que el vector génico se usa para impedir o reducir la expresión del transgén en una célula madre hematopoyética o una célula progenitora hematopoyética.
14. Uso de la célula aislada como se define en la reivindicación 10 para la fabricación de un medicamento para terapia génica.

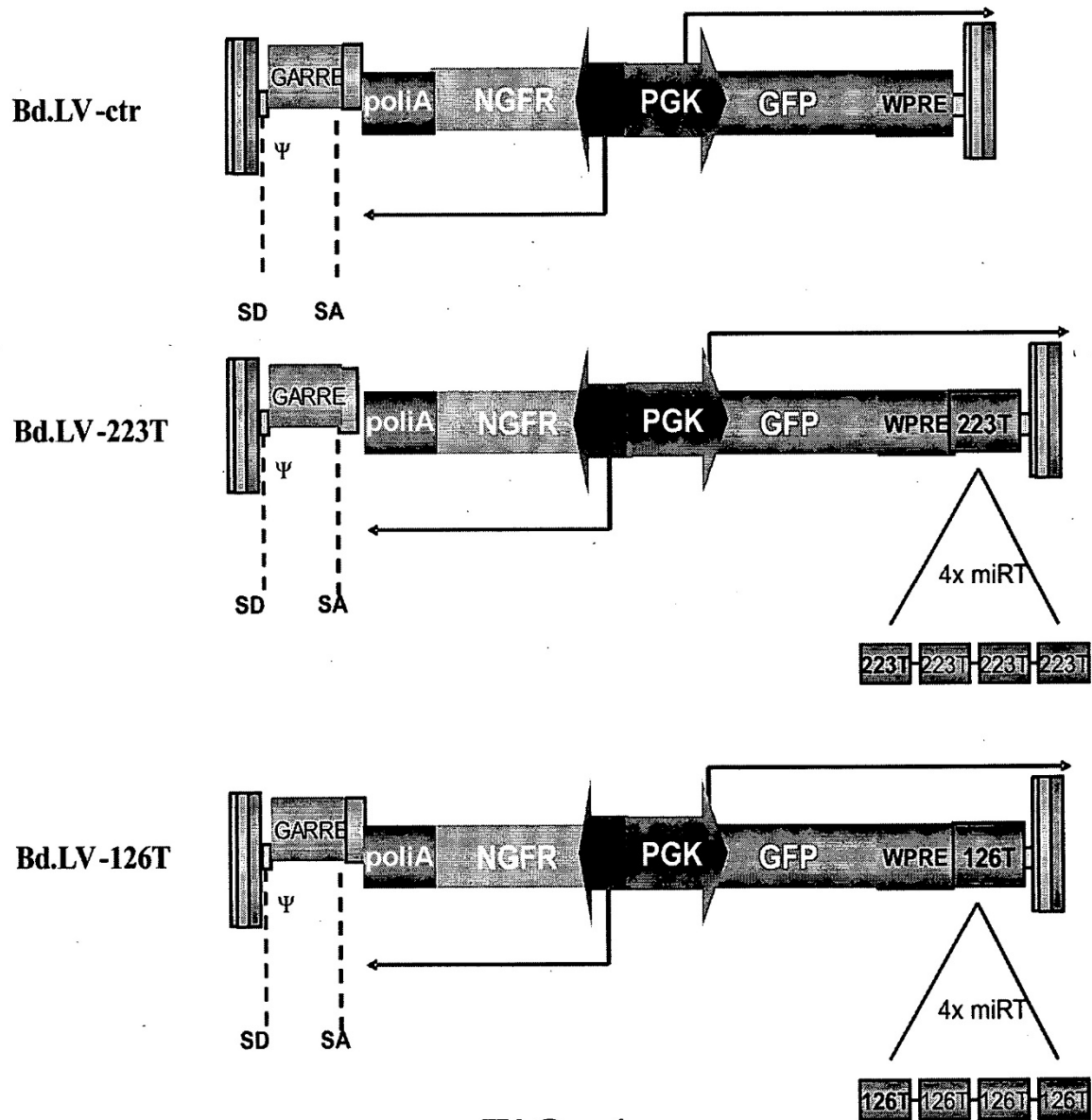
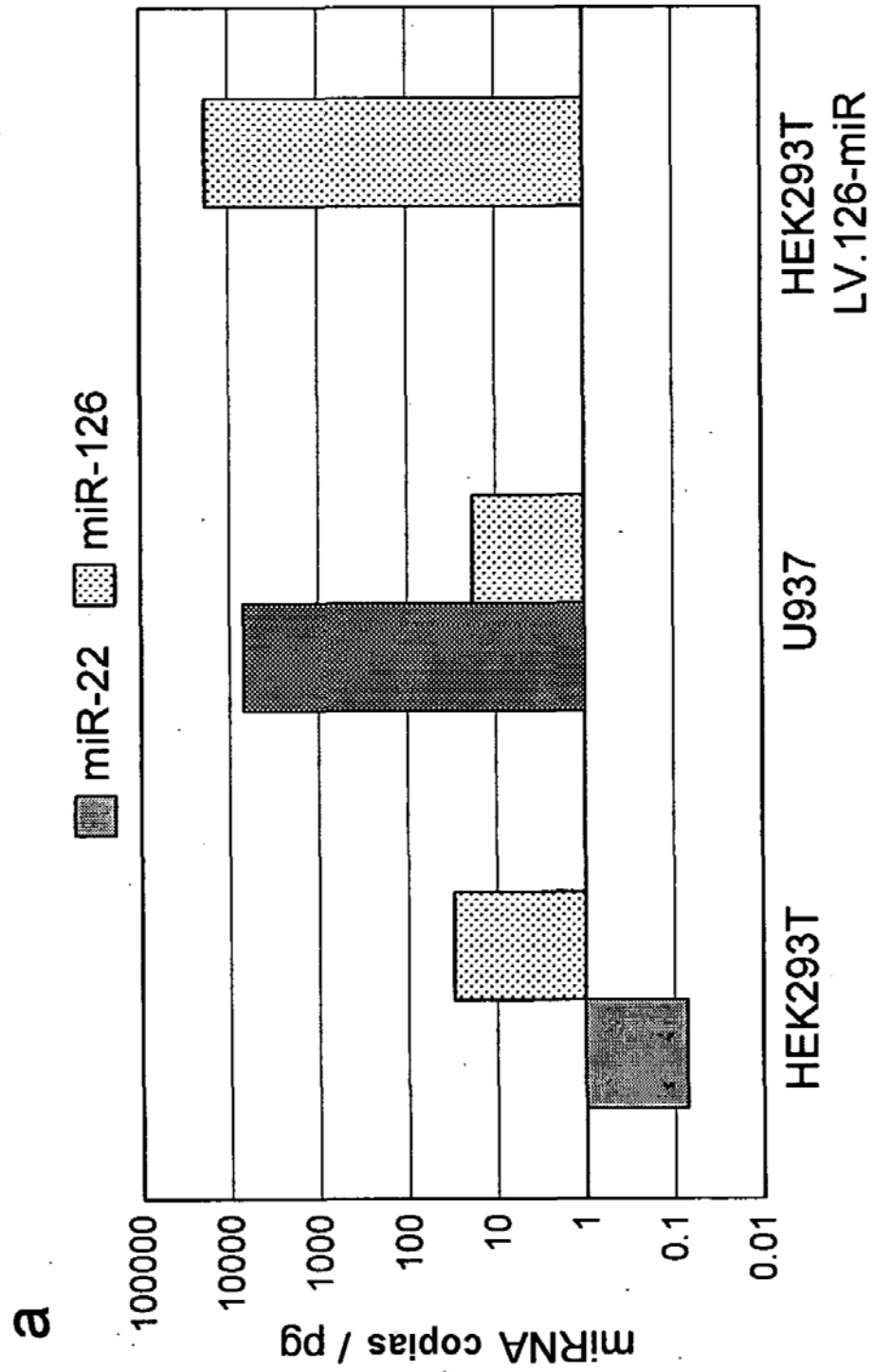
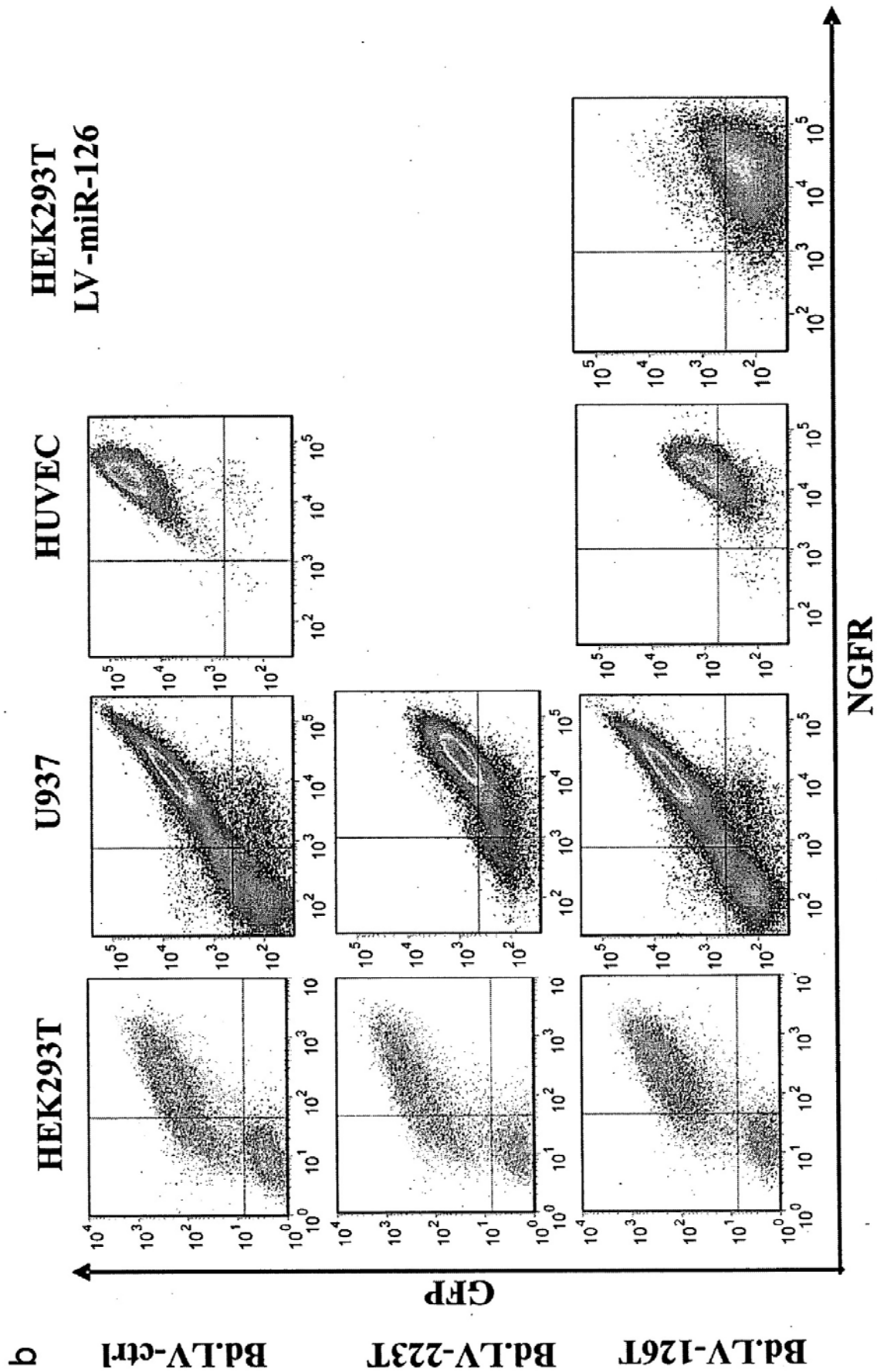


FIG. 1





**FIG. 2**



**FIG. 2 (continuación)**

○

## RNA Represión múltiplo

$$\Delta\text{CT} = \text{GFP mRNA} - \text{NGFR mRNA}$$
$$\Delta\Delta\text{CT} = \text{miRT } \Delta\text{CT} - \text{ctr } \Delta\text{CT}$$
$$\mathbf{FR} = 2^{\Delta\Delta\text{CT}}$$

