

VECTORES LENTIVIRALES Y USOS DE LOS MISMOS

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones y un método para restablecer la expresión de RPS19 en células. En particular, en el presente documento se proporcionan métodos y composiciones para terapia génica de anemia de Diamond-Blackfan.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La anemia de Diamond-Blackfan (DBA, del inglés "Diamond Blackfan anemia") es una enfermedad rara con una prevalencia estimada de 5-7 casos por millón de nacimientos vivos que muestra la incidencia y la distribución de los pacientes en diferentes países. El sello distintivo de la DBA es la anemia macrocítica, que se presenta normalmente en el primer año, y con frecuencia evoluciona a neutropenia y trombocitopenia, y en algunos casos a síndrome mielodisplásico o leucemia mieloide aguda (Ruggero y Shimamura, 2014). Por tanto, aunque la DBA se asocia normalmente con aplasia pura de glóbulos rojos, el defecto hematopoyético generalizado define a la DBA como un síndrome de insuficiencia de la médula ósea (IMO).

Las mutaciones en 20 genes de la DBA, más 3 genes "similares a la DBA", representan el 70-80% de los pacientes con DBA. El RPS19, el gen que codifica para la proteína ribosómica S19, es el más comúnmente afectado en la DBA (el 25% de los pacientes) (Da Costa, Narla y Mohandas, 2018). Estos pacientes son normalmente haploinsuficientes para este gen (un gen no afectado, el otro inactivado), lo que conduce a una producción sustancialmente reducida de ribosomas funcionales.

Los corticoesteroides constituyen la primera opción terapéutica para los pacientes con DBA. Aproximadamente el 80% de los pacientes responden inicialmente a los corticosteroides con una mejora o remisión completa de su anemia. Sin embargo, el tratamiento prolongado con corticoesteroides ha mostrado una eficacia limitada en muchos pacientes, de modo que sólo alrededor del 40% permanecerá con corticoesteroides durante un periodo de tiempo prolongado, lo que implica que, en general, al menos el 40% de los pacientes con DBA son dependientes de transfusiones. Hasta la fecha, el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-HSCT del inglés "alo-hematopoietic stem cell transplantation") es el único tratamiento curativo disponible para los pacientes con DBA. El consenso es usar donantes hermanos o donantes no emparentados totalmente compatibles (10/10), sin embargo, sólo una minoría de pacientes tiene acceso a un donante adecuado. Además, el resultado clínico de los pacientes con DBA trasplantados con donantes alternativos después de los 10 años de

edad es muy malo. Además, la DBA se identifica ahora como una enfermedad propensa al cáncer, y la incidencia de cáncer en estos pacientes podría incluso aumentar después del acondicionamiento mieloablativo y el trasplante, tal como ya se ha demostrado en pacientes con anemia de Fanconi (FA, del inglés Fanconi anemia).

- 5 La terapia génica destinada a corregir las mutaciones genéticas en las células madre hematopoyéticas representa una posible estrategia terapéutica para este trastorno genético. La terapia génica a través de gammaretrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados resulta atractiva debido a la capacidad natural de los virus para introducirse en las células e insertarles material genético. En particular, los vectores lentivirales (LV, del inglés “lentiviral
10 vectors”) son vehículos adecuados para la inserción de genes, ya que se consideran relativamente seguros y son capaces de integrarse de manera estable en el ADN genómico de una amplia variedad de tipos de células de mamífero en división y no en división. La capacidad de integrarse de manera estable en el genoma hace de los LV una herramienta única e ideal para la terapia génica, especialmente para corregir y tratar trastornos genéticos
15 tales como la DBA.

Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad crítica de un régimen de tratamiento eficaz para la DBA, y la presente invención proporciona LV que no sólo son capaces de restablecer la expresión de la proteína RPS19, sino que también son capaces de corregir la alteración en el proceso de biogénesis ribosómica.

20 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

- Figura 1. Diagrama esquemático de los vectores terapéuticos generados: a) *PGK.CoRPS19.Wpre** y b) *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**.** 5' LTR: repetición terminal larga 5' (del inglés “5' long terminal repeat”); PBS: sitio de unión del cebador (del inglés “primer binding site”); Ψ: señal de empaquetamiento psi; ΔGAG: secuencia de Gag truncada; SA: aceptor de empalme (del inglés “splicing acceptor”); RRE: elemento sensible a Rev (del inglés “Rev responsive element”); cPPT: ADN tracto de polipurina central (del inglés “central polypurine tract”); PGK: promotor de fosfoglicerato quinasa (del inglés “phosphoglycerate kinase promoter”); EF1α(s): factor de elongación 1α (del inglés “elongation factor 1α”) en su versión corta ((s); del inglés “short”); CoRPS19: secuencia de nucleótidos con codón optimizado que
25 codifica la proteína RPS19; Wpre*: elemento regulador postranscripcional mutado optimizado del virus de la hepatitis de la marmota (del inglés “Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element”); 3' LTR: repetición terminal larga 3' (del inglés “3' long terminal repeat”); PolyA: secuencia señal de poliadenilación.
30

Figura 2. Determinación del número de células CD34⁺ en la médula ósea de pacientes con anemia de Blackfan-Diamond (DBA; del inglés “Diamond-Blackfan anemia”):

a) Porcentaje de células CD34⁺ en médula ósea de pacientes con DBA (DBA), pacientes con anemia de Fanconi (FA, del inglés “Fanconi anemia”) y donantes sanos (DS), como control.

- 5 **b)** Celularidad de la médula ósea. **c)** Porcentaje de células CD34⁺/CD38⁻ en la médula ósea. El grado de significancia se determinó mediante la prueba de Mann Whitney (valor P; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$). Los gráficos muestran la mediana y el rango intercuartílico junto con los percentiles 90:10.

10 **Figura 3. Cuantificación del porcentaje de las diferentes subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos en médula ósea de pacientes con DBA y donantes sanos:**

a) HSC (del inglés “hematopoietic stem cells”, células madre hematopoyéticas: Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻). **b)** MPP (del inglés “multipotent progenitors”, progenitores multipotentes: CD34⁺CD38⁻Thy-1⁻CD45RA⁻Flt3⁺CD7⁻CD10⁻). **c)** MLP (del inglés

- 15 “multilymphoid progenitors”, progenitores multilinfoides: CD34⁺CD38⁻Thy-1^{bajo}CD45RA⁻Flt3⁺CD7^{-/+}CD10⁻). **d)** CMP (del inglés “common myeloid progenitors”, progenitores mieloides comunes: CD34⁺CD38⁺Thy-1⁻CD45RA⁻Flt3⁺CD7⁻CD10⁻). **e)** MEP (del inglés “megakaryocytic and erythroid progenitors”: progenitores megacariocíticos y eritroides: CD34⁺CD38⁺Thy-1⁻CD45RA⁻Flt3⁻CD7⁻CD10⁻). **f)** GMP (del inglés “granulocytic-monocytic progenitors”, progenitores granulo-monocíticos: CD34⁺CD38⁺Thy-1⁻CD45RA⁺Flt3⁺CD7⁻CD10⁻). El grado de significancia se determinó mediante la prueba de Mann Whitney. Los gráficos muestran la mediana y el rango intercuartílico junto con los percentiles 90:10. DS: donantes sanos; DBA: pacientes con DBA.
- 20

25 **Figura 4. Determinación del contenido de células formadoras de colonia (CFCs, del inglés “colony forming cells”) de progenitores hematopoyéticos en la médula ósea:**

a) Número de unidades formadoras de colonias granulo-macrófagicas (CFU-GMs, del inglés “granulocyte-macrophage progenitor colony forming units”) por cada 10^5 células mononucleares (MNC, del inglés “mononuclear cells”) sembradas. **b)** Número de unidades de formación de colonias eritroides (BFU-Es, del inglés “burst-forming unit-erythroid progenitors”) por cada 10^5 células MNC sembradas. El grado de significancia se determinó mediante la prueba de Mann Whitney (valor P; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$). Los gráficos muestran la mediana y el rango intercuartílico junto con los percentiles 90:10. MO: médula ósea; DS: donantes sanos; DBA: pacientes con DBA; FA: pacientes con anemia de Fanconi.

Figura 5. Determinación del potencial de reconstitución de células CD34⁺ de donantes sanos y pacientes con DBA tras ser trasplantadas en ratones NSG inmunodeficientes:

a) Porcentaje de células CD45⁺ humanas (hCD45⁺) injertadas en la médula ósea de ratones NSG en el tiempo (30, 60 y 90 días post-trasplante (dpt)). **b)** diferenciación de las células injertadas a los diferentes linajes hematopoyéticos. CD33⁺: mieloide, CD19⁺: linfoide y CD34⁺: células madre hematopoyéticas (CMH). El grado de significancia se determinó mediante la prueba de Mann Whitney (valor P; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$). Los gráficos muestran la mediana y el rango intercuartílico junto con los percentiles 90:10. DS: donantes sanos; DBA: pacientes con DBA.