## Proteína Represión múltiplo

NGFR MFI

GFP MFI

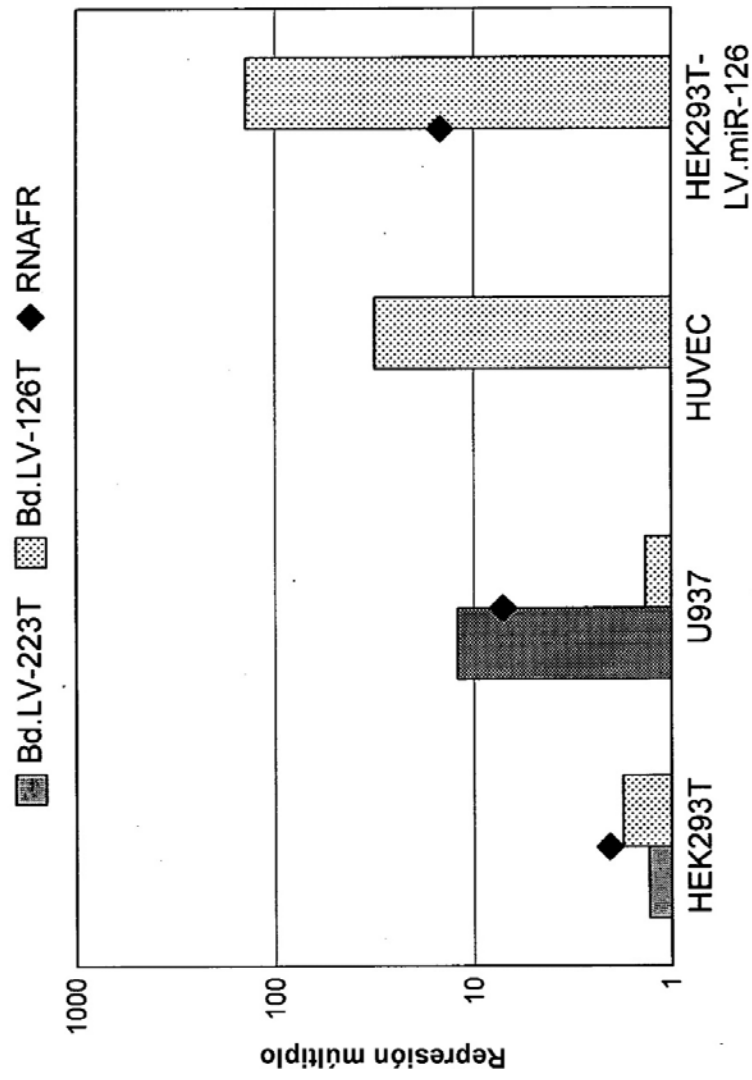
GFP MFI

TGR Bd.LV-miRT

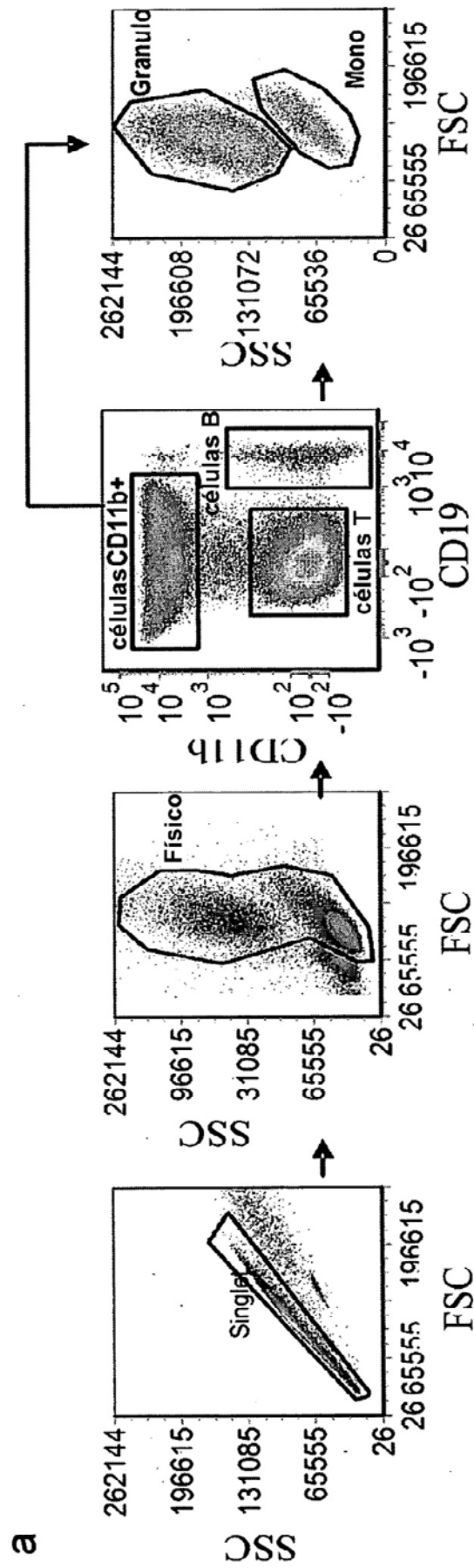
TGR Bd.LV-ctr

FR=

४

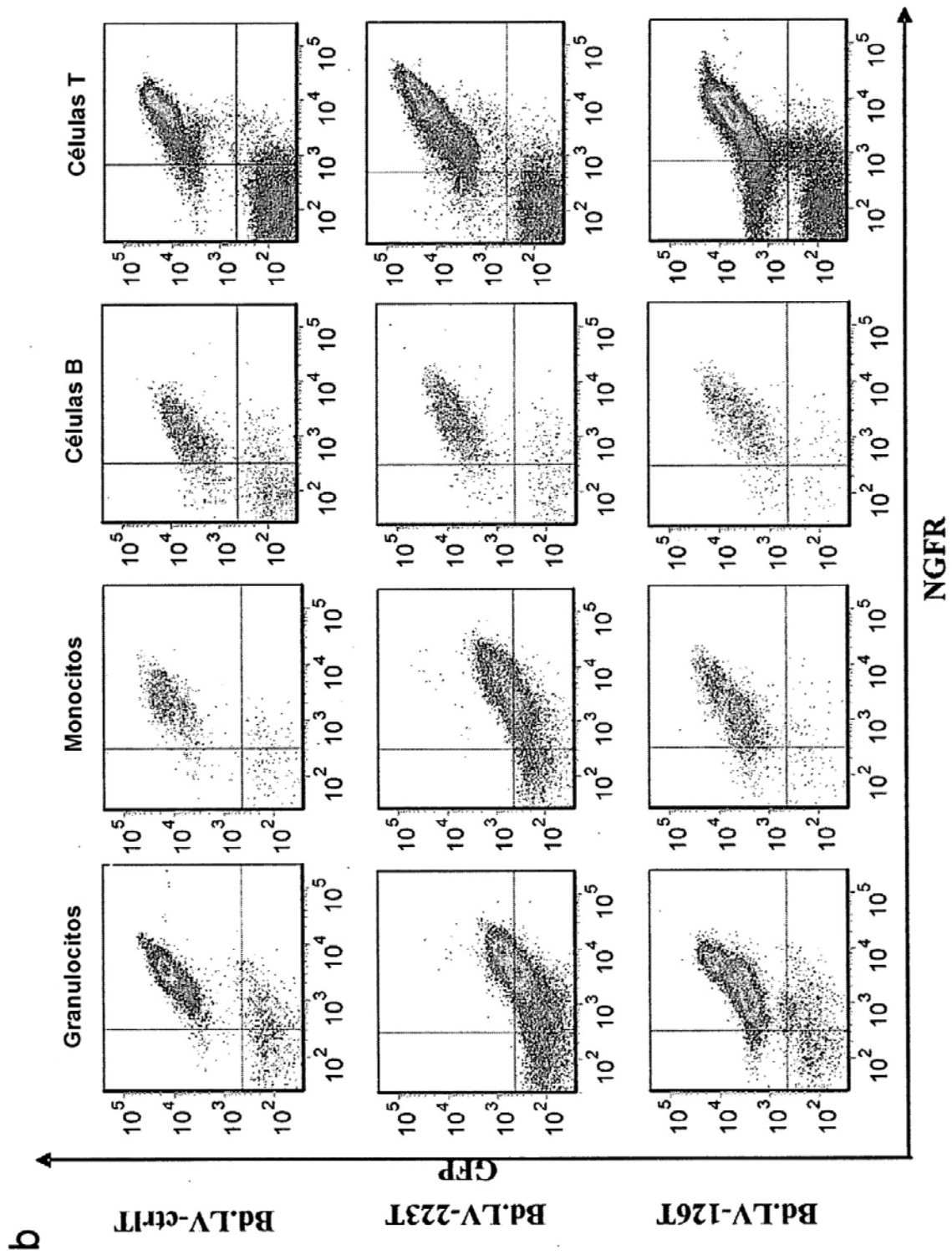


**FIG. 2** (continuación)

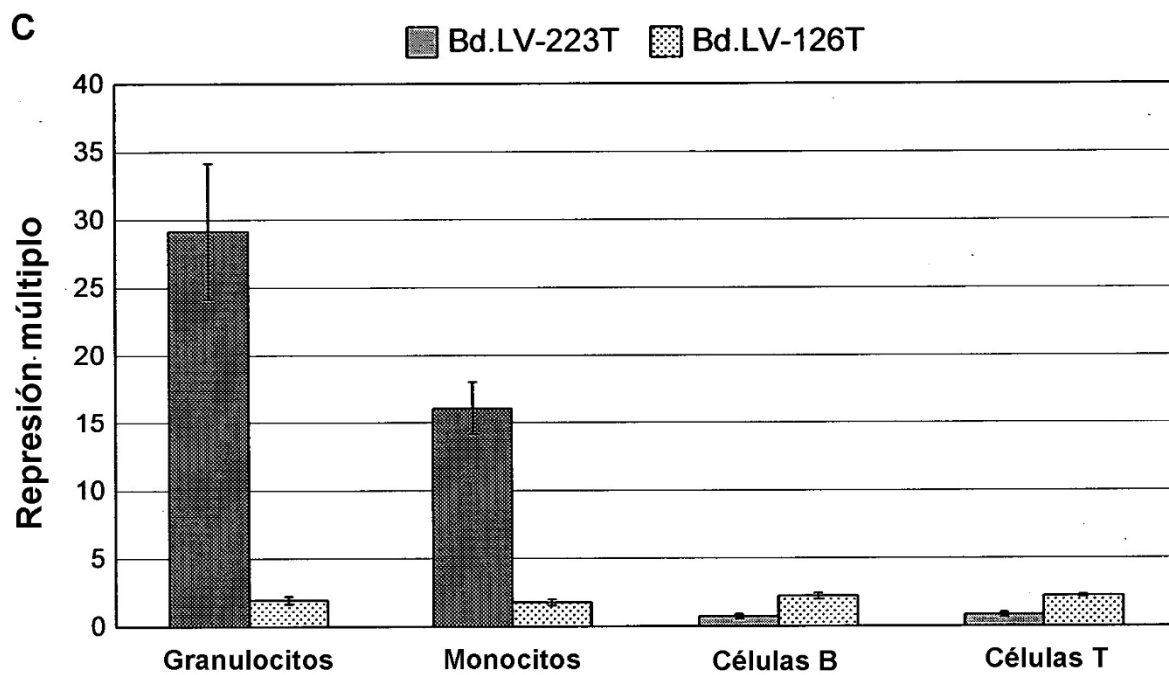


**FIG. 3**

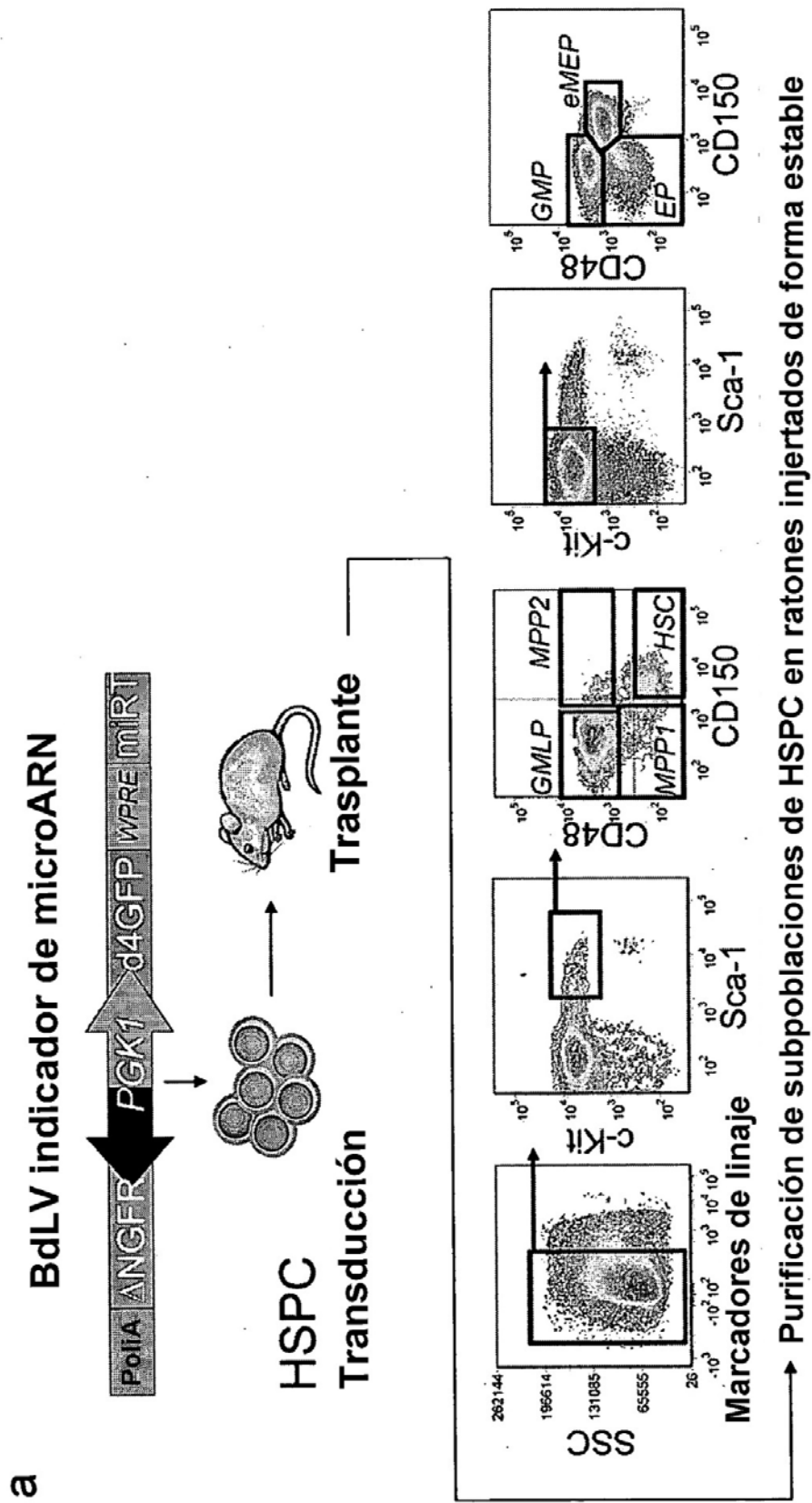




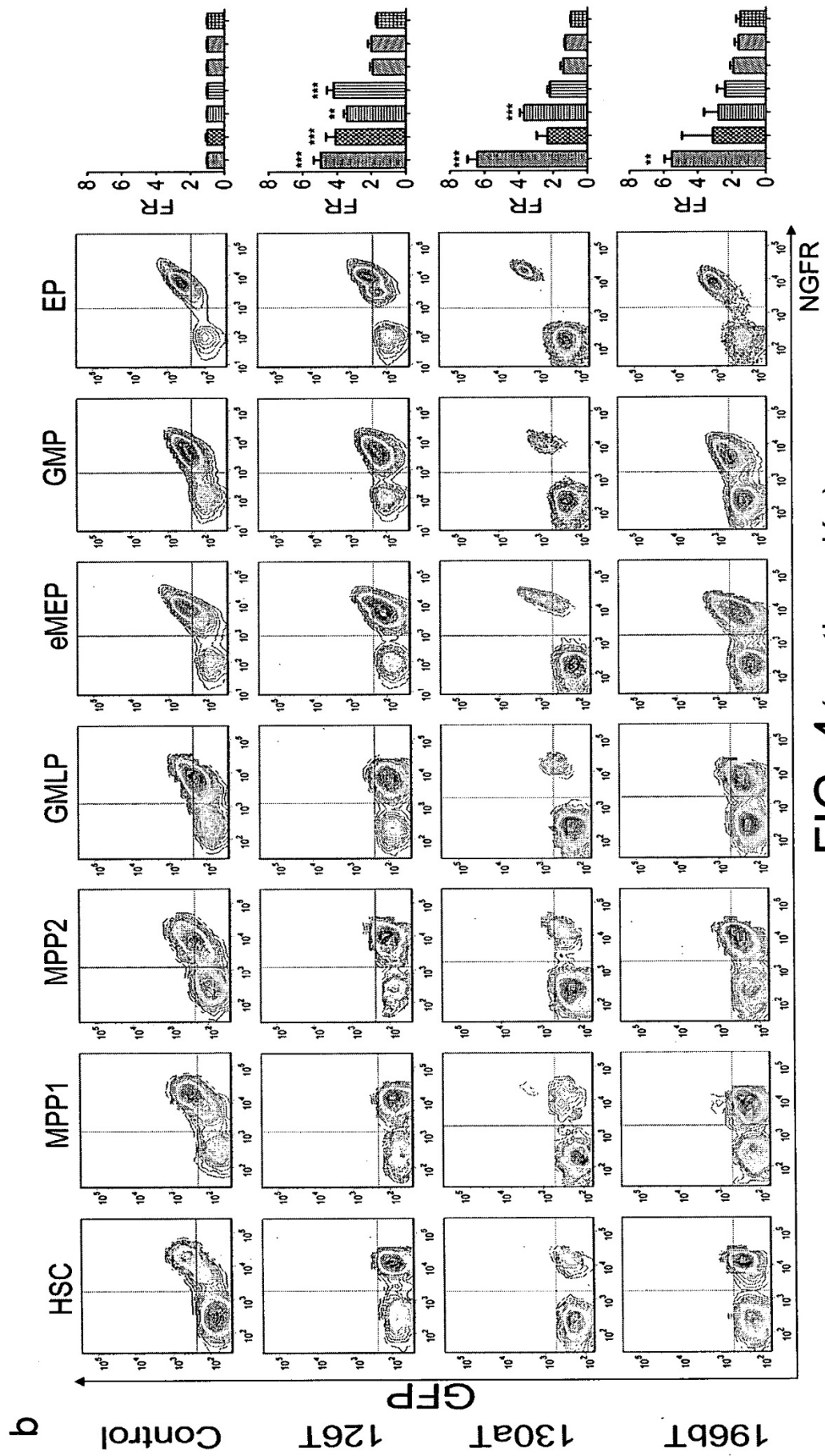
**FIG. 3** (continuación)



**FIG. 3** (continuación)



**FIG. 4**



**FIG. 4 (continuación)**



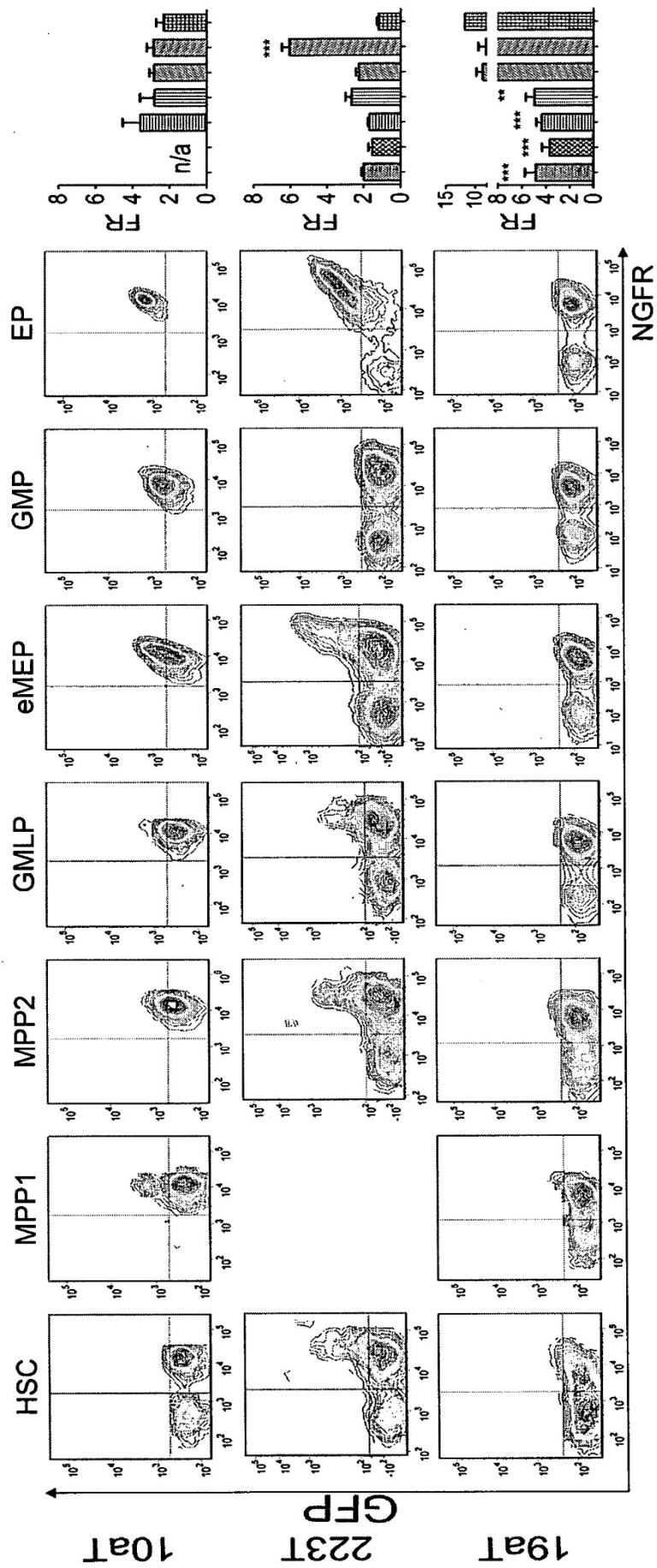


FIG. 4 (continuación)