Figura 6. Estudio de la expresión endógena del gen *RPS19* en una línea celular modelo de enfermedad (K562 interferida en el gen *RPS19* por los vectores *LV-THM.shRPS19* y *MISSION® pLKO.1-pure TurboGFP™ shRPS19*) posteriormente corregida con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre y *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**:**

a) Panel izquierdo: reducción de la expresión endógena de *RPS19* por medio del vector *LV-THM.shRPS19* (ShRPS19-LV); panel derecho: detección de la secuencia *CoRPS19* tras la corrección con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** (PGK.CoRPS19-LV) y *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** (EF1α.CoRPS19-LV). **b)** Panel izquierdo: reducción de la expresión endógena de *RPS19* por medio del vector *LV-MISSION® pLKO.1-pure TurboGFP™ shRPS19* (ShRPS19-LV); panel derecho: detección de la secuencia *CoRPS19* tras la corrección con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** (PGK.CoRPS19-LV) y *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** (EF1α.CoRPS19-LV). El grado de significancia se determinó mediante la prueba t-test (valor P; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$). Los gráficos muestran la media y la desviación estándar. La línea discontinua en los paneles izquierdos refleja la expresión endógena basal de *RPS19* de un control sin interferir en K562.

Figura 7. Análisis de la biogénesis ribosomal en la línea celular K562 interferida para el gen *RPS19* y posteriormente corregida con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**:**

a) Panel izquierdo: Detección del nivel de ARNr pre-21S/21C (asterisco, 21S/21S-C) por transferencia *Northern* en células interferidas con el vector de interferencia *LV-THM.shRPS19* y posteriormente transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** (PGK.CoRPS19-LV) o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** (EF1α.CoRPS19-LV); panel derecho: gráfico que muestra la cuantificación de la relación entre el ARNr pre-21S y 21C (pre ARNr 21S / 21S-C) detectado por *Northern blot* en células interferidas con el vector de interferencia *LV-THM.shRPS19* y posteriormente transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** o

*EF1α(s).CoRPS19.Wpre**. **b)** Panel izquierdo: detección de los niveles de ARNr pre-21S y 21C (asterisco, pre ARNr 21S / 21S-C) por transferencia de *Northern* en células interferidas con el vector de interferencia *LV-MISSION® pLKO.1-pure TurboGFP™ shRPS19* y posteriormente transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**; panel derecho: gráfico que muestra la cuantificación de la relación entre el ARNr pre-21S y 21C (pre ARNr 21S / 21S-C) detectado por transferencia *Northern* en células interferidas con el vector de interferencia *LV-MISSION® pLKO.1-pureTurboGFP™ shRPS19* y posteriormente transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**. El grado de significancia se determinó mediante la prueba ANOVA y su análisis grupo por grupo (valor P; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$). Los gráficos muestran la desviación estándar y media de tres experimentos. 1.Mock: células no transducidas; 2.SCRB: células trasducidas con un vector interferente inespecífico *LV-THM.shscramble*. 1.Mock y 2.SCRB se incluyen como controles negativos. *PGK.CoRPS19*: condición transducida con el vector *PGK.CoRPS19.Wpre**; *EF1α.CoRPS19*: condición transducida con el vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**; Sh+*PGK.CoRPS19*: condición co-transducida con los vectores de interferencia en a) *LV-THM.shRPS19* y en b) *MISSION® pLKO.1-pureTurboGFP™ shRPS19* y el vector *PGK.CoRPS19.Wpre**; Sh+*EF1α.CoRPS19*: condición co-transducida con los vectores de interferencia en a) *LV-THM.shRPS19* y en b) *MISSION® pLKO.1-pureTurboGFP™ shRPS19* y *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** LV.

20

Figura 8. Determinación del número de colonias de progenitores hematopoyéticos generadas tras la transducción de células CD34⁺ de pacientes con DBA con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** o con el vector control *PGK.EGFP.Wpre**: a)** Número de colonias CFU-GMs por cada 10⁵ células MNC sembradas. **b)** Número de colonias BFU-E por cada 10⁵ células MNC sembradas. El número de experimentos realizados con células transducidas con el vector *PGK.EGFP.Wpre** (PGK EGFP) fue N= 3, con el vector *PGK.CoRPS19.Wpre** (PGK.CoRPS19) fue N=5 y con el vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** (EF1α.CoRPS19) fue N= 5.

Figura 9. Eficiencia de corrección y toxicidad nula tras la transducción con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** en células CD34⁺ de pacientes con DBA: a)** Porcentaje de transducción de progenitores hematopoyéticos en pacientes con DBA tras la corrección con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** (PGK.CoRPS19) o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** (EF1α.CoRPS19) o el vector control *PGK.EGFP.Wpre** (PGK EGFP). **b)** Número de copias del vector (VCN, del inglés “vector copy number”) integradas en células mantenidas en cultivo líquido (CL) y **c)** en células formadoras

35

de colonia (CFCs). El grado de significancia se determinó mediante la prueba de Mann Whitney. El número de experimentos realizados para la condición: *PGK.EGFP.Wpre** es N=4, *PGK.CoRPS19.Wpre** es N=5, y para *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** es N = 3. El gráfico representa el valor medio correspondiente a la transducción de células CD34⁺ de 5 pacientes diferentes con la desviación estándar correspondiente.

Figura 10. Análisis del efecto de la transducción con los vectores terapéuticos en la expansión de progenitores hematopoyéticos de pacientes con DBA en cultivo líquido. Número de células obtenidas tras la expansión de progenitores hematopoyéticos de pacientes con DBA tras ser transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** (*PGK.CoRPS19*) o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** (*EF1.CoRPS19*). El vector *PGK.EGFP.Wpre** (*PGK.EGFP*) se utilizó como control. El número de células se midió el día 0 antes de la transducción (D0) y en dos puntos de tiempo diferentes después de la transducción (después de 7 (D7) y 14 días (D14)).

Figura 11. Análisis del proceso de diferenciación eritroide de células pacientes con DBA tras la corrección con los vectores terapéuticos: Cuantificación del porcentaje de CD71⁺/CD235a⁺ y CD71⁻/CD235a⁺ (CD71/CD235a) en la población de células CD34⁺ de medula ósea (MO) de pacientes con DBA transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** (*PGK.CoRPS19*) o la *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** (*EF1.CoRPS19*) o el vector control *PGK.EGFP.Wpre** (*PGK.EGFP*). La figura muestra **a)** los análisis individuales de 3 pacientes (DBA-31, DBA-25, y DBA-36) y **b)** la media de los tres pacientes en conjunto. El grado de significancia se determinó mediante la prueba de Mann Whitney. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar.

Figura 12. Análisis del potencial de reconstitución de células de pacientes con DBA transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** o el vector control *PGK.EGFP.Wpre** trasplantadas en ratones inmunodeficientes NSG:** Nivel de injerto (porcentaje de células hCD45⁺) de las células CD34⁺ de la MO de pacientes con DBA corregidas con los vectores terapéuticos en tres puntos de tiempo diferentes después del trasplante de células (30 días (D30), 60 días (D60) y 90 días (D90)) y determinación del potencial de diferenciación multilineaje de las células injertadas: mieloide (CD33⁺), linfóide (CD19⁺) y CMH (CD34⁺). El grado de significancia se determinó mediante la prueba de Mann Whitney (valor P; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001; **** ≤ 0,0001; ns: no significativo). Los gráficos muestran la media y la desviación estándar. MOCK EGFP:

vector control *PGK.EGFP.Wpre**; PGKCoRPS19: vector *PGK.CoRPS19.Wpre**; EF.CoRPS1:*EF1α(s).CoRPS19.Wpre**.

Figura 13. Cuantificación del número de copias del vector (VCN, del inglés “vector copy number”) el día 90 después del trasplante en células CD34⁺ de pacientes con DBA transducidas con los vectores terapéuticos o un vector control EGFP e injertadas en ratones receptores NSG. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Mann Whitney (valor de $p < 0,05$).

Figura 14. Cuantificación del número de colonias generadas a partir de células CD34⁺ de cordón umbilical de donantes sanos transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** o con el vector control *PGK.EGFP.Wpre**: a) Número de CFU-GMs por cada 10⁵ células MNC sembradas. b) Número de BFU-Es por cada 10⁵ células MNC sembradas. El grado de significancia se determinó mediante la prueba de Mann Whitney (valor P; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$). El gráfico muestra la desviación estándar y media de 5 experimentos. PGK.EGFP: vector control *PGK.EGFP.Wpre**; PGK.CoRPS19: vector *PGK.CoRPS19.Wpre**; EF1α.CoRPS19: vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**.**

Figura 15. Determinación del VCN por célula, porcentaje de transducción y nivel de expresión del transgén *CoRPS19* en colonias y cultivo líquido de células CD34⁺ de donantes sanos transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**, o el vector control *PGK.EGFP.Wpre**: a) Determinación del número de copias del vector (VCN) por célula en colonias y porcentaje de transducción en células CD34⁺. b) Determinación del VCN por célula en cultivo líquido (CL). c) Expresión de *CoRPS19* normalizada para el VCN por célula. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Mann Whitney, la prueba de Mann Whitney (valor p; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,000105$). El gráfico en el panel a) muestra la desviación estándar y media de 5 experimentos, el gráfico en b) de 4 experimentos y el gráfico en c) de 3 experimentos. PGK EGFP: vector de control *PGK.EGFP.Wpre**; PGKCoRPS19: vector *PGK.CoRPS19.Wpre**; EF1α CoRPS1: vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**.**

Figura 16. Curva de crecimiento de células CD34⁺ de cordón umbilical de donantes sanos transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre(s)** y el vector control *PGK.EGFP.Wpre**. El grado de significancia se determinó mediante la prueba de Mann Whitney (valor de $p < 0,05$). El gráfico**

muestra la desviación estándar y media de 5 experimentos (N=5). D: días; PGK EGFP: vector de control *PGK.EGFP.Wpre**; PGK CoRPS19: vector *PGK.CoRPS19.Wpre**; EF CoRPS19: vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**.

- 5 **Figura 17. Análisis del potencial de repoblación y diferenciación de células CD34⁺ de donantes sanos transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** o con el vector de control *PGK.EGFP.Wpre**: a)** El potencial de repoblación se muestra por el porcentaje de células hCD45⁺ en receptores primarios y secundarios. **b)** Distribución de los linajes mieloide (CD33⁺), linfóide (CD19⁺) y de CMH (CD34⁺) en receptores primarios y secundarios. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Mann Whitney (valor P; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001; **** ≤ 0,000105). El gráfico muestra la media y el error estándar de la media de dos experimentos diferentes para analizar la seguridad y toxicidad *in vivo* en los ratones trasplantados después de transducir CD34⁺ de sangre de cordón de donantes sanos. D, días; PGK EGFP: vector control *PGK.EGFP.Wpre**; PGK CoRPS19: vector *PGK.CoRPS19.Wpre**; EF CoRPS19: vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**.

- Figura 18. Cuantificación del VCN en células CD34⁺ donantes sanos transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** o la *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** o el vector control *PGK.EGFP.Wpre** trasplantadas en ratones NSG.** El grado de significancia estadística se determinó mediante la prueba de Mann Whitney (valor p; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001; **** ≤ 0,0001). El gráfico muestra la media y el error estándar de la media de dos experimentos diferentes para analizar la seguridad y toxicidad *in vivo* en los ratones trasplantados después de transducir CD34⁺ de sangre de cordón de donantes sanos. PGK EGFP: vector control *PGK.EGFP.Wpre**; PGK CoRPS19: vector *PGK.CoRPS19.Wpre**; EF CoRPS19: vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**.

- Figura 19. Determinación del peso corporal de ratones NSG trasplantados con células CD34⁺ de donantes sano transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** o con el vector de control *PGK.EGFP.Wpre**.** El grado de significancia estadístico se determinó mediante la prueba de Mann Whitney (valor de p; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001; **** ≤ 0,000105). El gráfico muestra la media y el error estándar de la media de dos experimentos diferentes para analizar la seguridad y toxicidad *in vivo* en los ratones trasplantados después de transducir CD34⁺ de sangre de cordón de donantes sanos. D, días; PGK EGFP: vector de control

*PGK.EGFP.Wpre**; PGKCoRPS19: vector *PGK.CoRPS19.Wpre**; EF CoRPS19: *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** vector .

Figura 20. Determinación de parámetros hematológicos en ratones NSG trasplantados con células CD34⁺ de donantes sanos transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** o el vector de control *PGK.EGFP.Wpre**: a) eritrocitos, b) leucocitos, c) plaquetas y d) neutrófilos.** La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Mann Whitney (valor P; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,000105$). El gráfico muestra la media y el error estándar de la media de dos experimentos diferentes para analizar la seguridad y toxicidad *in vivo* en los ratones trasplantados después de transducir CD34⁺ de sangre de cordón de donantes sanos. D, días; PGK EGFP: vector de control *PGK.EGFP.Wpre**; PGKCoRPS19: vector *PGK.CoRPS19.Wpre**; EF CoRPS19: *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** vector.

15 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

DEFINICIONES GENERALES

Cabe señalar que, tal como se usa en el presente documento, las formas en singular “un”, “uno/a” y “el/la” incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, a menos que se indique lo contrario, el término “al menos” que precede a una serie de elementos debe entenderse como referido a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar, sin más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Tales equivalentes pretenden englobarse en la presente invención.

25

El término “aproximadamente” se usa en el presente documento para significar de manera aproximada, más o menos, alrededor de, o en las regiones de. Cuando el término “aproximadamente” se usa junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo ampliando los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término “aproximadamente” se usa en el presente documento para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor declarado con una variación del 10%, hacia arriba o hacia abajo (mayor o menor).

30

Tal como se usa en el presente documento, el término conjuntivo “y/o” entre múltiples elementos enumerados se entiende como que abarca tanto las opciones individuales como las combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos están unidos por “y/o”, una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad del primer y del segundo elemento juntos. Cualquiera de estas opciones se entiende dentro del significado y, por tanto, satisface el requisito del término “y/o” tal como se usa en el presente documento. También se entiende que la aplicabilidad simultánea de más de una de las opciones está comprendida en el significado y, por tanto, satisface el requisito del término “y/o”.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprender”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Cuando se usa en el presente documento, el término “que comprende” puede sustituirse por el término “que contiene” o “que incluye” o, a veces, por el término “que tiene”. Cualquiera de los términos mencionados (que comprende, que contiene, que incluye, que tiene), siempre que se use en el presente documento en el contexto de un aspecto o una realización de la presente invención, puede sustituirse por el término “que consiste en”, aunque es menos preferido.

Cuando se usa en el presente documento, “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o componente no especificado en el elemento de la reivindicación.

Una proteína o un nucleótido que “consiste esencialmente en” una proteína o un nucleótido es una proteína o un nucleótido que tiene considerablemente la misma secuencia de aminoácidos o nucleótidos que la proteína o el nucleótido especificado.

Una proteína o un nucleótido que tiene “esencialmente la misma secuencia de aminoácidos o nucleótidos” que una proteína o un nucleótido, respectivamente, tiene normalmente más del 90% de identidad de aminoácidos o nucleótidos con esta proteína o este nucleótido. En esta definición se incluyen las sustituciones conservadoras de aminoácidos.

El término “aislado”, para los propósitos de la presente invención, designa un material biológico (célula, polipéptido, polinucleótido, o un fragmento, una variante o un derivado de

los mismos) que se ha retirado de su entorno original (el entorno en el que está presente de manera natural).

Por “enriquecido”, tal como se usa en el presente documento, se entiende que la pureza o el porcentaje de una población específica de células, tales como una célula CD34⁺, se aumenta en al menos el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, el 100% con respecto a las células totales comprendidas en la composición. Los métodos para enriquecer una población específica de células se conocen en la técnica, es decir, mediante el uso de kits específicos que usan selección negativa o positiva.

“Ácidos nucleicos”, “moléculas de ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan de manera intercambiable y se refieren a la forma polimérica de éster de fosfato de los ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; “moléculas de ARN”) o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina o desoxicitidina; “moléculas de ADN”), o a cualquier análogo de fosfoéster de los mismos, tales como los fosforotioatos y los tioésteres, o bien en forma de hélice monocatenaria o bicatenaria. El término molécula de ácido nucleico, y en particular molécula de ADN o ARN, se refiere únicamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a ninguna forma terciaria particular. Por tanto, este término incluye el ADN bicatenario que se encuentra, entre otros, en las moléculas de ADN lineal o circular (por ejemplo, fragmentos de restricción), plásmidos, ADN en superhélice y cromosomas.

Por “con codones optimizados” se entiende en el presente documento potenciar la expresión sustituyendo los codones representados de tipo natural por codones tradicionalmente más estables para maximizar la posibilidad de obtener una proteína funcional y activa.

Una “región codificante” o “secuencia codificante” es una porción de polinucleótido que consiste en codones traducibles en aminoácidos.

Un “promotor”, tal como se usa en el presente documento, abarca una secuencia de ADN que dirige la unión de la ARN polimerasa y fomenta de ese modo la síntesis de ARN, es decir, una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción. Los promotores y la correspondiente expresión de proteínas o polipéptidos pueden ser ubicuos, es decir, activos en una amplia variedad de células, tejidos y especies, o bien específicos del tipo de célula, tejido o especie. La secuencia promotora puede componerse de diferentes fragmentos promotores (o bien

diferentes o bien los mismos fragmentos) que están situados próximos en la secuencia de ADN y pueden estar separados por ligadores o espaciadores. Estos promotores se denominan promotores quiméricos.

- 5 Un “potenciador” (“enhancer” en inglés), tal como se usa en el presente documento, abarca un elemento de acción cis que estimula o inhibe la transcripción de genes adyacentes. Un potenciador que inhibe la transcripción también se denomina “silenciador”. Los potenciadores pueden funcionar (es decir, pueden estar asociados con una secuencia codificante) en cualquier orientación, a distancias de hasta varios pares de kilobases (kb) desde la secuencia
10 codificante y desde una posición en el sentido de 3’ de una región transcrita.

El término “en el sentido de 3’” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se encuentra en 3’ con respecto a una secuencia o secuencias de nucleótidos de referencia. En determinadas realizaciones, las secuencias de nucleótidos en el sentido de 3’ se refieren a las secuencias
15 que siguen al punto de inicio de la transcripción.

El término “en el sentido de 5’” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se encuentra en 5’ con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia. En determinadas realizaciones, las secuencias de nucleótidos “en el sentido de 5’” se refieren a secuencias que se encuentran
20 en la región 5’ de una región de nucleótidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “región reguladora del gen” o “región reguladora” se refiere a las secuencias de nucleótidos situadas en el sentido de 5’ (secuencias en 5’), dentro o en el sentido de 3’ (secuencias en 3’) de una región codificante, y que influyen
25 en la transcripción, el procesamiento del ARN, la estabilidad o la traducción de la región codificante asociada. Las regiones reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líderes de traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitios de procesamiento de ARN, sitios de unión de efectores y estructuras de tallo-bucle. Si una región codificante se destina a la expresión en una célula eucariota, una señal de poliadenilación y
30 una secuencia de terminación de la transcripción se situarán normalmente en 3’ con respecto a la secuencia codificante.