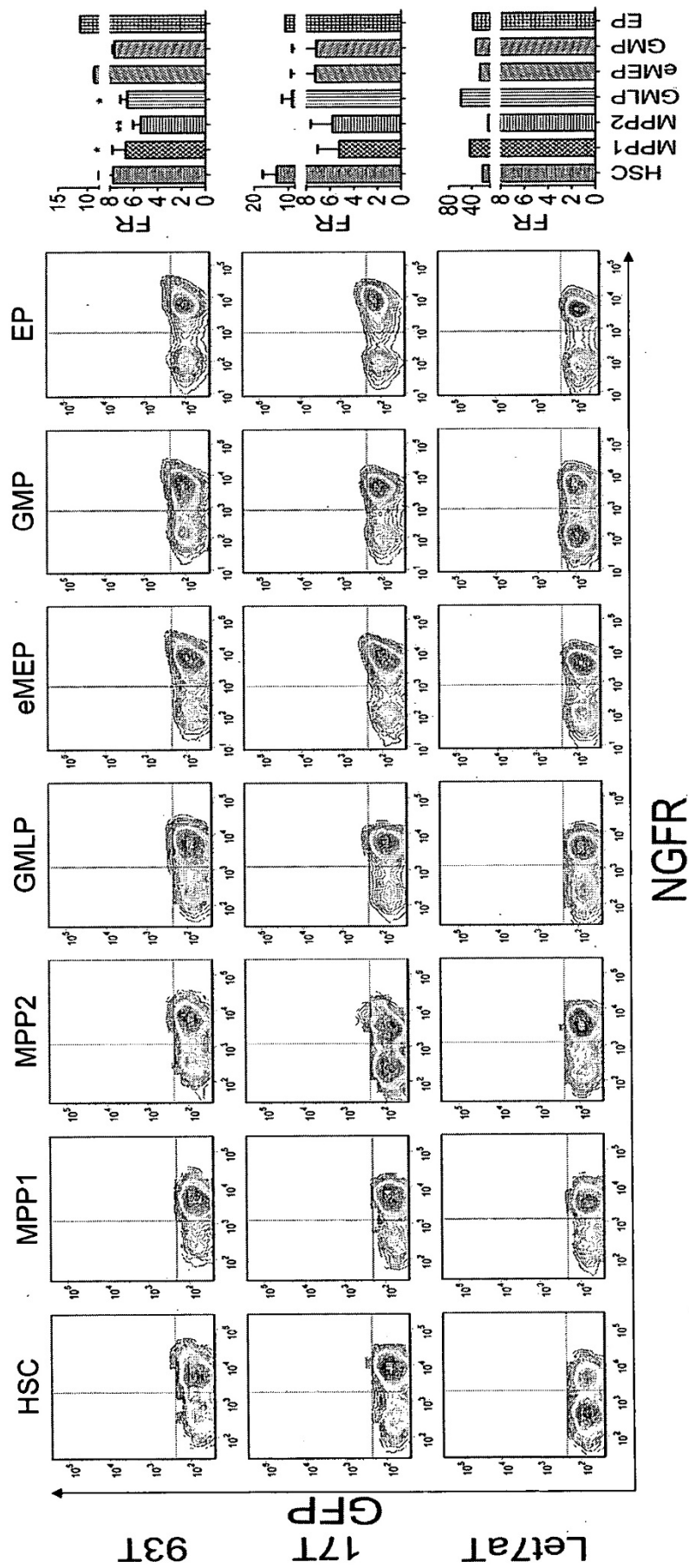
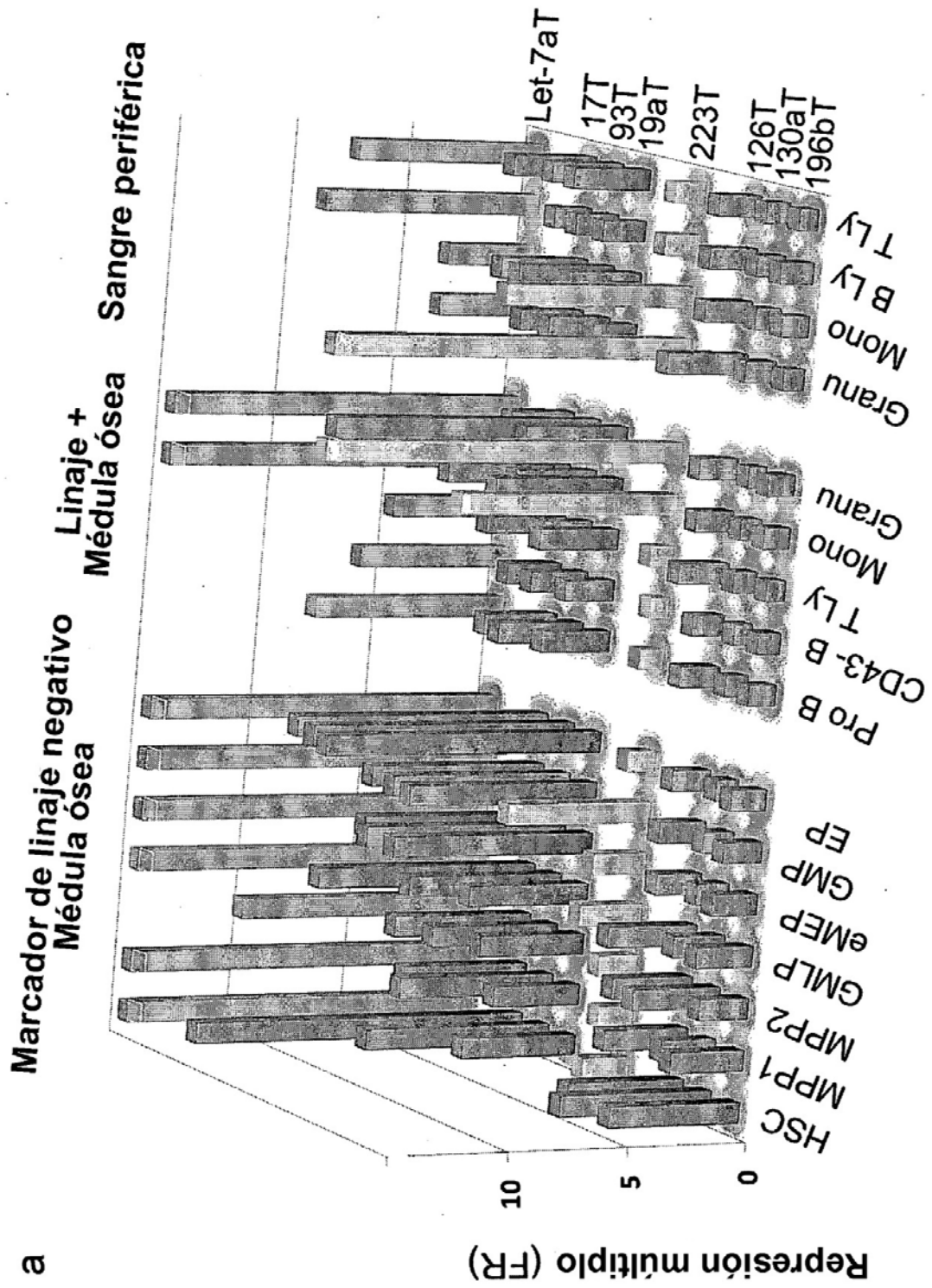
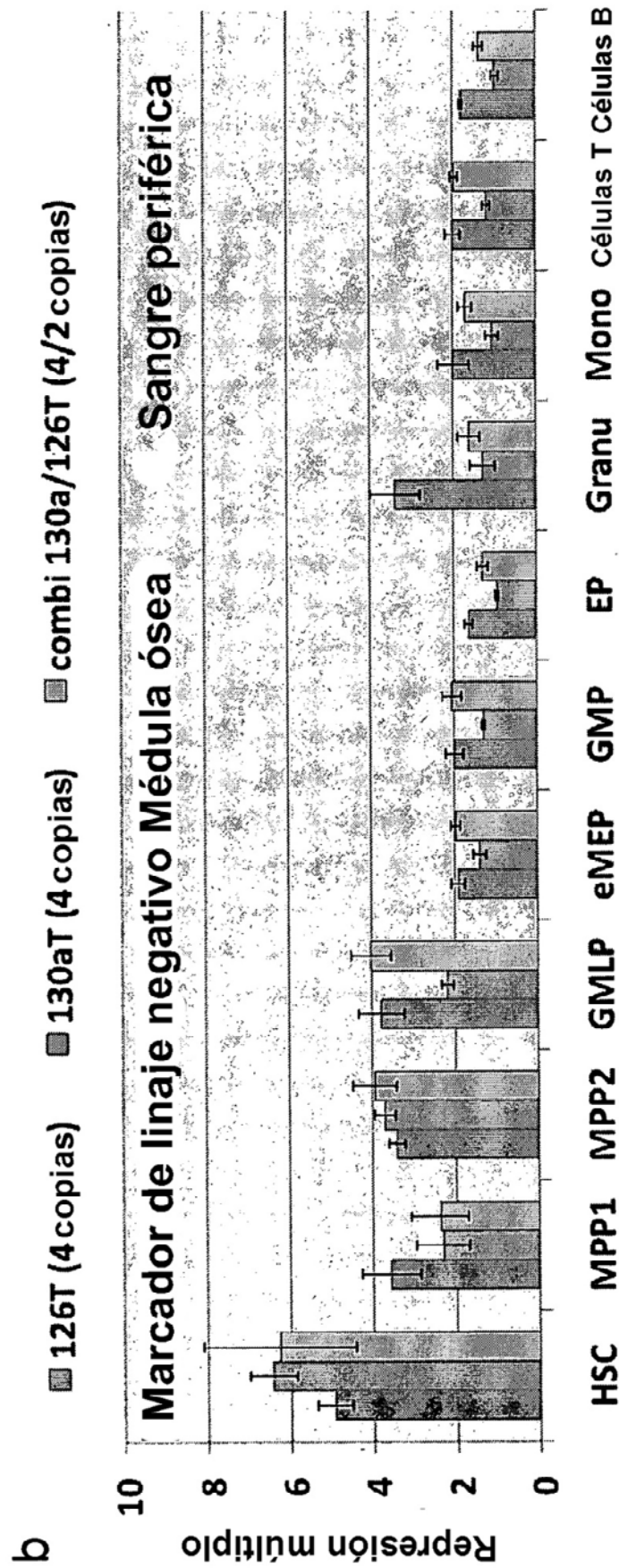


FIG. 4 (continuación)



**FIG. 5**



**FIG. 5** (continuación)

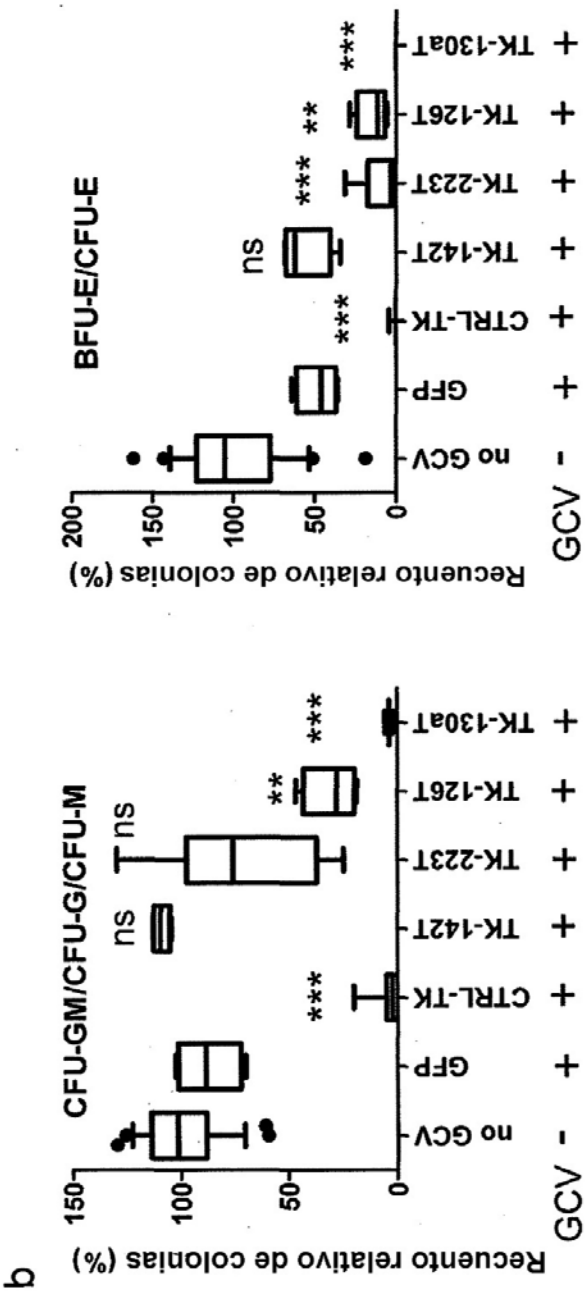
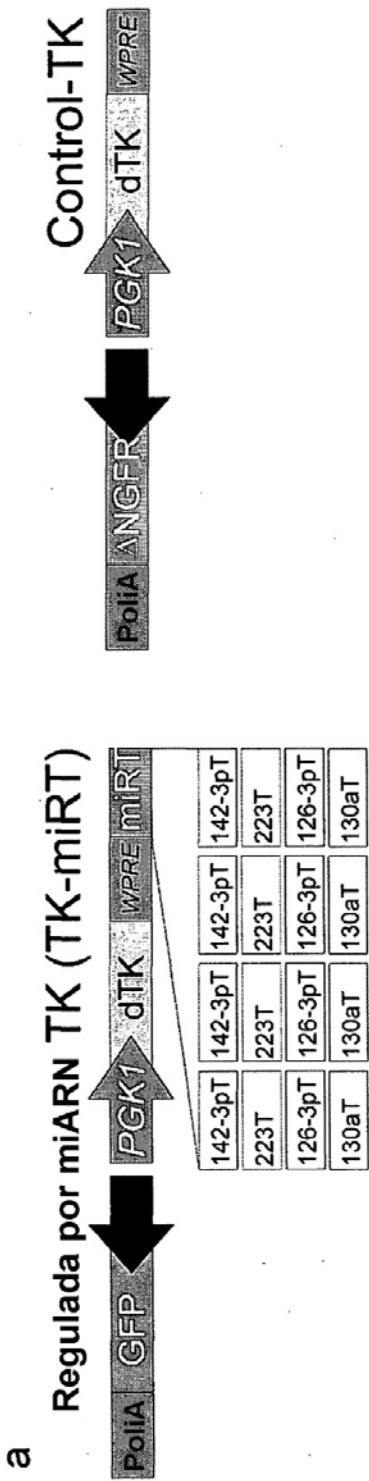


FIG. 6



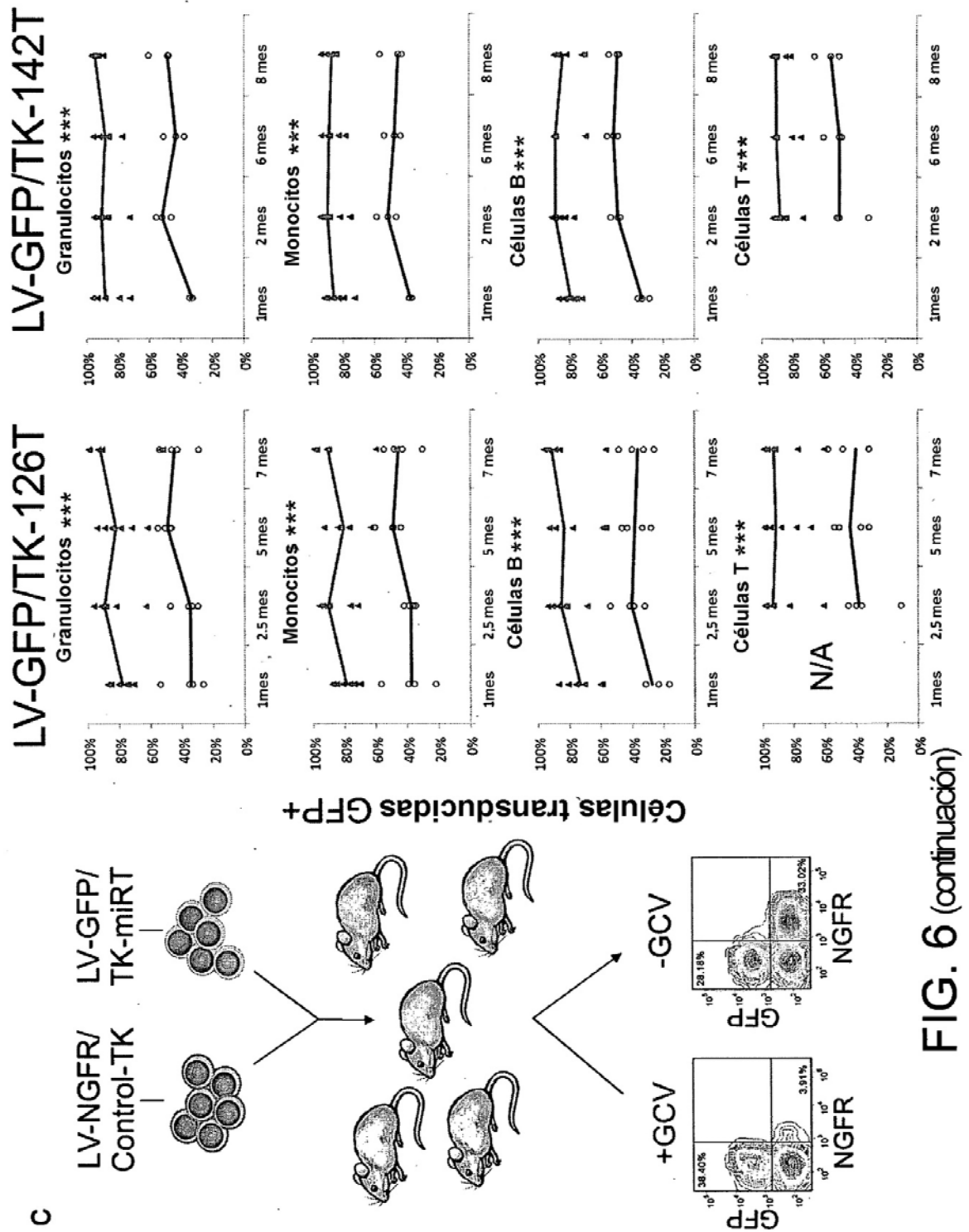
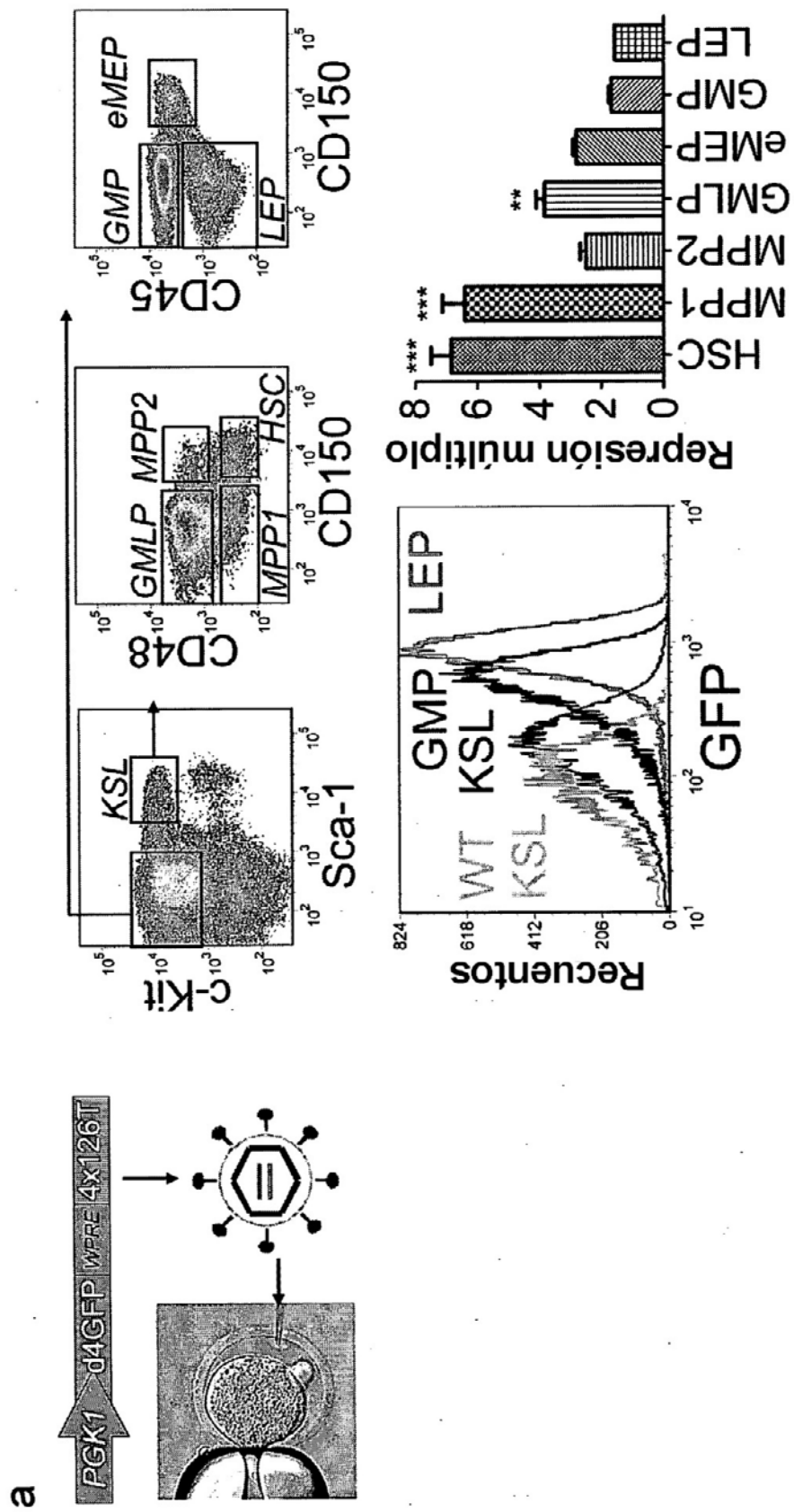