El término “elemento regulador postranscripcional” se refiere a una secuencia de ADN que al transcribirse crea una estructura terciaria que potencia o inhibe la expresión de una proteína.

Las "secuencias de control transcripcional" se refieren a secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, terminadores y similares, que permiten la expresión de una secuencia codificante en una célula huésped.

- 5 Los términos "tratamiento" y "terapia", tal como se usan en la presente solicitud, se refieren a un conjunto de medios higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos y/o físicos usados con la intención de curar y/o aliviar una enfermedad y/o los síntomas con el objetivo de remediar el problema de salud. Los términos "tratamiento" y "terapia" incluyen métodos preventivos y curativos, ya que ambos están dirigidos al mantenimiento y/o restablecimiento de la salud de
- 10 un individuo o animal. Independientemente del origen de los síntomas, de la enfermedad y de la discapacidad, la administración de un medicamento adecuado para aliviar y/o curar un problema de salud debe interpretarse como una forma de tratamiento o terapia en el contexto de esta solicitud.
- 15 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de materia que tiene un efecto terapéutico, y que es capaz de tratar la DBA.

- Los términos "individuo", "paciente" o "sujeto" se usan de manera intercambiable en la presente solicitud y no pretenden ser limitativos en modo alguno. El "individuo", "paciente" o
- 20 "sujeto" puede ser de cualquier edad, sexo y condición física.

- El término "célula huésped", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que se ha transducido, infectado, transfectado o transformado con un vector. El vector puede ser un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Las condiciones de cultivo, tales como
- 25 temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Se apreciará que el término "célula huésped" se refiere a la célula original transducida, infectada, transfectada o transformada y a la progenie de la misma.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" o "diluyente farmacéuticamente aceptable" significa todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica.
- 35 Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas y, sin limitar el alcance de la presente

invencción, incluyen: agentes de tamponamiento adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraiones formadores de sales, tales como sodio, alcoholes polivalentes de azúcares; aminoácidos, tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico y treonina; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcares, tales como lactitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioinisol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitols (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona.

Tal como se usa en el presente documento, la frase “sujeto que lo necesita” incluye sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de una molécula de polinucleótido, un polipéptido o un vector proporcionado en el presente documento, por ejemplo, para corregir un defecto genético, para corregir una función defectuosa de una proteína o para mejorar la homeostasis.

Tal como se usa en el presente documento, el término “optimizado”, con respecto a las secuencias de nucleótidos, se refiere a una secuencia de polinucleótidos que codifica para un polipéptido, en la que la secuencia de polinucleótidos se ha mutado para potenciar una propiedad de esa secuencia de polinucleótidos.

El término “lentivirus” se refiere a un género de retrovirus que pueden infectar y replicarse en células humanas produciendo enfermedades en el ser humano y otras especies de mamíferos. Un “vector” es cualquier vehículo que puede usarse para transportar artificialmente material genético extraño a una célula. Por tanto, un “vector lentiviral” se refiere a un lentivirus recombinante que transporta un polinucleótido a una célula. El término abarca todos los subtipos y las formas tanto naturales como las recombinantes, excepto cuando se requiera lo contrario. El término “LV” es una abreviatura de lentivirus y puede usarse para referirse al propio virus o a derivados del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “gen” o “secuencia codificante” se refiere a una secuencia de nucleótidos *in vitro* o *in vivo* que codifica para un producto génico.

En algunos casos, el gen consiste o consiste esencialmente en la secuencia codificante, es decir, la secuencia que codifica para el producto génico.

Por “unidad transcripcional”, tal como se usa en el presente documento, se entiende la
5 secuencia de nucleótidos comprendida en el vector LV de la presente invención que
comprende desde 5' hasta 3' un promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK, del inglés
“phosphoglycerate kinase promoter”) o un factor de elongación 1 alfa (EF1 α , del inglés
“elongation factor 1 α ”) en su versión corta (EF1 α (s), del inglés “short” o “s”), una secuencia
10 de nucleótidos con codones optimizados que codifica para la proteína RPS19 (CoRPS19), un
elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (Wpre, del inglés
“Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element”), preferiblemente un Wpre
mutado, y al menos una secuencia señal de poliadenilación (PolyA); en la que un promotor de
la fosfoglicerato quinasa (PGK) o un factor de elongación 1 alfa (EF1 α), el Wpre y la secuencia
15 señal de poliadenilación (PolyA) están ligados operativamente y regulan la expresión de
CoRPS19.

DESCRIPCIÓN

Tal como se comentó anteriormente, los pacientes con DBA suelen ser haploinsuficientes para
el gen RPS19. Esto significa que, aunque uno de los alelos del gen RPS19 no está afectado
20 y es funcional, no hay suficiente expresión de la proteína RPS19, lo que finalmente conduce
a ribosomas disfuncionales y al desarrollo de la enfermedad.

En estudios anteriores se ha usado la terapia génica (TG) para intentar corregir la expresión
de la proteína RPS19 mediante el uso de vectores lentivirales (LV) en los que el gen *RPS19*
25 se coloca bajo el control de promotores virales fuertes con el objetivo de obtener mayores
niveles de expresión de la proteína RPS19. Sin embargo, aunque se sabe que los promotores
humanos tales como PGK o EF1 α son más seguros que los promotores virales fuertes, puede
ser que PGK o EF1 α no sean lo suficientemente fuertes como para impulsar la expresión de
una proteína (RPS19) en el contexto de una enfermedad específica (tal como trastornos
30 autosómicos dominantes, es decir, DBA) donde se requieren altas cantidades de dicha
proteína.

Los autores de la presente invención muestran en el presente documento que los vectores
lentivirales que comprenden promotores humanos son capaces de expresar una cantidad
35 suficiente de la proteína RPS19 para corregir la alteración de la biogénesis ribosómica. En

particular, se han desarrollado dos vectores lentivirales de autoinactivación (SIN-LV, del inglés “self-inactivating lentiviral vectors”) con dos promotores humanos diferentes: los promotores de la fosfoglicerato quinasa (PGK) y del factor de elongación 1α en su versión corta (EF1 α (s)). Tal como se muestra en la figura 7, ambos LV fueron capaces de expresar una proteína

5 RPS19 con codones optimizados (denominada CoRPS19) y corregir la alteración de la biogénesis ribosómica de la línea celular K562, cuya expresión del gen RPS19 había sido silenciada por ARN de interferencia. También se demuestra en el presente documento que en células CD34+ de la médula ósea de pacientes deficientes en RPS19, estos vectores LV

10 aumentaron 1,5 y 3,9 veces, respectivamente, en comparación con el grupo de control transducido con un vector no terapéutico que porta el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP), el número de colonias granulomacrofágicas (CFU-GM, del inglés “granulocyte-macrophage progenitor colony forming units”) y eritroides (BFU-Es, del inglés “burst-forming unit-erythroid progenitors”). Por tanto, se descubrió inesperadamente que, aunque el promotor de PGK humana sólo era capaz de aumentar la expresión de RPS19 en 1,5 veces, este

15 aumento resultó ser suficiente para lograr una corrección de la biogénesis ribosómica en un modelo grave de DBA; la línea celular K562, donde la expresión de RPS19 estaba casi completamente anulada.

Además, los vectores terapéuticos revirtieron el defecto de diferenciación eritroide

20 característico de los progenitores eritroides de los pacientes con DBA, aumentando en 2,5 veces la producción de células eritroides maduras CD71+/CD235a+. Asimismo, también se demuestra en el presente documento que la transducción de estos progenitores conservó la capacidad de repoblación de estas células en ratones NSG inmunodeficientes, lo que sugiere que esta capacidad de las células madre hematopoyéticas de los pacientes con DBA no está

25 gravemente afectada. Los estudios de toxicidad demostraron que la sobreexpresión de la versión optimizada del gen RPS19 en células de donantes sanos no era tóxica.

En conclusión, estos resultados abren el camino al uso de estos vectores LV para la terapia de la DBA, ya que demuestran la viabilidad de corregir la deficiencia de expresión de la

30 proteína RPS19 en pacientes que padecen esta enfermedad. En particular, estos resultados muestran el uso potencial del vector lentiviral que expresa la proteína RPS19 bajo el control del promotor de PGK en el tratamiento de la DBA.

Por tanto, en un **primer aspecto**, la presente invención proporciona un vector lentiviral (LV)

35 que comprende un polinucleótido, en el que el polinucleótido se caracteriza porque comprende una unidad transcripcional, en el que la unidad transcripcional se define en el presente

- documento como que comprende, desde 5' hasta 3', un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor de la fosfoglicerato quinasa (denominado a continuación en el presente documento PGK) o un promotor del factor de elongación 1 alfa (denominado a continuación en el presente documento EF1 α), o variantes funcionales de los mismos, una
- 5 secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19 humana, preferiblemente una secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica para la proteína RPS19 humana (denominada a continuación en el presente documento CoRPS19), o una variante funcional de la misma, y un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (denominado a continuación en el presente documento Wpre), preferiblemente un
- 10 Wpre mutado, o una variante funcional del mismo; en el que los promotores de PGK o EF1 α y el Wpre están ligados operativamente a y regulan la expresión de RPS19 o CoRPS19. Se dice que una secuencia codificante y una secuencia de control de la expresión génica están ligadas operativamente cuando están ligadas de tal manera que la expresión o la transcripción y/o traducción de la secuencia codificante están bajo la influencia o el control de la secuencia
- 15 de control de la expresión génica. Por ejemplo, el promotor de PGK o EF1 α y el Wpre están ligados operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína CoRPS19, de modo que los niveles de expresión de CoRPS19 están regulados por uno de los promotores y el Wpre.
- 20 En una realización, el polinucleótido comprendido en el vector LV según el primer aspecto comprende además uno o más elementos de la estructura principal lentiviral, que se definen como polinucleótidos que codifican para las proteínas necesarias para que el LV lleve a cabo su función (infectar la célula e integrarse en el genoma viral para persistir en la célula) y polinucleótidos que codifican para secuencias reguladoras necesarias para que el LV lleve a
- 25 cabo sus funciones.