FIG. 6 (continuación)



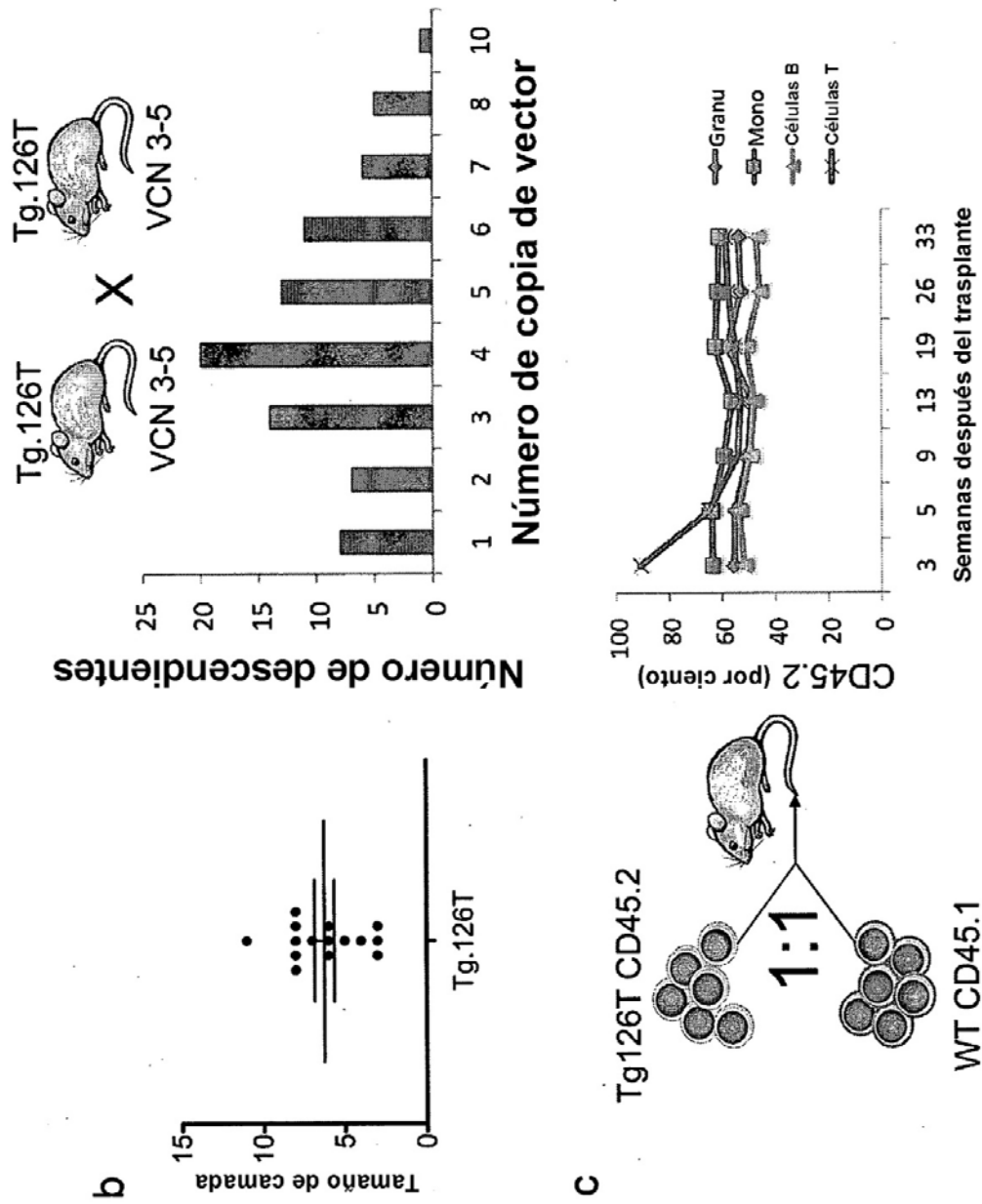


FIG. 7 (continuation)

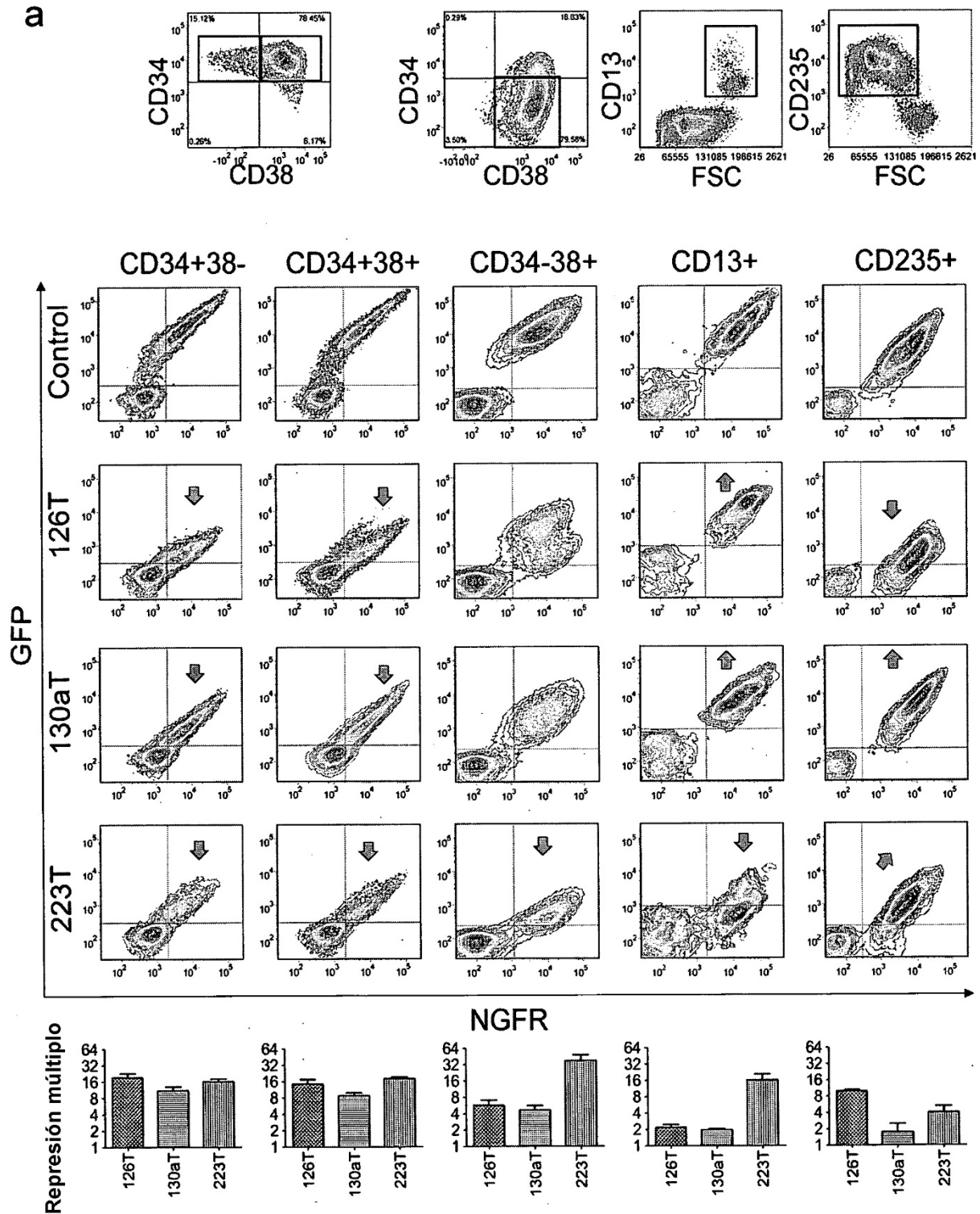


FIG. 8

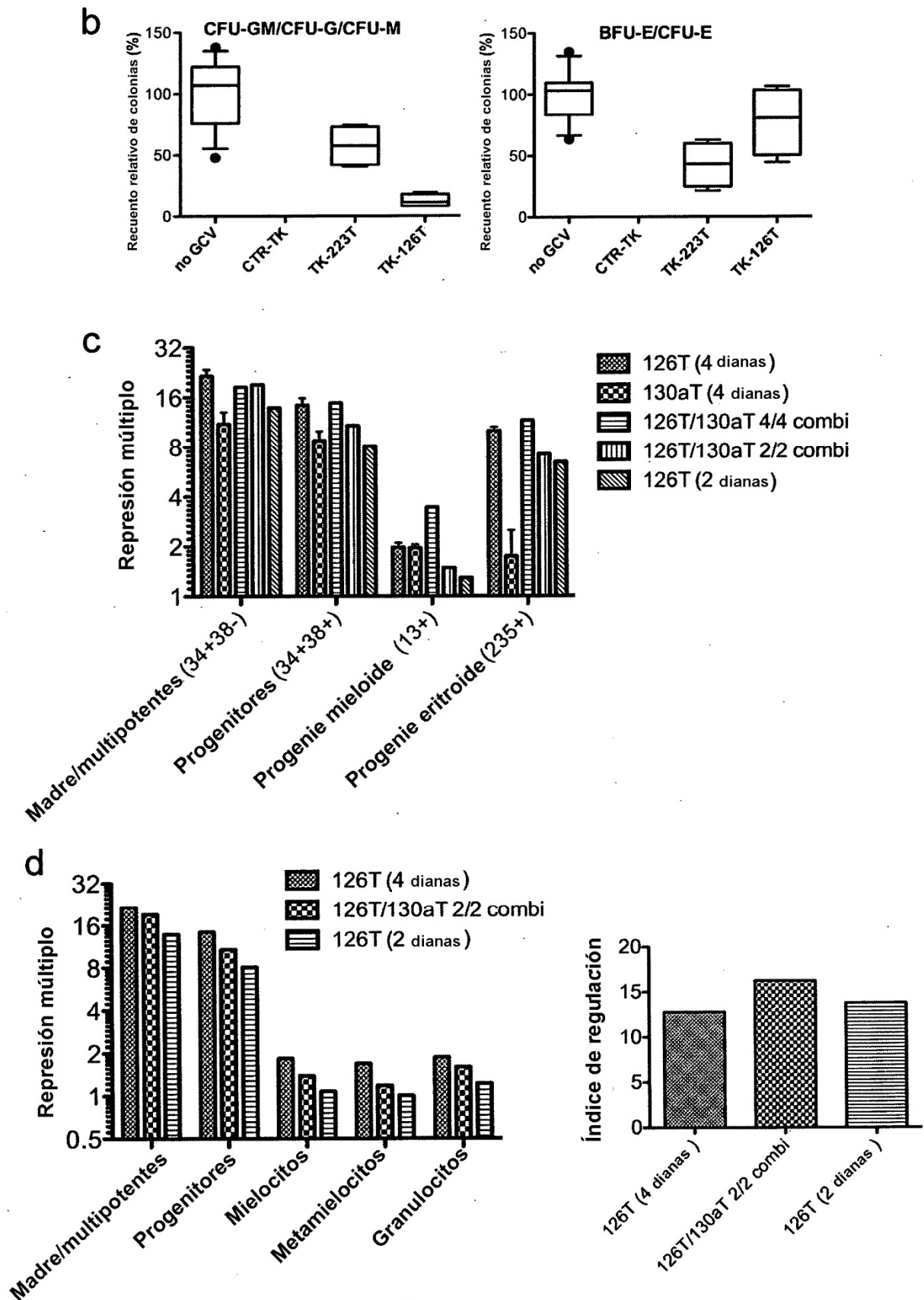
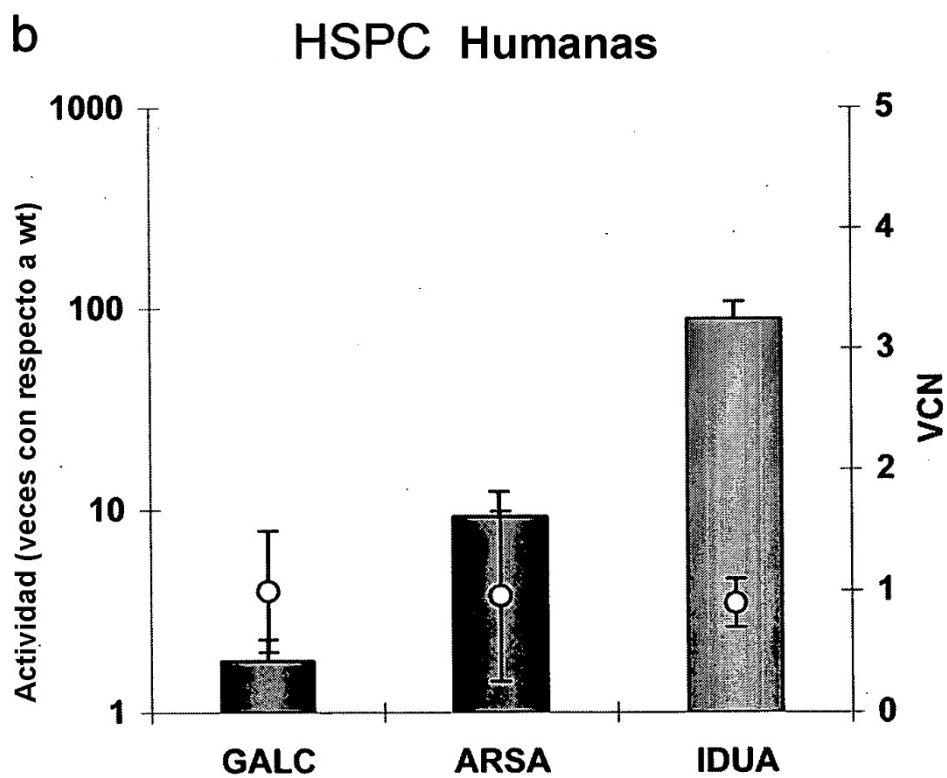
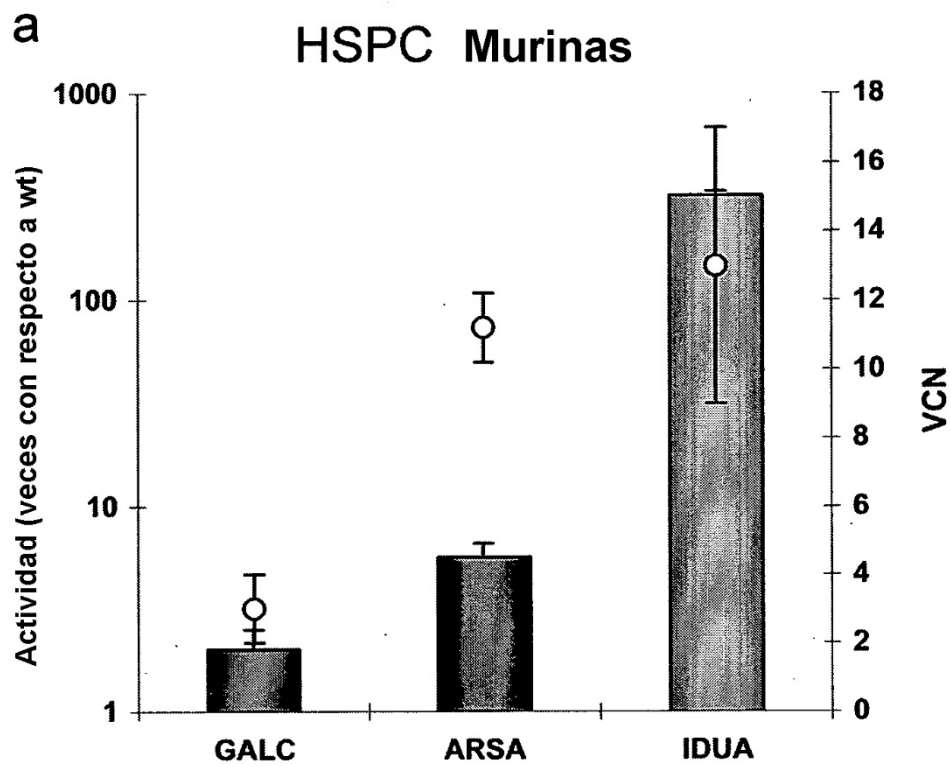


FIG. 8 (continuación)





**FIG. 9**

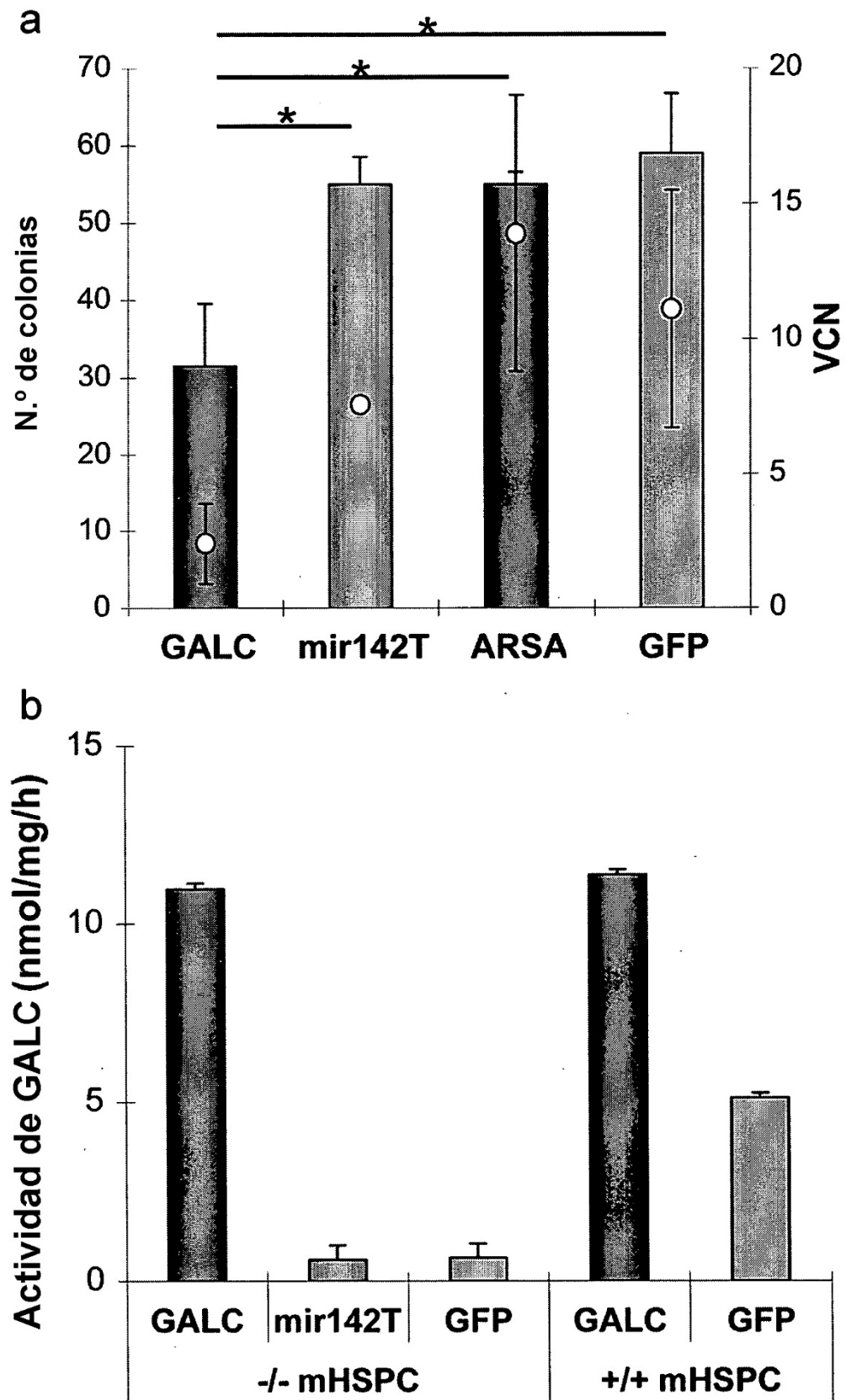


FIG. 10

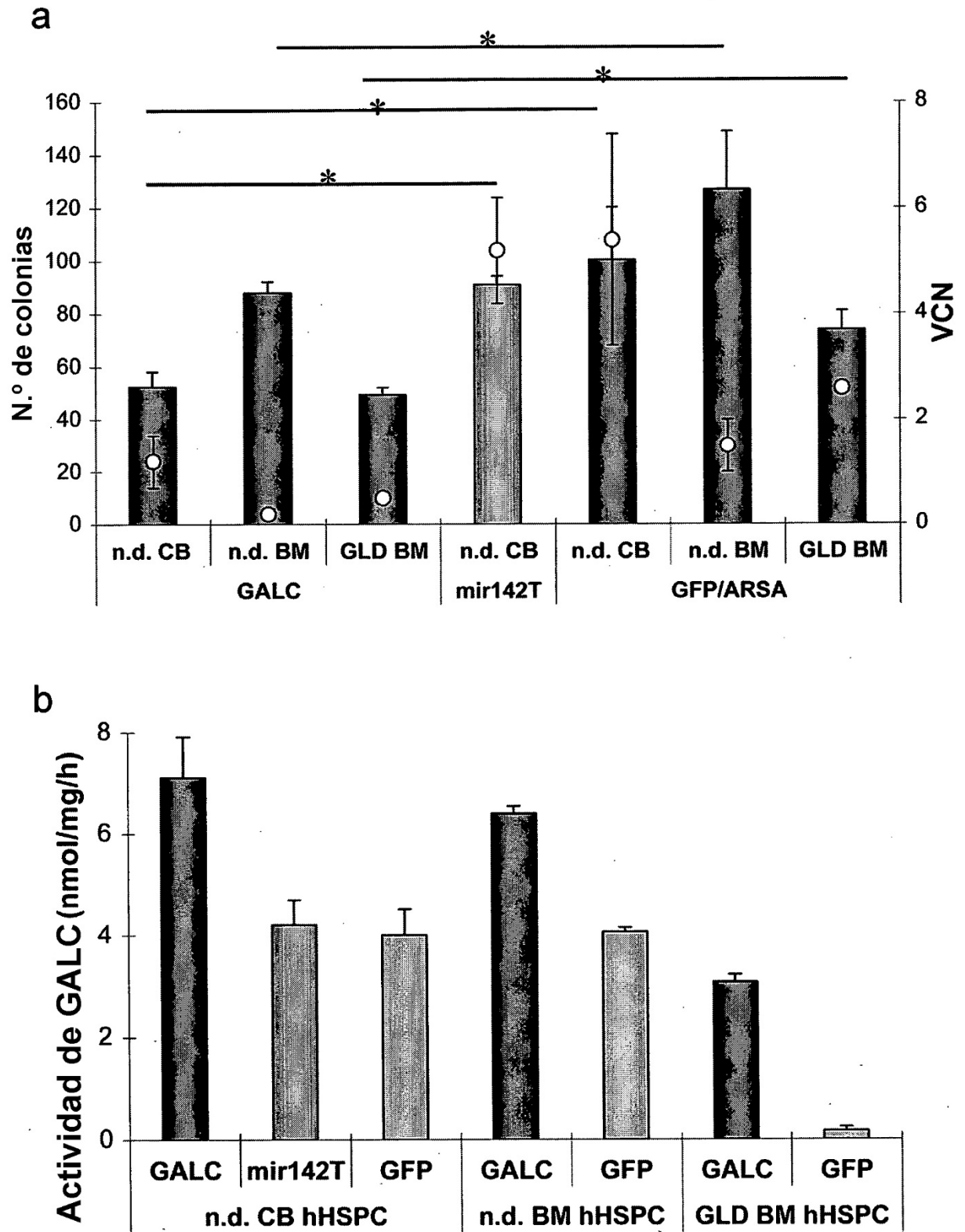


FIG. 11

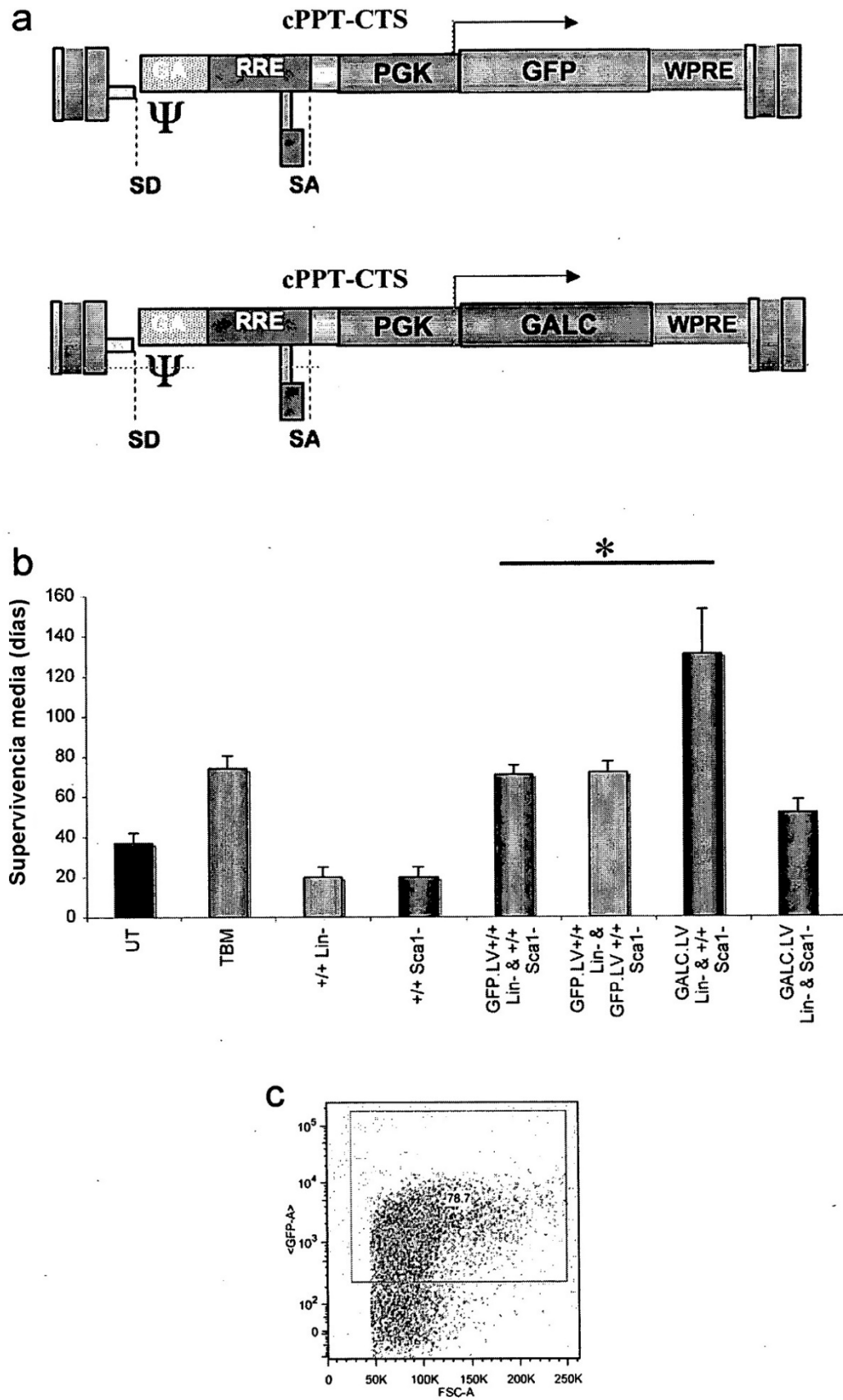


FIG. 12

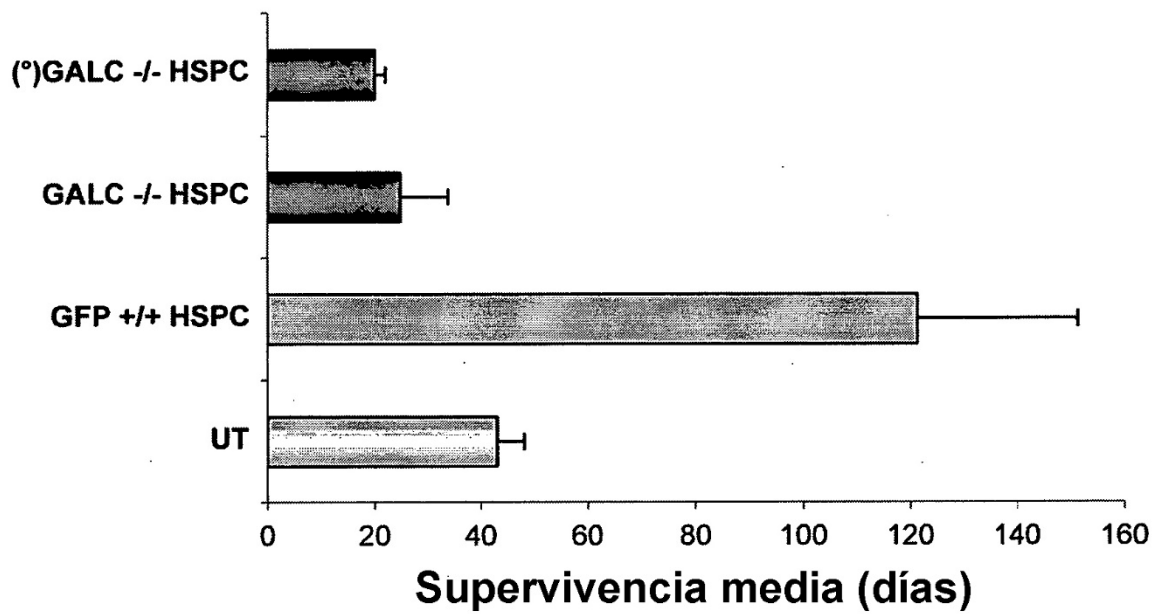
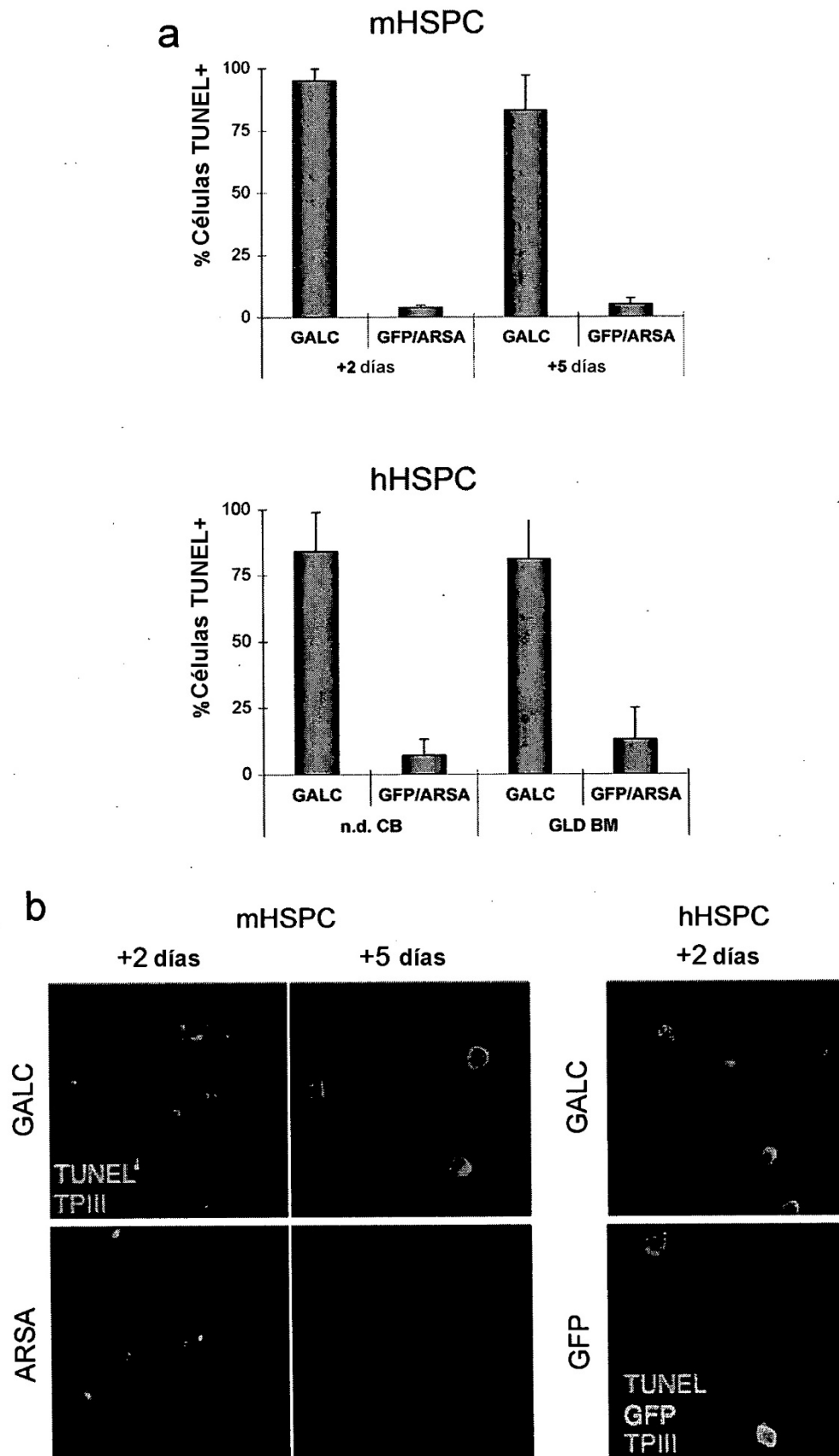