- Por tanto, el vector LV del primer aspecto comprende un polinucleótido, en el que el polinucleótido se caracteriza porque comprende 1) una unidad transcripcional y 2) uno o más elementos de la estructura principal del vector LV, o una combinación de los mismos. Cada
- 30 uno de estos dos componentes y sus polinucleótidos se caracterizan en detalle a continuación:

1) La unidad transcripcional

- Tal como se definió anteriormente, por unidad transcripcional se hace referencia en el presente documento a la secuencia de polinucleótidos comprendida en el polinucleótido del
- 35 vector LV de la presente invención, que comprende desde 5' hasta 3' un promotor

seleccionado del grupo que consiste en PGK o EF1 α , una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19, preferiblemente CoRPS19, y un elemento Wpre, preferiblemente un Wpre mutado, en el que el promotor de PGK o EF1 α y el Wpre están ligados operativamente a y regulan la expresión de RPS19 o CoRPS19.

5

- *El promotor*

Tal como se indicó anteriormente, el promotor comprendido en la unidad transcripcional se selecciona del grupo que consiste en los promotores de PGK o EF1 α . Dichos promotores conducen la expresión de RPS19, preferiblemente la CoRPS19, después de la integración del
10 genoma del vector lentiviral en las células diana.

En algunas realizaciones, el promotor en el vector lentiviral potencia selectivamente la expresión de la proteína RPS19, preferiblemente CoRPS19, en una célula diana. En algunas realizaciones, la molécula de polinucleótido comprendida en el vector lentiviral se integra de
15 manera estable en el genoma de la célula diana o del tejido diana, por ejemplo, en el genoma de una célula progenitora o célula madre hematopoyética.

En una realización preferida, el promotor comprendido en el polinucleótido del vector lentiviral proporcionado en el presente documento es el promotor de PGK. En una realización, el
20 promotor de PGK es el promotor de PGK humana. Preferiblemente, dicho promotor de PGK comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 10 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 10. En algunas realizaciones, el promotor de PGK
25 comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 10.

En una realización, el promotor comprendido en el polinucleótido del vector lentiviral proporcionado en el presente documento es el promotor de EF1 α . En una realización preferida, el promotor de EF1 α es la versión corta del promotor de EF1 α tal como se describe
30 en Shubhranshu *et al.* 2017 (Shubhranshu *et al.*, Lentiviral Vectors with Cellular Promoters Correct Anemia and Lethal Bone Marrow Failure in a Mouse Model for Diamond-Blackfan Anemia, Molecular Therapy, volumen 25, número 8, 2017, páginas 1805-1814, ISSN 1525-0016, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.04.002>). En una realización, el promotor de EF1 α es el promotor de EF1 α humano. Preferiblemente, dicho promotor de EF1 α corto comprende,
35 consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 11 o una secuencia con una identidad de

secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 11. En algunas realizaciones, el promotor de EF1 α corto comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 11.

5

- *La secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19, preferiblemente una proteína RPS19 con codones optimizados (CoRPS19).*

Los vectores lentivirales proporcionados en el presente documento comprenden en la unidad transcripcional una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19 humana o un fragmento funcional de la misma. Preferiblemente, la unidad transcripcional comprende una versión con codones optimizados del gen RPS19 humano (denominado a continuación en el presente documento CoRPS19). En una realización, el *RPS19* o CoRPS19 está ligado operativamente a al menos una, preferiblemente dos, secuencias de control de la expresión, incluyendo un promotor y un elemento postranscripcional. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un vector lentiviral que comprende una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido con actividad similar a RPS19.

Preferiblemente, dicha secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica para la proteína CoRPS19 comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 12 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 12. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica para la proteína CoRPS19 comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 12.

- • *Elemento regulador postranscripcional del WHV (virus de la hepatitis de marmota) (Wpre)*

Los vectores lentivirales proporcionados en el presente documento también comprenden en la unidad transcripcional al menos un elemento regulador postranscripcional ligado operativamente al nucleótido que codifica para la proteína RPS19, preferiblemente CoRPS19. En una realización, dicho elemento regulador postranscripcional es el elemento regulador postranscripcional del WHV (virus de la hepatitis de marmota, del inglés “Woodchuck hepatitis virus”) (Wpre, del inglés “Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element”). En una realización, el elemento regulador postranscripcional está mutado (también

denominado Wpre*) para aumentar la seguridad del vector. En una realización preferida, el Wpre mutado contiene una mutación en el marco X del gen.

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende el elemento regulador postranscripcional del WHV (virus de la hepatitis de marmota) (Wpre) es el elemento Wpre mutado. Preferiblemente, dicho nucleótido que comprende el Wpre mutado comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 13 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 13. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende el Wpre mutado comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 13.

Debe entenderse que todas las realizaciones descritas anteriormente para los diferentes elementos de la unidad de transcripción (los promotores de PGK o EF1 α , la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19, preferiblemente CoRPS19, y el elemento Wpre, preferiblemente Wpre*) pueden combinarse entre sí.

En una realización preferida, la unidad de transcripción comprendida en el polinucleótido del vector lentiviral consiste en un promotor seleccionado del grupo que consiste en el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) o el promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1 α), una secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica para la proteína RPS19 y un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (Wpre) mutado, en la que los promotores y el elemento Wpre están ligados operativamente a y regulan la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19.

En una realización preferida, la unidad de transcripción comprendida en el polinucleótido del vector lentiviral consiste en un promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) con una identidad de secuencia de al menos el 95% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 10, una secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica para la proteína CoRPS19 con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, con respecto a la longitud completa de SEC ID N°: 12 y un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (Wpre) mutado con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, con respecto a la longitud completa de SEC ID N°: 13, en la que el promotor de PGK y el elemento Wpre mutado están ligados operativamente a y regulan la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína CoRPS19.

En una realización preferida, la unidad de transcripción comprendida en el polinucleótido del vector lentiviral consiste en un promotor del factor de elongación 1 alfa ($EF1\alpha$) con una identidad de secuencia de al menos el 95% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 11, una secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica para la proteína CoRPS19 con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 12 y un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (Wpre) mutado con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 13, en la que el promotor de $EF1\alpha$ y el elemento Wpre mutado están ligados operativamente a y regulan la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína CoRPS19.

2) Elementos de la estructura principal del vector lentiviral

Tal como se definió anteriormente, los elementos de la estructura principal del vector lentiviral se definen como secuencias de polinucleótidos necesarias para que el LV lleve a cabo su función (infectar la célula e integrarse en el genoma viral para persistir en la célula).

Los lentivirus incluyen miembros del grupo de lentivirus bovino, del grupo de lentivirus equino, del grupo de lentivirus felino, del grupo de lentivirus ovinocaprino y del grupo de lentivirus de primates. En algunas realizaciones, el vector de inserción de genes es un lentivirus autolimitante.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral proporcionado en el presente documento es un vector lentiviral de “tercera generación”. Tal como se usa en el presente documento, el término vector lentiviral de “tercera generación” se refiere a un sistema de empaquetamiento lentiviral que tiene las características de un sistema de vector de segunda generación y que además carece de un gen tat funcional, tal como uno en el que el gen tat se ha delecionado o inactivado. Normalmente, el gen que codifica para rev se proporciona en un constructo de expresión independiente. Tal como se usa en el presente documento, un sistema de vector lentiviral de “segunda generación” se refiere a un sistema de empaquetamiento lentiviral que carece de genes auxiliares funcionales, tal como uno del que se han delecionado o inactivado los genes auxiliares vif, vpr, vpu y nef. Tal como se usa en el presente documento, el “sistema de empaquetamiento” se refiere a un conjunto de constructos virales que comprenden genes que codifican para proteínas virales implicadas en el empaquetamiento de un virus recombinante. Normalmente, los constructos del sistema de empaquetamiento se incorporarán en última instancia en una célula de empaquetamiento.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral de tercera generación proporcionado en el presente documento es un vector lentiviral de autoinactivación. En algunas realizaciones, el vector lentiviral es un vector lentiviral de pseudotipo VSV.G.

5

En determinadas realizaciones, el vector lentiviral es un vector de un lentivirus recombinante capaz de infectar células en división y no en división. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral es un vector capaz de infectar células madre hematopoyéticas, células madre hematopoyéticas de larga duración, células madre hematopoyéticas de corta duración, progenitores multipotentes, células hematopoyéticas CD34⁺ y cualquier subpoblación de grupos de diferenciación dentro de la población CD34⁺. El genoma lentiviral y el ADN proviral normalmente tienen los tres genes que se encuentran en los retrovirus: gag, pol y env, que están flanqueados por dos secuencias de repetición terminal larga (LTR). El gen gag codifica para las proteínas estructurales internas (matriz, cápside y nucleocápside); el gen pol codifica para la ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa), una proteasa y una integrasa; y el gen env codifica para las glicoproteínas de la envoltura viral. Las 5' y 3' LTR sirven para fomentar la transcripción y la poliadenilación de los ARN del virión. La LTR contiene todas las demás secuencias de acción cis necesarias para la replicación viral. En algunas realizaciones, los lentivirus tienen genes adicionales, incluyendo vif, vpr, tat, rev, vpu, net y vpx (en el VIH-1, el VIH-2 y/o el VIS).

25

En determinadas realizaciones, un casete de transferencia génica comprende uno o más elementos adicionales, por ejemplo, uno o más elementos seleccionados de los siguientes: 5' LTR, sitio de unión a cebador, tracto central de polipurina con fragmento de ADN, elemento que responde a Rev, secuencias codificantes, tales como secuencias gag truncadas, señales de empaquetamiento, 3' LTR y/o señal de PolyA.

30

Tal como se definió anteriormente, el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende un polinucleótido, en el que el polinucleótido comprende la unidad de transcripción definida anteriormente. En una realización, dicho polinucleótido comprendido en el vector lentiviral comprende además en el sentido de 5', es decir, en la región 5' de la unidad de transcripción definida anteriormente, y en orden desde 5' hasta 3', al menos una o más de las

siguientes secuencias de polinucleótidos: a) una repetición terminal larga en 5' (5' LTR) que a su vez comprende un promotor quimérico de citomegalovirus (CMV), b) un sitio de unión a cebador (PBS), c) una señal psi (Ψ) de empaquetamiento, d) un elemento que responde a Rev (RRE) y e) un tracto central de polipurina con fragmento de ADN (cPPT), o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización, dicho polinucleótido comprendido en el vector lentiviral comprende además en el sentido de 3', es decir, en la región 3' de la unidad transcripcional definida anteriormente, i) una repetición terminal larga (LTR) en 3' y, opcionalmente, j) una secuencia señal de poliadenilación (PolyA) situada después de la 3' LTR. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una delección de la región U3 de la 5' y/o 3' LTR. La delección de la región U3 de la LTR puede ser la delección completa o una delección parcial. La falta de la secuencia U3 de la LTR de tipo natural implica que el constructo del vector lentiviral es independiente de Tat y, por tanto, se producirá en tercera generación.

Debe entenderse que cualquier combinación posible de los nucleótidos a) a e) e i) y j) está comprendida en la presente invención y en combinación con la unidad de transcripción descrita en la sección anterior. Por tanto, el vector lentiviral puede comprender sólo uno, dos, tres o más elementos seleccionados de a) a e) e i) y j) en combinación con la unidad de transcripción definida anteriormente. Cada uno de los nucleótidos a) a e) e i) y j) y sus realizaciones preferidas se definen adicionalmente a continuación.

La secuencia de nucleótidos de 5' LTR es responsable de la transcripción del provirus durante la producción del vector lentiviral. En el constructo de vector lentiviral proporcionado en el presente documento, la 5' LTR comprende o consiste en una forma quimérica del promotor del citomegalovirus (CMV). Además, en el constructo de vector lentiviral proporcionado en el presente documento, la 5' LTR también pueden comprender una parte de la 5' LTR del VIH-1 de tipo natural, denominada RU5. En una realización preferida, la 5' LTR comprende o consiste en una forma quimérica del promotor de CMV y una parte de la 5' LTR del VIH-1 de tipo natural, denominada elemento RU5. El promotor quimérico de CMV conduce la transcripción del provirus durante la producción del vector lentiviral. En una realización, el promotor quimérico de CMV comprende o consiste en un potenciador de CMV (denominado a continuación en el presente documento potenciador de CMV) y un promotor de CMV (denominado a continuación en el presente documento promotor de CMV).

35

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende el potenciador de CMV comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 3 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende el potenciador de CMV comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 3.

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende el promotor de CMV comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 4 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 4. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende el promotor de CMV comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 4.

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende el promotor quimérico de CMV comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 2 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende el promotor quimérico de CMV comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 2.

Tal como se indicó anteriormente, el nucleótido con 5' LTR comprende además una secuencia de nucleótidos que comprende un elemento RU5. Esta secuencia es necesaria para la retrotranscripción e integración del genoma proviral en las células transducidas. En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende el elemento RU5 comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 5 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende el elemento RU5 comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 5.

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende la 5' LTR comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 1 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende la 5' LTR comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 1.

Adyacente a la 5' LTR puede haber secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión a cebador del ARNt) y para la encapsidación eficiente de ARN viral en partículas (el sitio Psi). Las secuencias necesarias para la encapsidación (o el empaquetamiento de ARN retroviral en viriones infecciosos) pueden carecer del genoma viral, el defecto cis evita la encapsidación de ARN genómico. Sin embargo, el mutante resultante sigue pudiendo dirigir la síntesis de todas las proteínas de viriones.

En una realización, en el sentido de 3' de la 5' LTR están las secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma, que son el sitio de unión a cebador de ARNt (denominado a continuación en el presente documento PBS o PBS SL23). Por tanto, en una realización, en el sentido de 3' del nucleótido con 5' LTR está el nucleótido del sitio de unión a cebador SL123. En este elemento PBS, el ARNt se fusiona con el elemento PBS durante la transcripción inversa del genoma proviral después de la transducción de células diana y antes de la integración en el genoma de las células. En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende el PBS SL123 comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 6 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende el PBS SL123 comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 6.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende al menos una señal psi (Ψ) de empaquetamiento, también denominado sitio psi, para la encapsulación eficiente de ARN viral en partículas. La señal psi (Ψ) de empaquetamiento puede estar situada en el sentido de 3' del PBS SL123. En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende la señal psi (Ψ) de empaquetamiento comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 7 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la

longitud completa con SEC ID N°: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende la señal psi (Ψ) de empaquetamiento comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 7.

- 5 El vector lentiviral proporcionado en el presente documento puede contener una señal de empaquetamiento (Ψ), que está implicada en el empaquetamiento del genoma retroviral en la cápside viral, tal como se definió anteriormente. Se pensó que los vectores LV requerían aproximadamente 300 pb del gen Gag en esta región. Actualmente, la secuencia de Gag se ha reducido a tan sólo 40 pb. Por tanto, en una realización, el vector lentiviral proporcionado
- 10 en el presente documento comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína Gag truncada, que está situada en el sentido de 3' de la señal psi (Ψ) de empaquetamiento.

- En una realización, el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende
- 15 además un elemento de respuesta a Rev (denominado a continuación en el presente documento RRE), que se fusionará con esta secuencia en los transcritos de vector lentiviral para ayudar en la exportación nuclear del provirus durante la producción del vector lentiviral. En una realización, el elemento RRE está situado en el sentido de 3' de la señal psi (Ψ) de empaquetamiento. En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende
- 20 el elemento RRE comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 8 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 8. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende el elemento RRE comprende, consiste o consiste
- 25 esencialmente en SEC ID N°: 8.

- En una realización, el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende además un tracto central de polipurina (denominado en el presente documento cPPT), que actúa como cebador para la transcripción de la cadena de ADN positiva durante la transcripción inversa de vectores lentivirales después de la transducción de células diana. El
- 30 cPPT también aumenta la importación nuclear de ADN proviral y, por tanto, la eficacia de transducción de vectores lentivirales. Además, aumenta los títulos de los vectores lentivirales. En una realización, el elemento cPPT está situado en el sentido de 3' del elemento RRE. En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende el elemento cPPT comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 9 o una secuencia con una
- 35 identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%,

el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 9. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende el elemento RRE comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 9.

- 5 Los elementos de la estructura principal definidos anteriormente pueden encontrarse en el sentido de 5' de la unidad de transcripción (es decir, hacia la región 5' del polinucleótido comprendido en el vector lentiviral). Sin embargo, el vector lentiviral proporcionado en el presente documento también puede tener otros elementos de la estructura principal en el sentido de 3' de la unidad de transcripción (es decir, hacia la región 3' del polinucleótido comprendido en el vector lentiviral). En una realización, el polinucleótido comprendido en el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende además una 3' LTR y, opcionalmente, una secuencia señal de poliadenilación (PolyA). La 3' LTR está implicada en la poliadenilación de ARNm durante la producción del vector lentiviral. En una realización, el
- 10
- 15 resultado la inactivación transcripcional de genomas virales que potencialmente pueden empaquetarse en las células transducidas.

- En una realización, la 3' LTR comprende un elemento U3 truncado. En una realización, la 3' LTR comprende los elementos R y U5 del VIH-1 de tipo natural. En una realización, la 3' LTR comprende una secuencia señal de poliadenilación. En una realización preferida, la 3' LTR
- 20
- comprende o consiste en un elemento U3 truncado (denominado a continuación en el presente documento elemento Δ U3) y los elementos R y U5 de VIH-1 de tipo natural (denominados a continuación en el presente documento elemento RU5).

- En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende el elemento Δ U3 comprendido en el nucleótido en 3' LTR comprende, consiste o consiste esencialmente en
- 25
- SEC ID N°: 15 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 15. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende el elemento Δ U3 comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 15.