FIG. 13

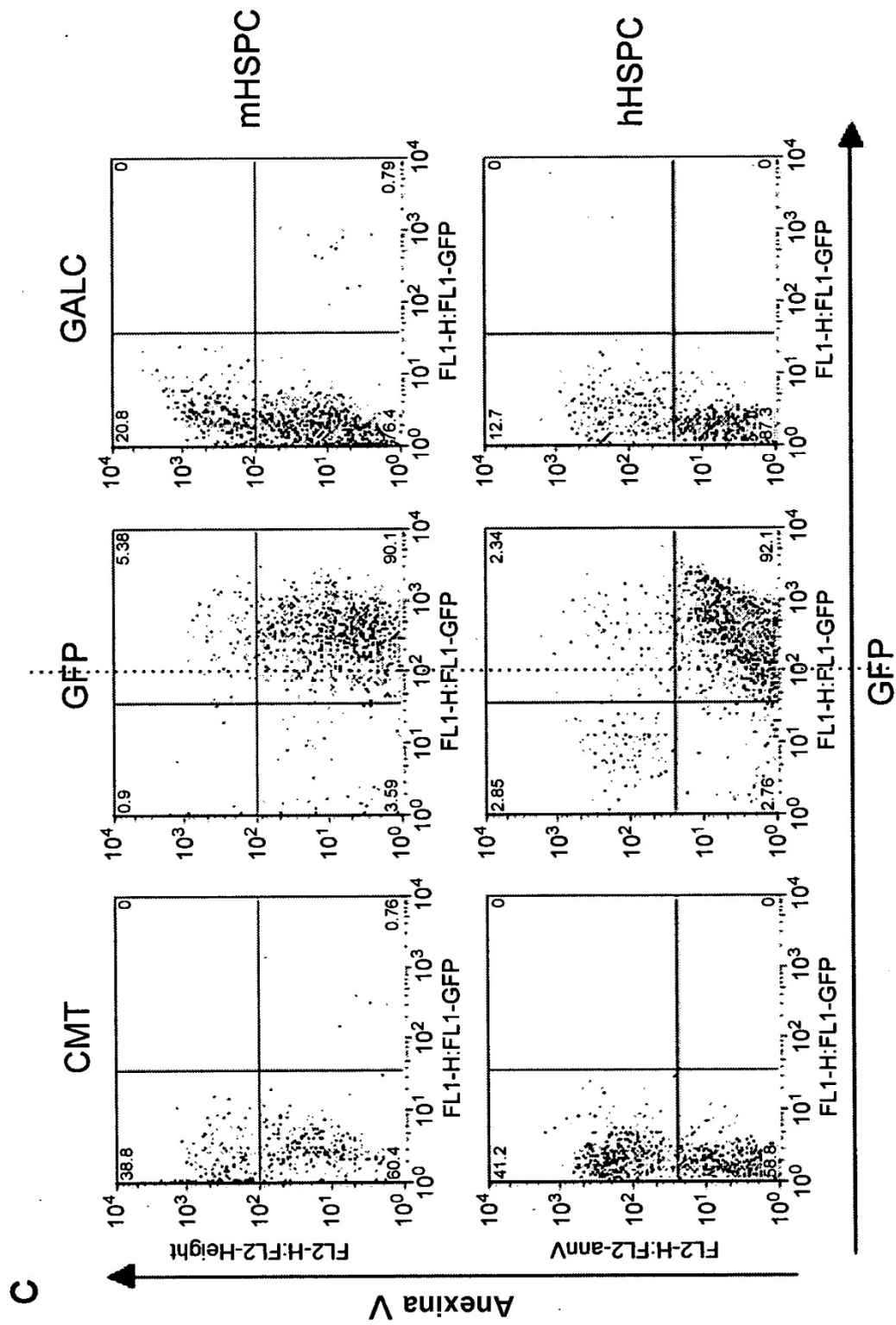
Células trasplantadas	Huésped	VCN (20 días)	VCN (≥120 días)
(° )GALC -/- HSPC ( § )	+/-	$0.01 \pm 0$	-
GALC -/- HSPC ( § )	-/-	$0.02 \pm 0$	-
GALC -/- HSPC ( § )	-/-	$2.3 \pm 1$	$2 \pm 0.5$

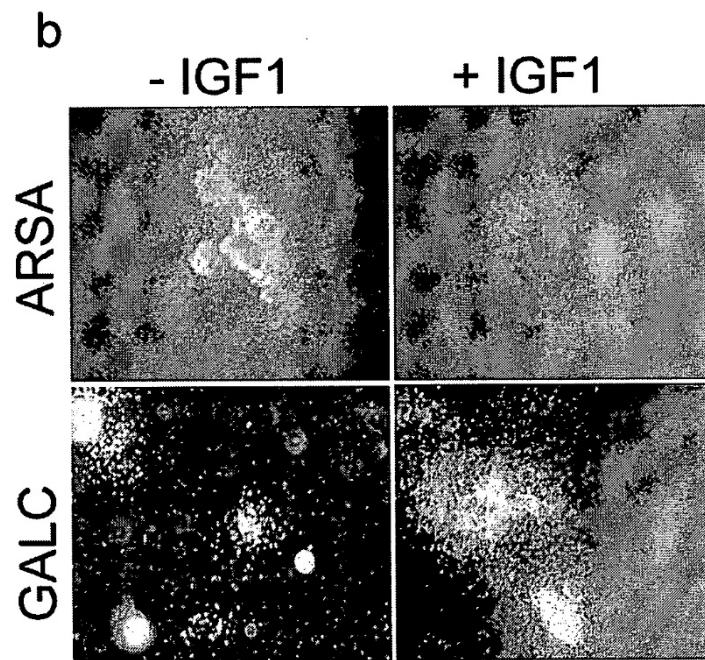
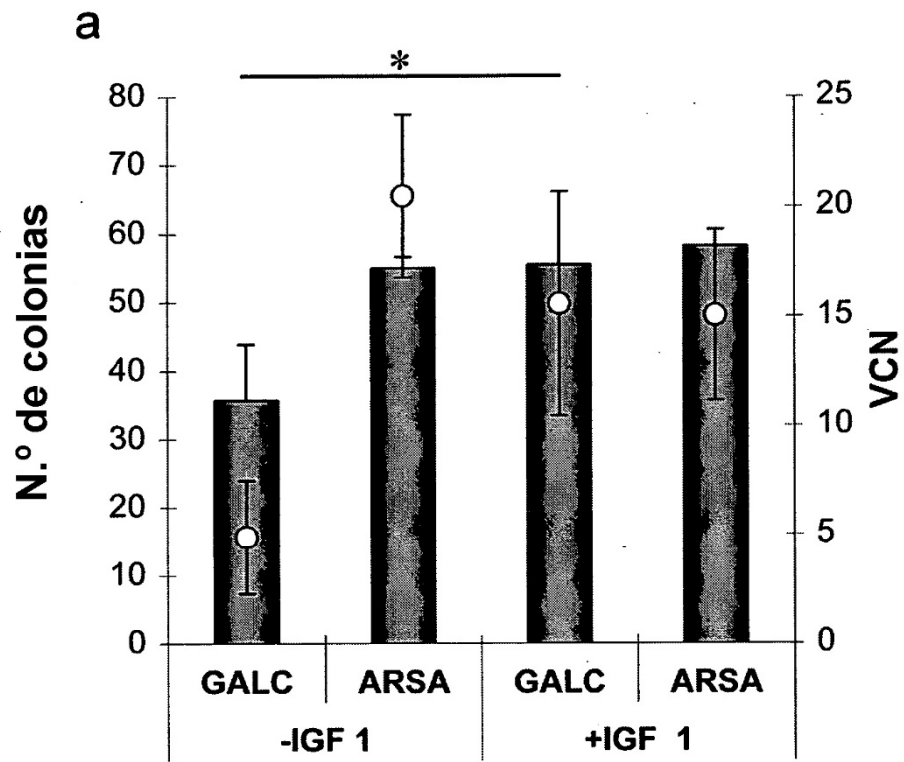
Tabla 2





**FIG. 13** (continuación)





**FIG. 14** (continuación)

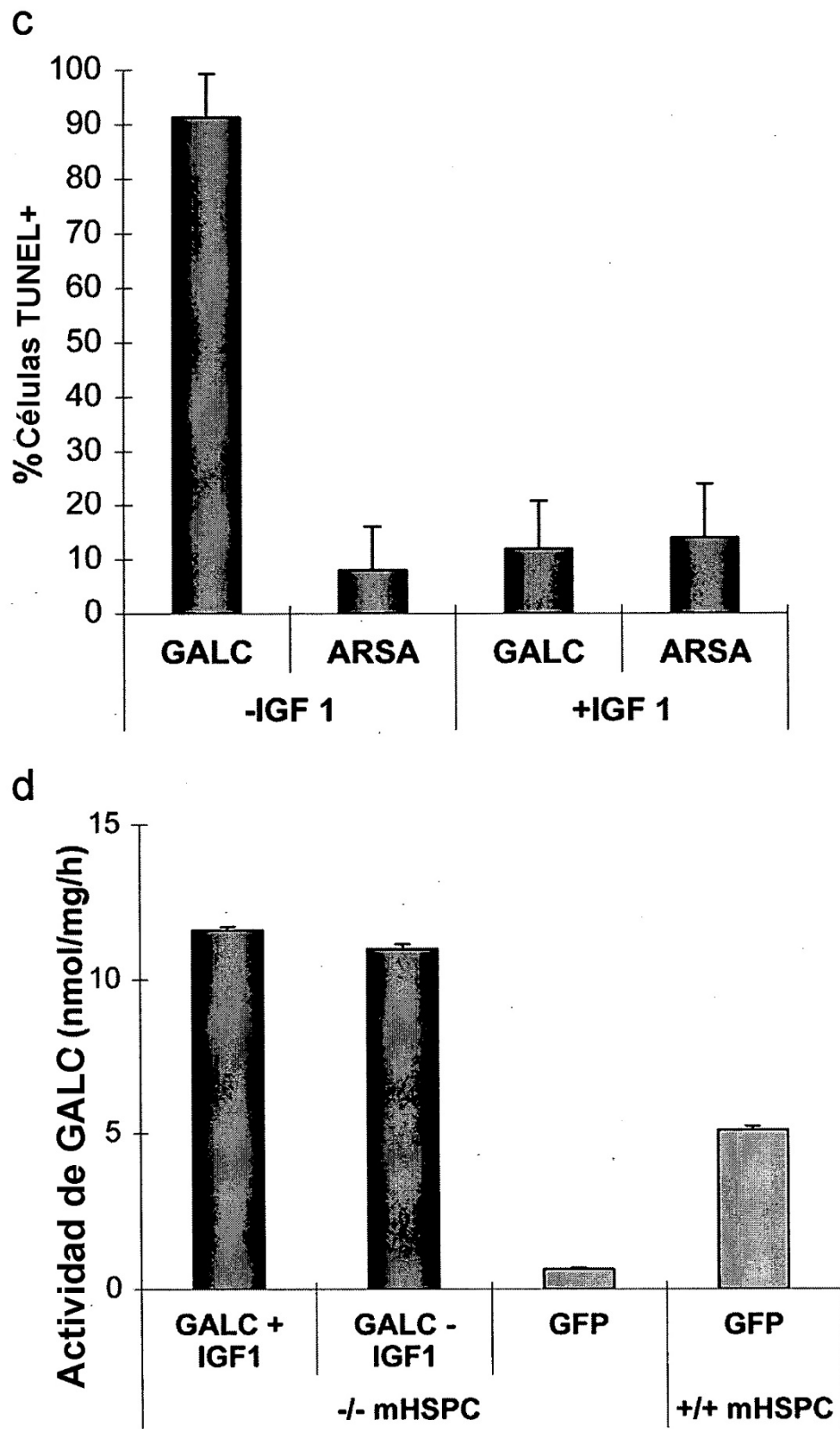


FIG. 15

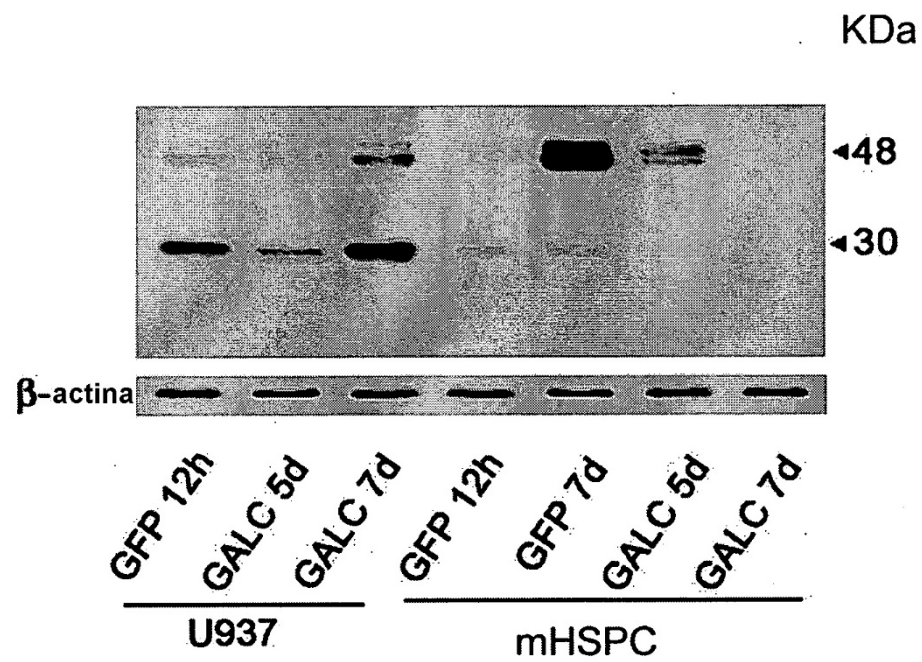


FIG. 16

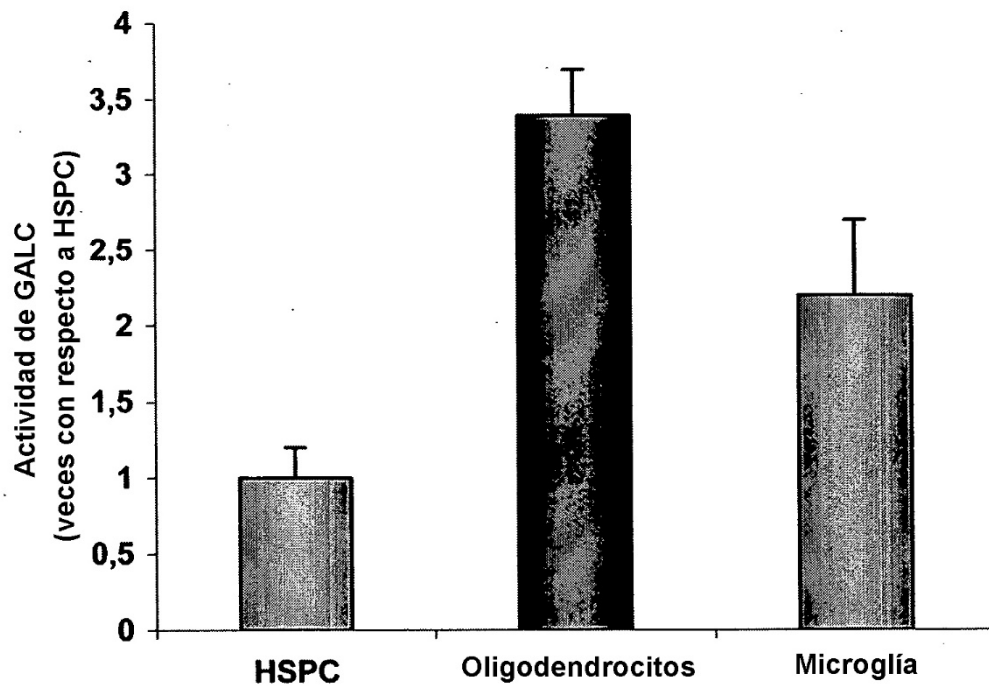
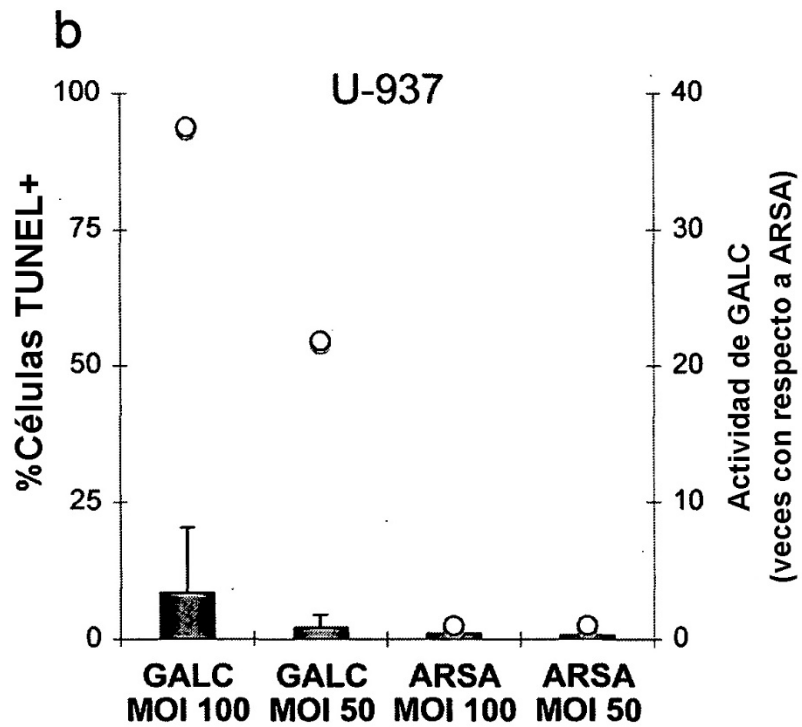
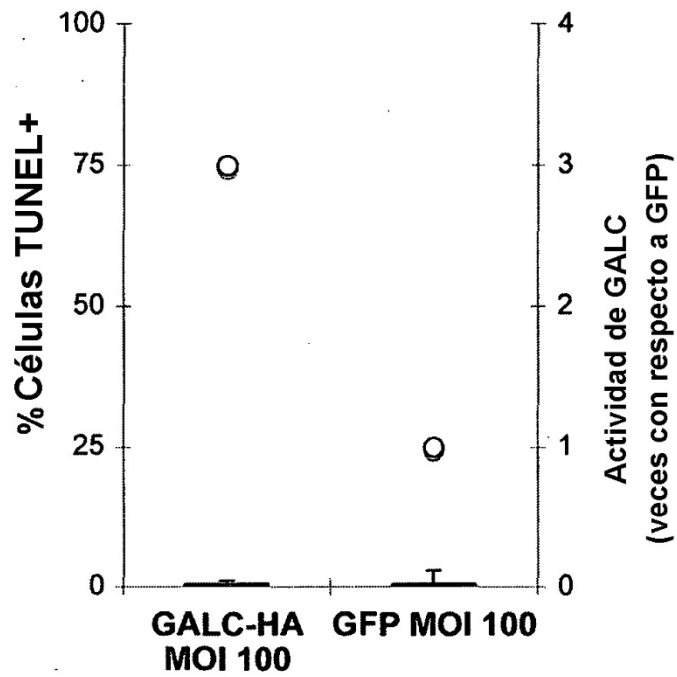