- 30 En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende el elemento RU5 comprendido en el nucleótido en 3' LTR comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 16 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%,

el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 16. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende el elemento RU5 comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 16.

- 5 En una realización, en el sentido de 3' de la 3' LTR hay una secuencia señal de poliadenilación de SV40 (denominada a continuación en el presente documento PolyA). En una realización, la secuencia señal de PolyA deriva del virus 40 vacuolado de simio. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos que comprende la PolyA situada en el sentido de 3' del nucleótido en 3' LTR comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 33 o una secuencia
- 10 con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 33. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende una PolyA comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 33.

15

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que comprende 3' LTR comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 14 o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud

20 completa con SEC ID N°: 14. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende 3' LTR comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 14.

En una realización preferida adicional, el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende un polinucleótido, en el que el polinucleótido se caracteriza porque comprende desde 5' hasta 3':

- 25 a) una repetición terminal larga en 5' (5' LTR) que a su vez comprende un promotor quimérico de citomegalovirus,
- b) un sitio de unión a cebador (PBS),
- c) una señal psi (Ψ) de empaquetamiento,
- d) un elemento que responde a Rev (RRE),
- 30 e) un tracto central de polipurina con fragmento de ADN (cPPT),
- f) un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) o un promotor corto del factor alfa de elongación 1(EF1 α (s)),
- g) una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19,

- h) un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (Wpre) optimizado mutado,
- i) una repetición terminal larga en 3' (3' LTR),
- en el que las regiones 5' y 3' LTR se han vuelto sustancialmente inactivas transcripcionalmente en virtud de una delección total o parcial en la región U3 de la LTR, y en el que f) y h) están operativamente ligados a y regulan la expresión de g).

En una realización preferida adicional, el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende un polinucleótido, en el que el polinucleótido se caracteriza porque comprende desde 5' hasta 3':

- a) una repetición terminal larga en 5' (5' LTR) que a su vez comprende un promotor quimérico de citomegalovirus,
- b) un sitio de unión a cebador (PBS),
- c) una señal psi (Ψ) de empaquetamiento,
- d) un elemento que responde a Rev (RRE),
- e) un tracto central de polipurina con fragmento de ADN (cPPT),
- f) un promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) humana,
- g) una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19,
- h) un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (Wpre) optimizado mutado,
- i) una repetición terminal larga en 3' (3' LTR),
- en el que las regiones 5' y 3' LTR se han vuelto sustancialmente inactivas transcripcionalmente en virtud de una delección total o parcial en la región U3 de la LTR, y en el que f) y h) están operativamente ligados a y regulan la expresión de g).

En una realización preferida adicional, el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende un polinucleótido, en el que el polinucleótido se caracteriza porque comprende desde 5' hasta 3':

- a) una repetición terminal larga en 5' (5' LTR) que a su vez comprende un promotor quimérico de citomegalovirus,
- b) un sitio de unión a cebador (PBS),
- c) una señal psi (Ψ) de empaquetamiento,
- d) un elemento que responde a Rev (RRE),
- e) un tracto central de polipurina con fragmento de ADN (cPPT),
- f) un promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) humana,
- g) una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19,

- h) un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (Wpre) optimizado mutado,
 - i) una repetición terminal larga en 3' (3' LTR), y
 - j) una secuencia señal de poliadenilación (PolyA),
- 5 en el que las regiones 5' y 3' LTR se han vuelto sustancialmente inactivas transcripcionalmente en virtud de una delección total o parcial en la región U3 de la LTR, y en el que f) y h) están operativamente ligados a y regulan la expresión de g).

En una realización preferida adicional, el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende un polinucleótido, en el que el polinucleótido se caracteriza porque comprende desde 5' hasta 3':

- a) una repetición terminal larga en 5' (5' LTR) que a su vez comprende un promotor quimérico de citomegalovirus en el que la 5' LTR tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 1,
- 15 b) un sitio de unión a cebador (PBS) con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 6,
- c) una señal psi (Ψ) de empaquetamiento con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 7,
- 20 d) un elemento que responde a Rev (RRE) con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 8,
- 25 e) un tracto central de polipurina con fragmento de ADN (cPPT) con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 9,
- f) un promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) humana con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 10,
- 30 g) una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19, preferiblemente una secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica para la proteína CoRPS19 con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 12,
- 35

- h) un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (Wpre) optimizado mutado con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 13, y
- 5 i) una repetición terminal larga en 3' (3' LTR) con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 14,
- en el que las regiones 5' y 3' LTR se han vuelto sustancialmente inactivas transcripcionalmente en virtud de una delección total o parcial en la región U3 de la LTR, y en
- 10 el que f) y h) están operativamente ligados a y regulan la expresión de g).

En una realización preferida adicional, el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende un polinucleótido, en el que el polinucleótido se caracteriza porque comprende desde 5' hasta 3':

- 15 a) una repetición terminal larga en 5' (5' LTR) que a su vez comprende un promotor quimérico de citomegalovirus en el que la 5' LTR tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 1,
- 20 b) un sitio de unión a cebador (PBS) con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 6,
- c) una señal psi de empaquetamiento con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 7,
- 25 d) un elemento que responde a Rev (RRE) con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 8,
- e) un tracto central de polipurina con fragmento de ADN (cPPT) con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el
- 30 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 9,
- f) un promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) humana con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 10,
- 35 g) una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19, preferiblemente una secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica para la proteína CoRPS19 con una identidad de secuencia de al menos el

95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 12,

- 5 h) un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (Wpre) optimizado mutado con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 13,
- i) una repetición terminal larga en 3' (3' LTR) con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 14, y
- 10 j) una secuencia señal de poliadenilación (PolyA) con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, lo más preferiblemente el 100%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 33,

en el que las regiones 5' y 3' LTR se han vuelto sustancialmente inactivas transcripcionalmente en virtud de una delección total o parcial en la región U3 de la LTR, y en el que f) y h) están operativamente ligados a y regulan la expresión de g).

15

Además, tal como reconocerá un experto habitual en la técnica, los casetes de polinucleótidos pueden contener opcionalmente otros elementos, incluyendo, pero sin limitarse a, sitios de restricción para facilitar la clonación y elementos reguladores para un vector de expresión génica particular.

20

En una realización preferida, el polinucleótido de longitud completa comprendido en el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 17 (también denominada en el presente documento secuencia PGK.CoRPS19.Wpre*-LV) o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 17. En una realización preferida, el nucleótido de longitud completa comprendido en el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 17.

25

30

En una realización preferida, el polinucleótido de longitud completa comprendido en el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 18 (también denominada en el presente documento secuencia EF1 α (s).CoRPS19.Wpre*-LV) o una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el

35

96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 18. En una realización preferida, el nucleótido de longitud completa comprendido en el vector lentiviral proporcionado en el presente documento comprende, consiste o consiste esencialmente en SEC ID N°: 18.

- 5 En una realización, el recubrimiento lipídico de la partícula viral puede incluir polipéptidos unidos a la membrana que están presentes previamente en la superficie de la célula huésped.

En una realización, el vector lentiviral según la presente invención o cualquiera de sus realizaciones se usa para transducir células madre hematopoyéticas humanas (HSC), que posteriormente pueden trasplantarse a humanos con DBA. Por tanto, en un **segundo**
10 **aspecto**, la presente invención se refiere a una célula huésped (por ejemplo, una célula hematopoyética CD34⁺) o a una población de células que comprende (por ejemplo, transducido) el vector lentiviral tal como se define en el primer aspecto o en cualquiera de sus realizaciones.

- 15 En otras realizaciones, la célula es una célula que va a administrarse a un sujeto con el fin de proporcionar al sujeto el producto génico codificado por el vector lentiviral del primer aspecto o cualquiera de sus realizaciones. En una realización, el genoma de la célula o células huésped comprende el polinucleótido comprendido en el vector lentiviral del primer aspecto o cualquiera de sus realizaciones, completa o parcialmente. En una realización, el genoma de
20 la célula o células huésped comprende al menos la unidad de transcripción tal como se definió anteriormente. En una realización, la célula o células huésped comprenden en su genoma el polinucleótido del vector lentiviral según el primer aspecto o cualquiera de sus realizaciones, ya sea completa o parcialmente. En determinadas realizaciones, la célula es autóloga del sujeto que va a tratarse o se obtuvo del sujeto que va a tratarse. En otras realizaciones, la
25 célula es alogénica del sujeto que va a tratarse o se obtuvo de un donante distinto del sujeto que va a tratarse. En realizaciones particulares, la célula es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana. En realizaciones particulares, la célula es una célula CD34⁺ obtenida de un sujeto que va a tratarse con la célula después de que sea transducida por un vector de inserción de genes divulgado en el presente documento. En una realización
30 particular, la célula es una célula CD34⁺ obtenida de un sujeto diagnosticado con DBA.

En una realización preferida, las células están enriquecidas en células progenitoras y células madre hematopoyéticas CD34⁺. En una realización preferida, las células están enriquecidas en células progenitoras y células madre hematopoyéticas CD34⁺, en las que enriquecidas

quiere decir que al menos el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 92%, el 94%, el 96%, el 98% o el 100% de las células son CD34⁺. En una realización del segundo aspecto, la célula huésped o la población de células comprende o consiste en una población enriquecida de células hematopoyéticas CD34⁺. En una realización, dicha población

5 enriquecida de células progenitoras y células madre hematopoyéticas CD34⁺ comprende en su genoma el vector lentiviral según el primer aspecto o cualquiera de sus realizaciones.