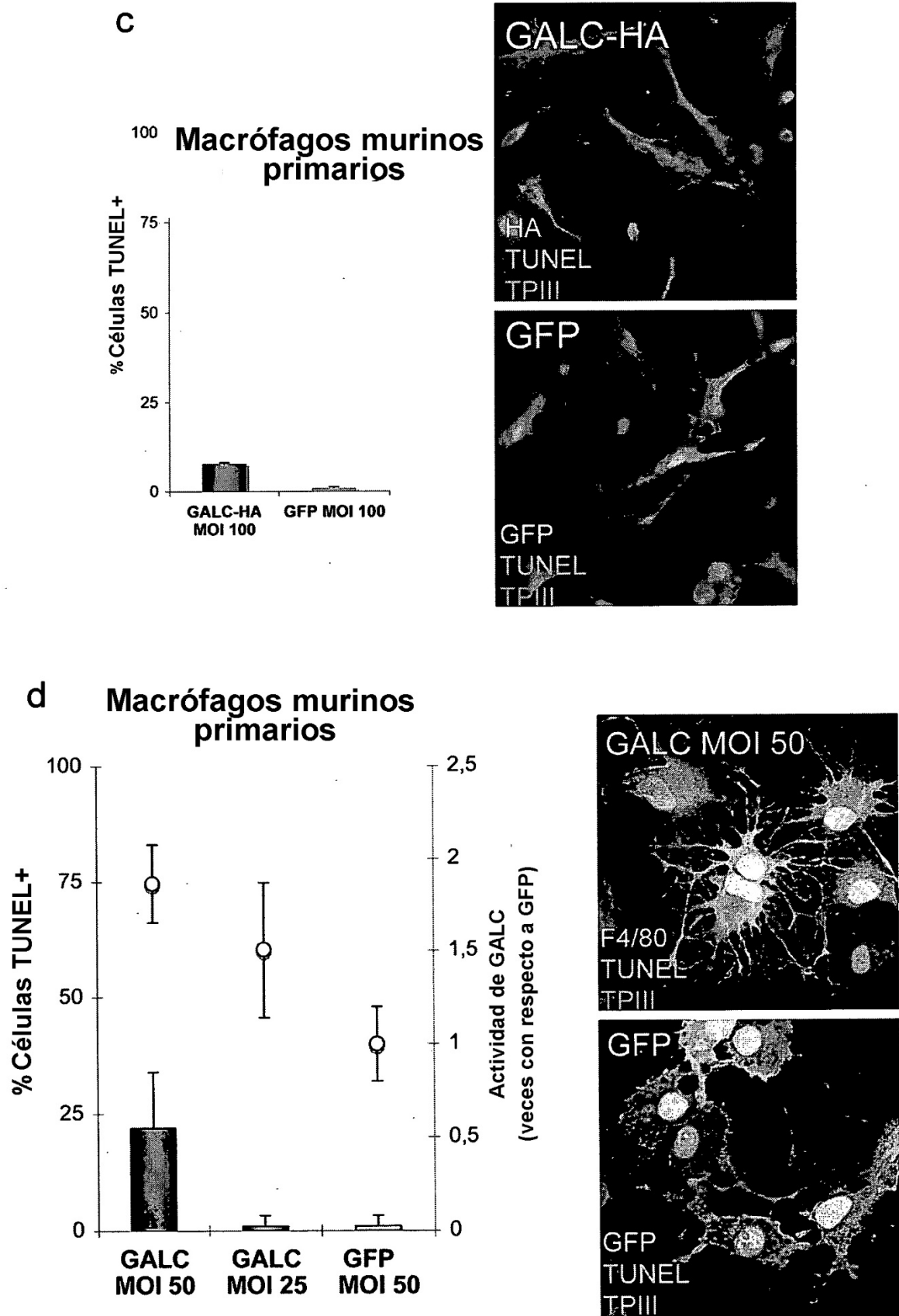
FIG. 17



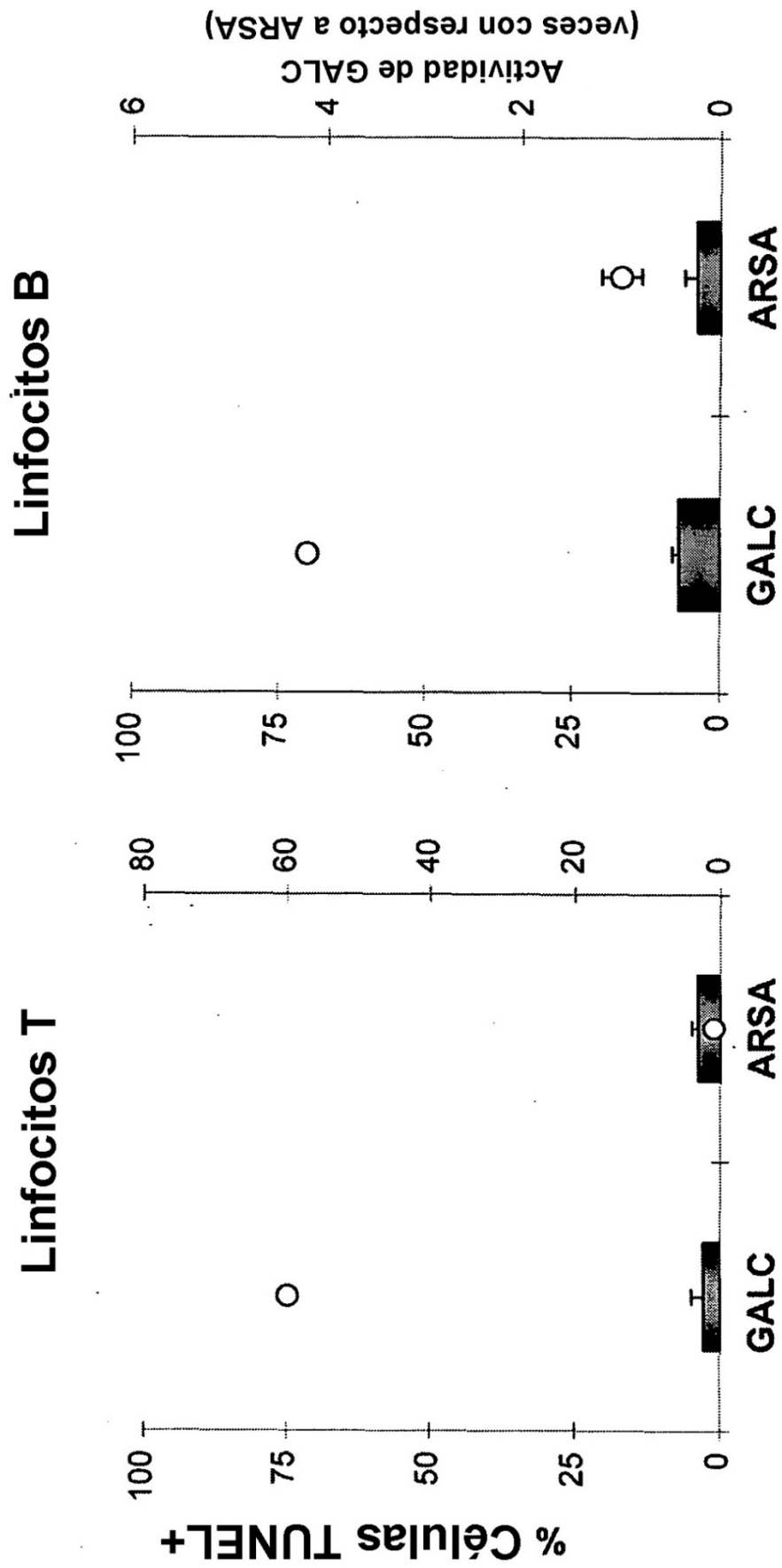
**a Monocitos humanos**



**FIG. 18**



**FIG. 18** (continuación)



**FIG. 19**

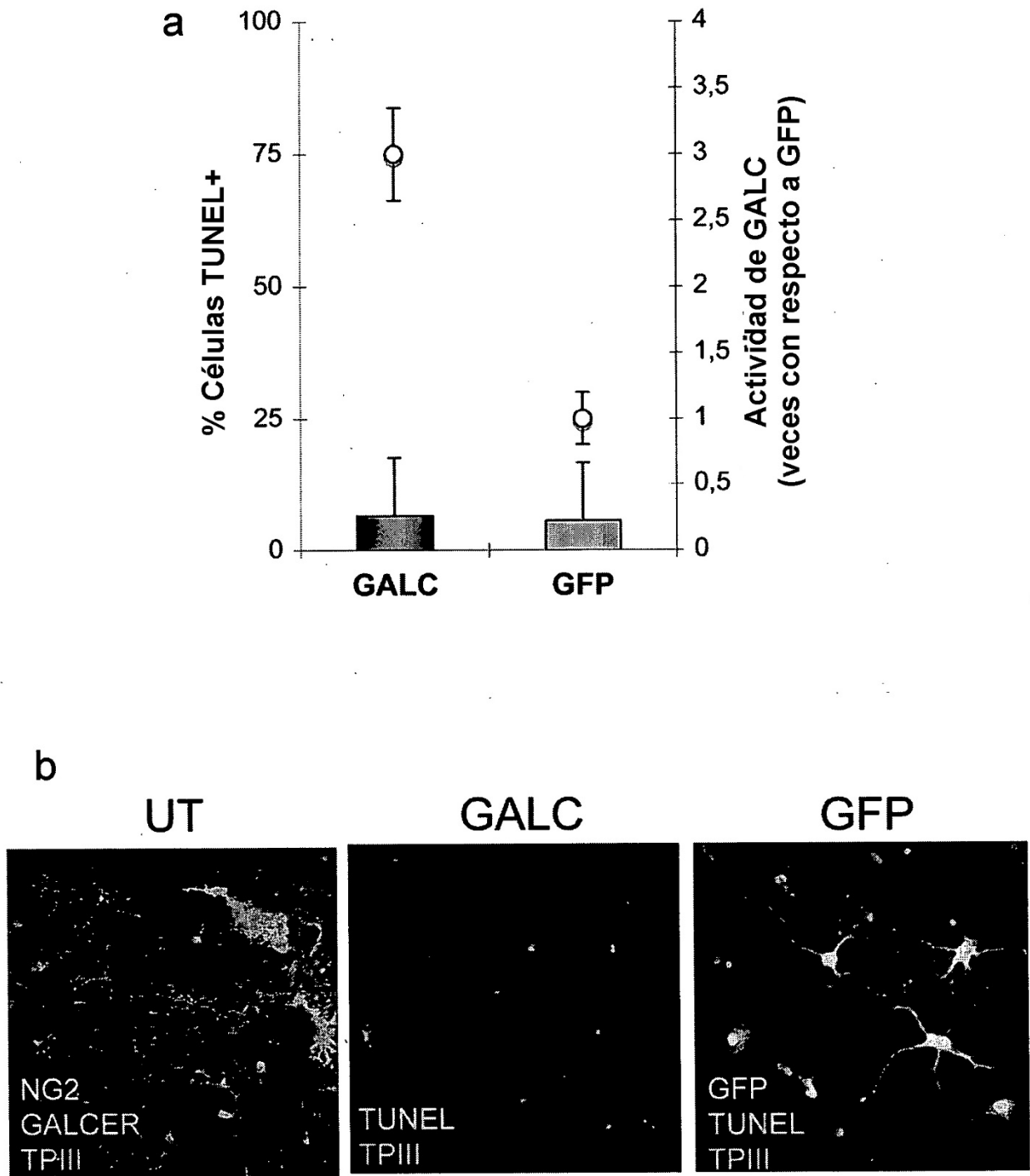


FIG. 20

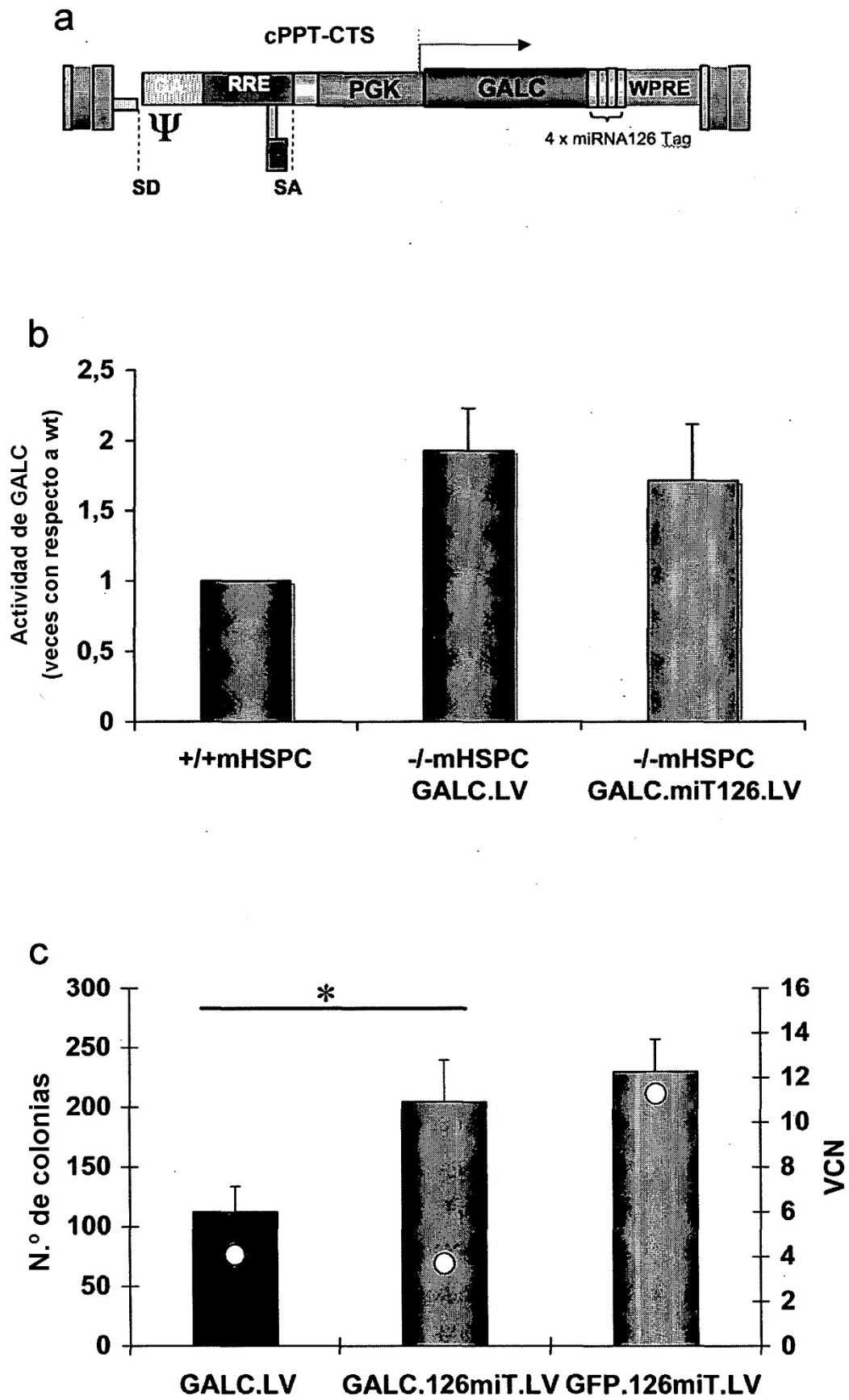
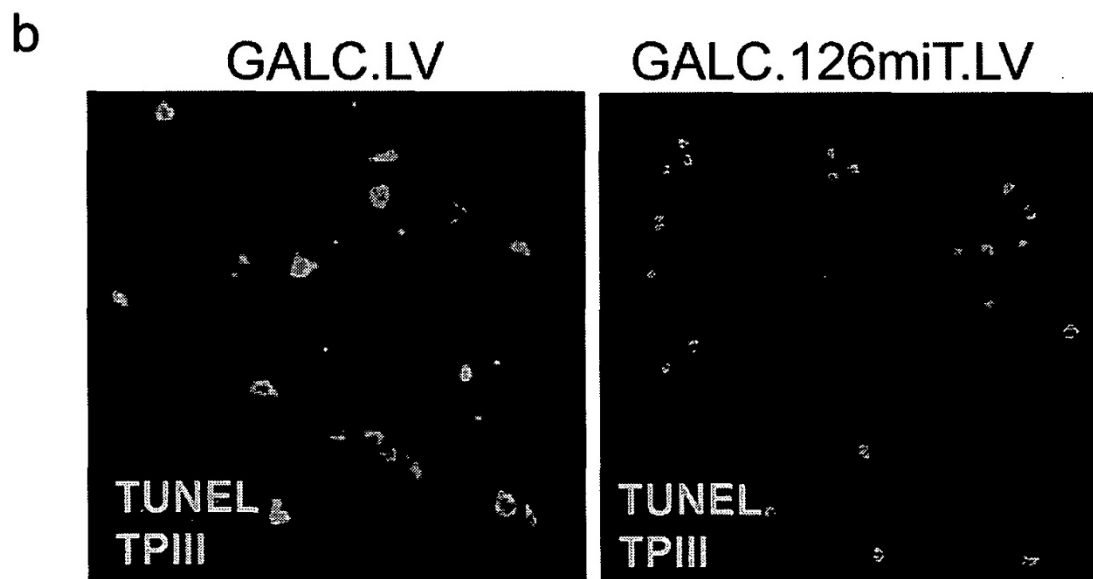
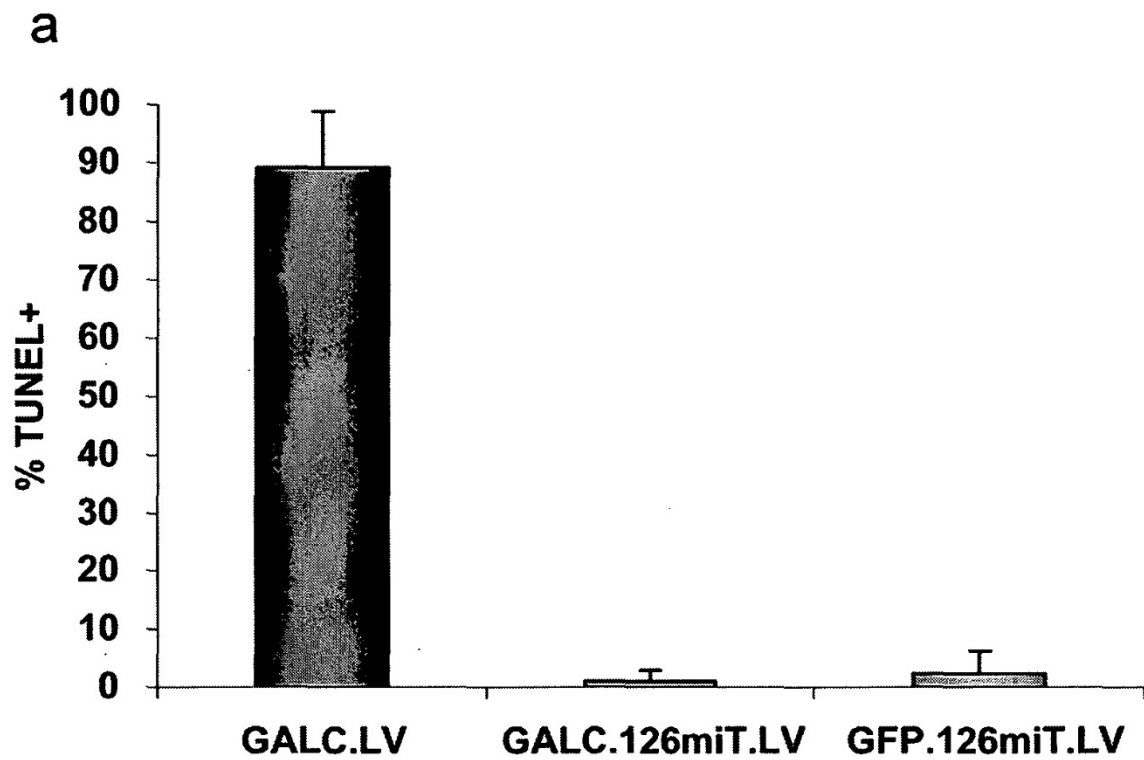


FIG. 21



**FIG. 22**



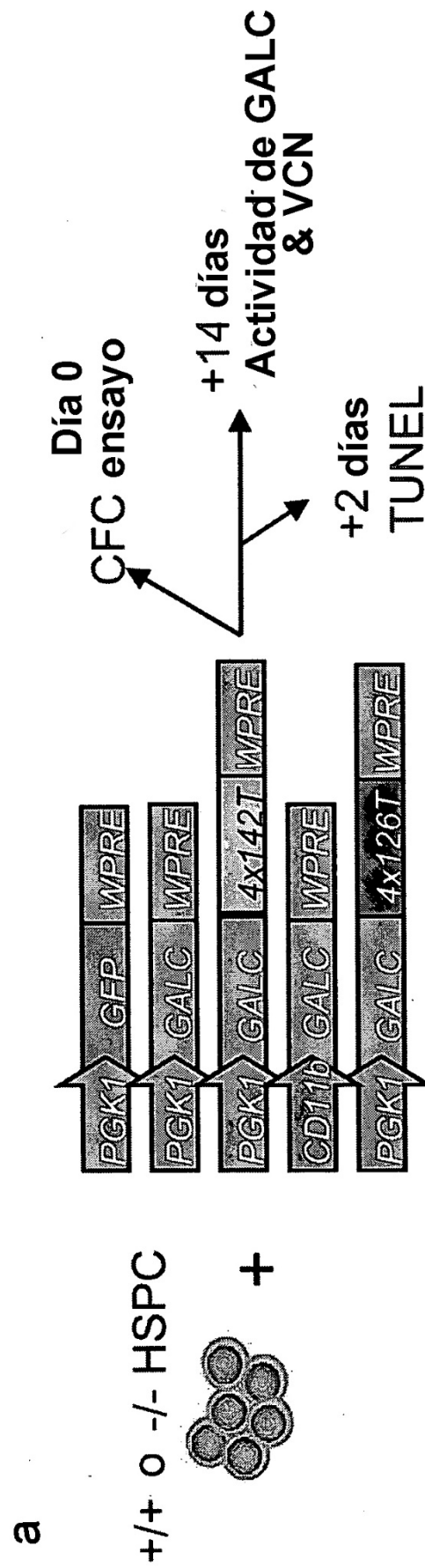


FIG. 23

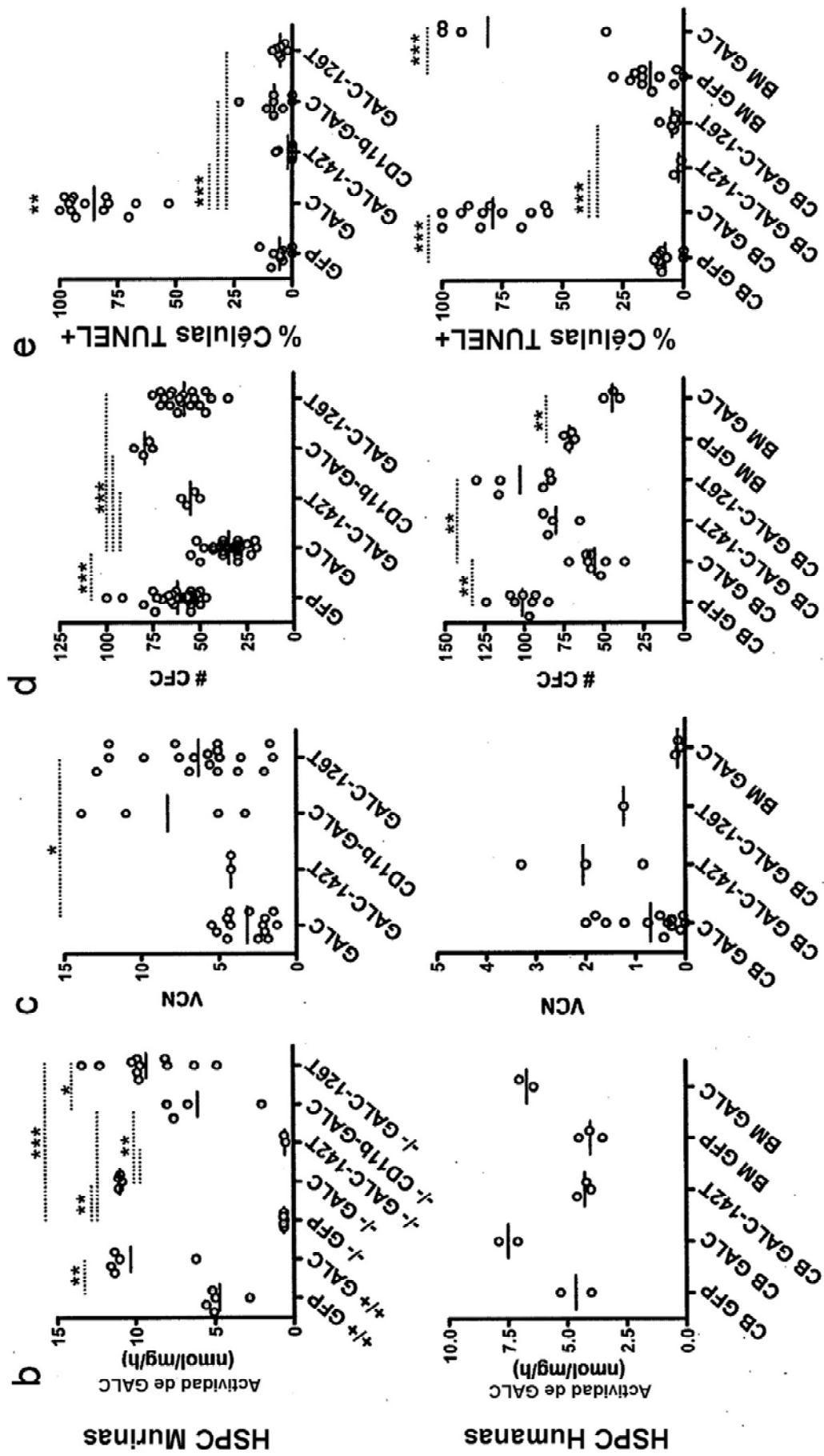




FIG. 23 (continuación)

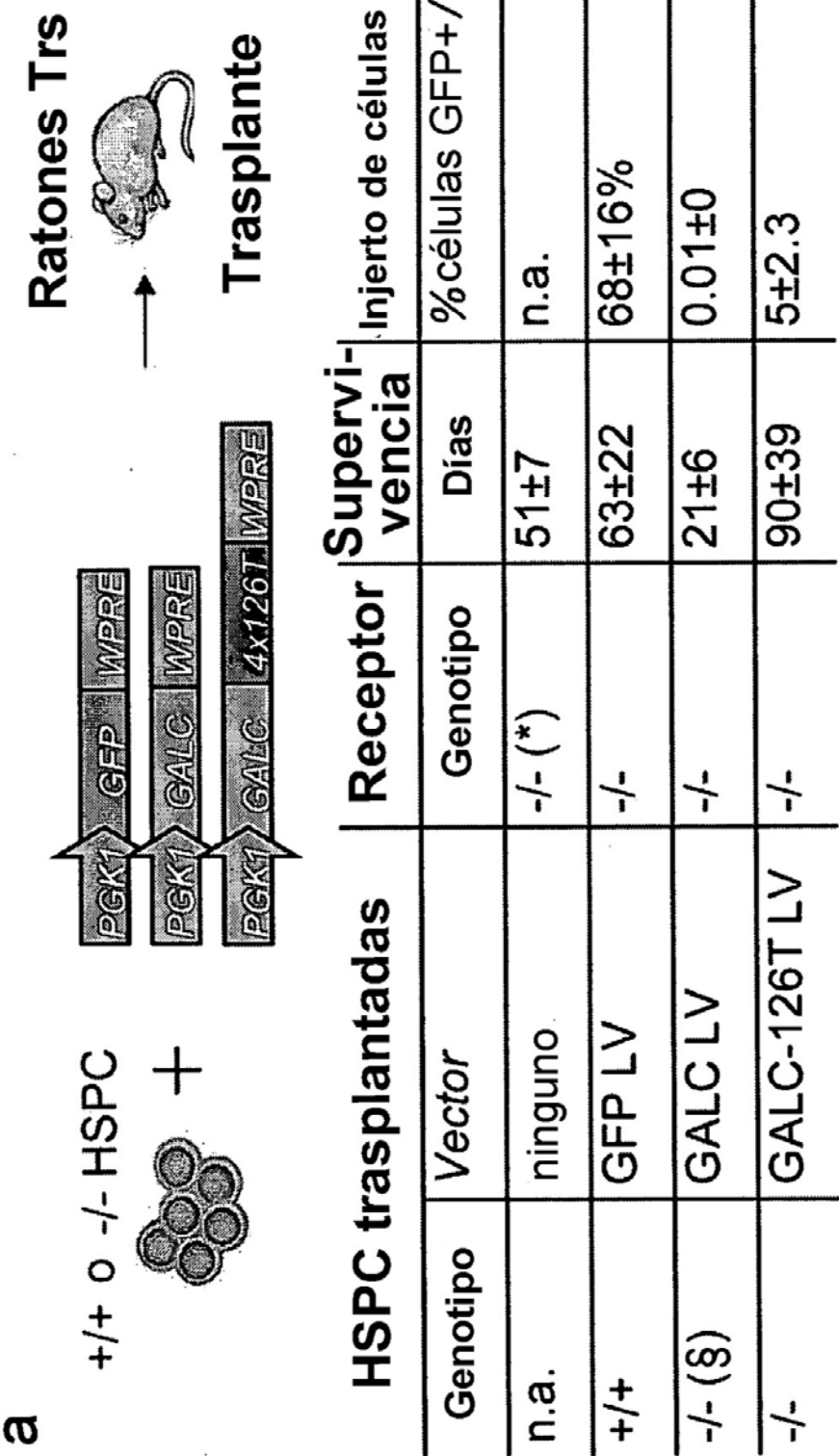
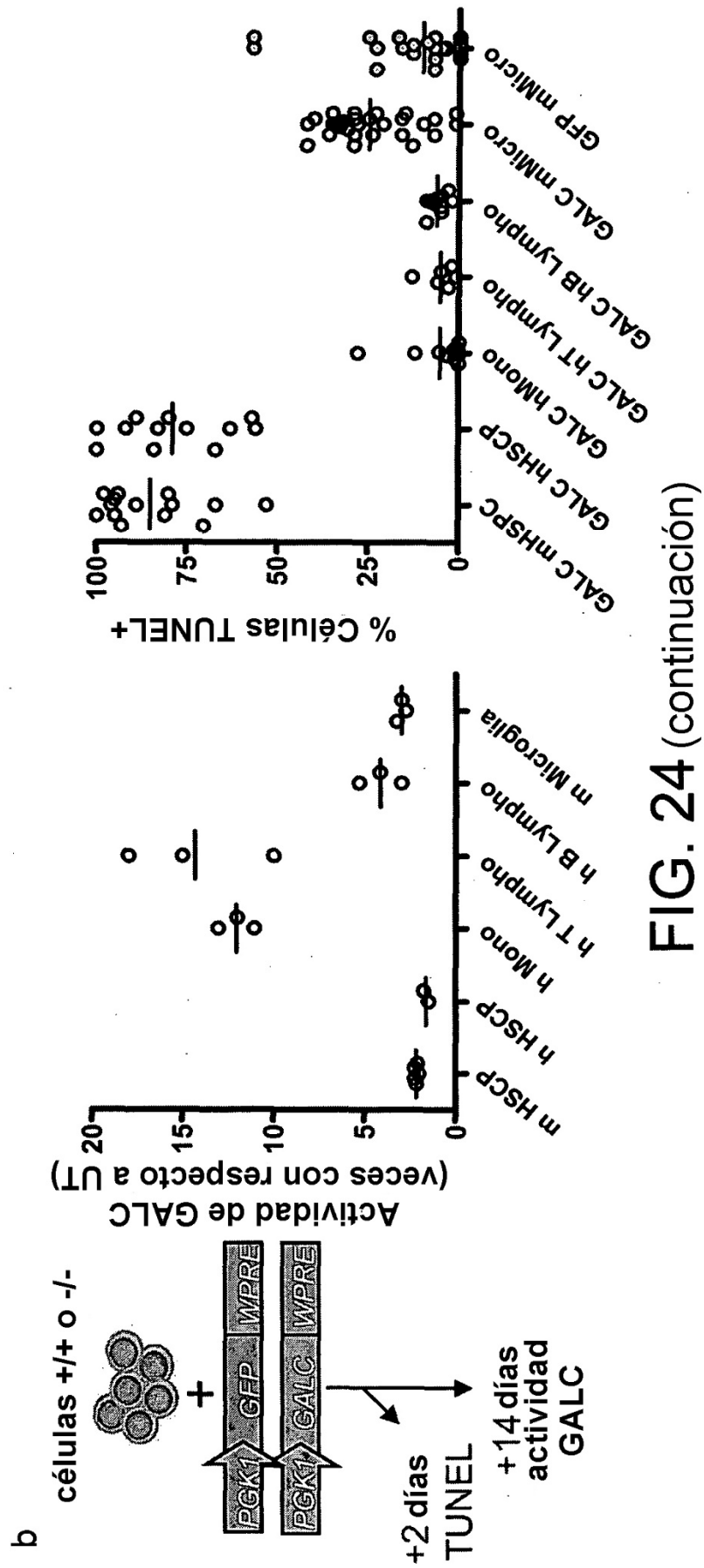


FIG. 24



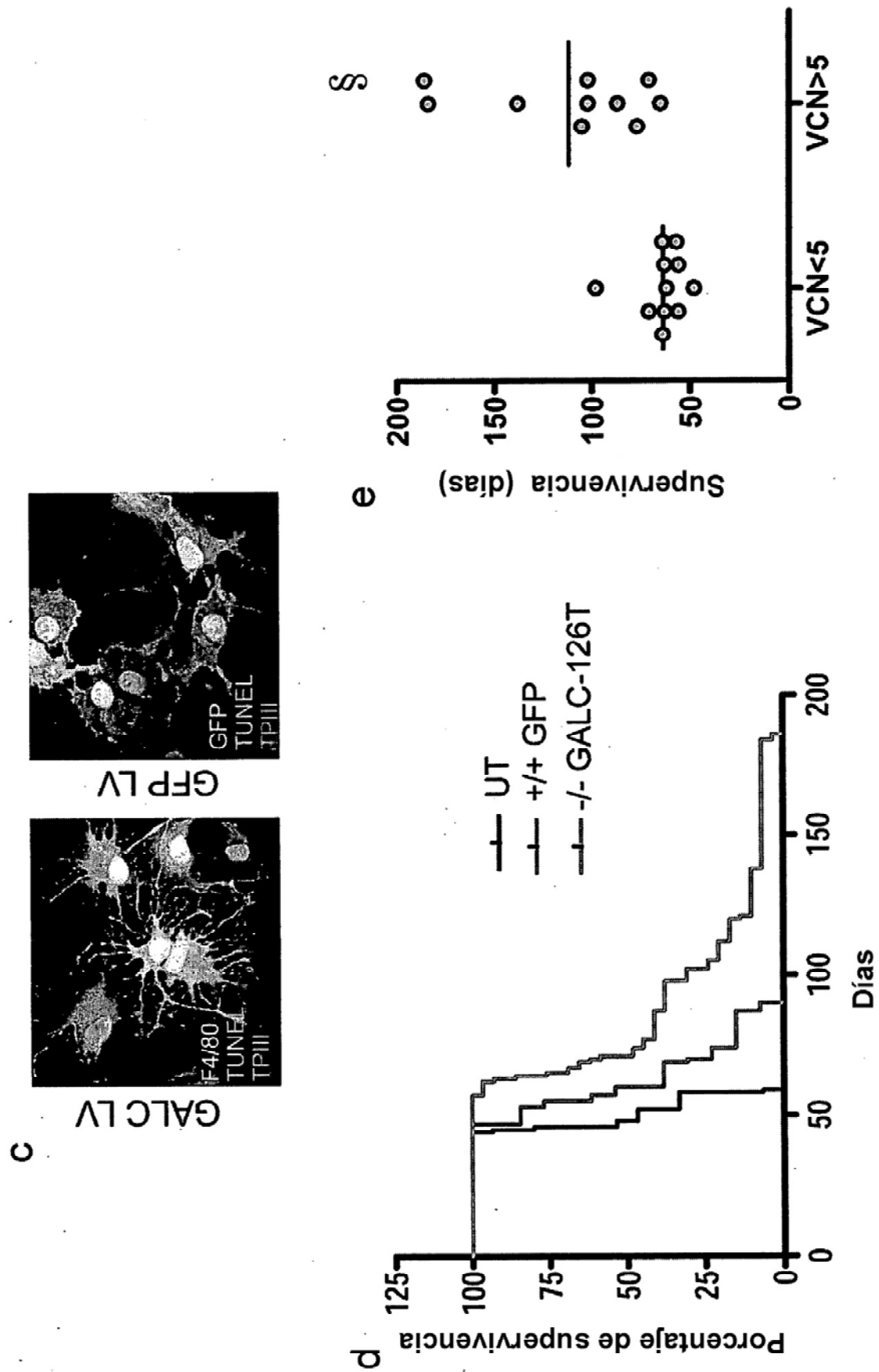


FIG. 24 (continuación)