En otra realización, las células huésped también pueden ser células de empaquetamiento en las que los genes rep y cap de LV se mantienen de manera estable en la célula huésped o

10 células productoras en las que el genoma del vector LV se mantiene de manera estable y se empaqueta. Las células de empaquetamiento y células productoras a modo de ejemplo se derivan de células SF-9, 293, A549 o HeLa. Los vectores LV se purifican y formulan usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. En otra realización, la célula o células huésped se usan para producir el vector viral de inserción de genes.

15 En realizaciones particulares, la célula es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana. En algunas realizaciones, la célula es una célula sanguínea. En algunas realizaciones, la célula es una célula eritroide. En algunas realizaciones, la célula es una célula de médula ósea, por ejemplo, una célula de médula ósea con linaje agotado. En realizaciones

20 particulares, la célula es una célula madre hematopoyética o una célula CD34⁺. En algunas realizaciones, la célula es una célula madre hematopoyética. En algunas realizaciones, la célula preferida es una célula madre hematopoyética CD34⁺. En algunas realizaciones, la célula preferida es una célula progenitora eritroide hematopoyética diferenciada. En una realización del segundo aspecto, la célula huésped o la población de células son células

25 progenitoras y células madre hematopoyéticas CD34⁺. En algunas realizaciones, las células se seleccionan del grupo que consiste en células madre hematopoyéticas, células madre hematopoyéticas de larga duración, células madre hematopoyéticas de corta duración, progenitores multipotentes, células hematopoyéticas CD34⁺ y cualquier subpoblación de grupos de diferenciación dentro de la población CD34⁺. En una realización, las células CD34⁺

30 se obtienen o se extraen de la muestra de médula ósea. En algunas realizaciones, la muestra de médula ósea está agotada de leucocitos CD16⁺. En otra realización, las HSC se obtienen de sangre periférica. En una realización, la muestra de sangre periférica está agotada de eritrocitos. En algunas realizaciones, la muestra de sangre está agotada de leucocitos CD16⁺. Los métodos de selección para las células CD34⁺ pueden ser selección positiva, selección

35 negativa o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la selección puede basarse en la expresión de cualquiera de estos marcadores por separado o en combinación:

CD34⁺, CD59⁺, CD90/Thy1⁺, CD38^{bajo/-}, c-Kit^{/bajo}, CD16⁺ y Lin⁻. En realizaciones particulares, la célula preferida es una célula CD34⁺ obtenida de un sujeto que va a tratarse con la célula después de que sea transducida por un vector de inserción de genes divulgado en el presente documento. En una realización particular, la célula es una célula de DBA CD34⁺ obtenida de

5 un sujeto diagnosticado con DBA. En otra realización, la célula o células huésped pueden ser de líneas celulares establecidas o pueden ser células primarias, en la que “células primarias”, “líneas celulares primarias” y “cultivos primarios” se usan de manera intercambiable en el presente documento o se refieren a células y cultivos celulares que se han derivado de un sujeto y se han dejado crecer *in vitro* durante un número limitado o ilimitado de pases, es

10 decir, división, del cultivo. Por ejemplo, los cultivos primarios son cultivos que pueden haberse hecho pasar 0 veces, 1 vez, 2 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o 15 veces, pero no las suficientes veces van a través de la fase de crisis. Normalmente, las líneas celulares primarias de la presente invención se mantienen durante menos de 10 pases *in vitro*. Las realizaciones de la presente invención comprenden células de mamífero (por ejemplo, células CD34⁺)

15 transducidas con un vector de administración viral, por ejemplo, un vector LV que contiene el gen RPS19 humano, preferiblemente CoRPS19, y preferiblemente bajo el control del promotor de PGK humana.

En determinadas realizaciones, cuando se transduce una célula con el vector divulgado en el presente documento, las células están en contacto con el vector durante aproximadamente

20 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 3,5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 2 horas,

25 aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 60 horas. En algunas realizaciones, las células se transducen durante menos de 60 horas, menos de 48 horas, menos de 36 horas o menos de 24 horas.

30 En un **tercer aspecto**, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende el polinucleótido comprendido en el vector lentiviral tal como se define en el primer aspecto o cualquiera de sus realizaciones.

Composiciones farmacéuticas

35 En un **cuarto aspecto**, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el vector lentiviral tal como se define en el primer aspecto o en cualquiera de sus

realizaciones, la célula huésped o la población de células según el segundo aspecto o cualquiera de sus realizaciones y/o el polinucleótido tal como se define en el tercer aspecto o cualquiera de sus realizaciones, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende o consiste en una población de

5 células que están enriquecidas en células progenitoras y células madre hematopoyéticas CD34⁺ transducidas con el vector lentiviral según el primer aspecto o cualquiera de sus realizaciones, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la célula huésped o la población de células según el segundo

10 aspecto o cualquiera de sus realizaciones, o la composición farmacéutica del cuarto aspecto o cualquiera de sus realizaciones, se ponen en contacto o se transducen con el vector lentiviral según el primer aspecto o cualquiera de sus realizaciones, ya sea *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Preferiblemente, la administración del vector lentiviral es *ex vivo*.

15 Una composición farmacéutica, tal como se describe en el presente documento, también puede contener otras sustancias. Estas sustancias incluyen, pero no se limitan a, crioprotectores, lioprotectores, tensioactivos, agentes de cargas, antioxidantes y agentes estabilizantes. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede estar liofilizada. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende una solución salina.

20 El término "*crioprotector*", tal como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan estabilidad al vector lentiviral contra agresiones inducidas por congelación, excluyéndose preferentemente de la superficie del vector lentiviral. Los crioprotectores también pueden ofrecer protección durante el secado primario y secundario y el

25 almacenamiento a largo plazo del producto. Los ejemplos no limitativos de crioprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol, manosa y lactosa; polímeros, tales como dextrano, hidroxietil-almidón y polietilenglicol; tensioactivos, tales como polisorbatos (por ejemplo, PS-20 o PS-80); y aminoácidos, tales como glicina, arginina, leucina y serina. Generalmente se usa un crioprotector que presenta baja toxicidad en

30 sistemas biológicos.

En una realización, se añade un lioprotector a una composición farmacéutica descrita en el presente documento. El término "*lioprotector*", tal como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan estabilidad al vector lentiviral durante el proceso de secado

35 por pulverización o deshidratación (ciclos de secado por pulverización primario y secundario), proporcionando una matriz vítrea amorfa y uniéndose con la superficie del vector lentiviral a

través de enlaces de hidrógeno, reemplazando las moléculas de agua que se retiran durante el proceso de secado. Esto ayuda a minimizar la degradación del producto durante el ciclo de liofilización y mejorar la estabilidad a largo plazo del producto. Los ejemplos no limitativos de lioprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa o trehalosa; un aminoácido, tal como glutamato de monosodio, histidina o glicina no cristalina; una metilamina, tal como betaína; una sal liotrópica, tal como sulfato de magnesio; un poliol, tal como alcoholes trihidroxilados o de azúcares superiores, por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic; y combinaciones de los mismos. La cantidad de lioprotector añadida a una composición farmacéutica es generalmente una cantidad que no conduce a una cantidad inaceptable de degradación de la cepa cuando se liofiliza la composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, se incluye un agente de carga en la composición farmacéutica. El término “*agente de carga*”, tal como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan la estructura del producto secado por pulverización sin interaccionar directamente con el producto farmacéutico. Además de proporcionar una torta farmacéuticamente elegante, los agentes de carga también pueden conferir cualidades útiles con respecto a modificar la temperatura de colapso, proporcionar una protección frente a la congelación-descongelación y potenciar la estabilidad de la cepa durante el almacenamiento a largo plazo. Los ejemplos no limitativos de agentes de carga incluyen manitol, glicina, lactosa y sacarosa. Los agentes de carga pueden ser cristalinos (tales como glicina, manitol o cloruro de sodio) o amorfos (tales como dextrano, hidroxietil-almidón) y se usan generalmente en las formulaciones en una cantidad de desde el 0,5% hasta el 10%.

También pueden incluirse otros portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) en una composición farmacéutica descrita en el presente documento, siempre que no afecten de manera adversa a las características deseadas de la composición farmacéutica. Tal como se usa en el presente documento, “*portador farmacéuticamente aceptable*” significa todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen: agentes tamponantes adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes

quelantes, tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína);
polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraiones formadores de sales, tales
como sodio, alcoholes polihidroxilados de azúcares; aminoácidos, tales como alanina, glicina,
glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido
5 glutámico y treonina; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcares, tales como lactitol,
estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioininitosa, mioininitol, galactosa,
galactitol, glicerol, ciclitos (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que
contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol,
[alfa]-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tales como
10 albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; y
polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona.

La composición farmacéutica puede prepararse para administración oral, sublingual, bucal,
intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, conjuntival, rectal, transdérmica,
15 intratecal, tópica y/o mediada por inhalación. En una realización preferida, la composición
farmacéutica puede ser una disolución que es adecuada para administración intravenosa,
intramuscular, conjuntival, transdérmica, intraperitoneal y/o subcutánea. En otra realización,
la composición farmacéutica puede ser una disolución que es adecuada para las vías de
administración sublingual, bucal y/o mediada por inhalación. En una realización alternativa, la
20 composición farmacéutica puede ser un gel o una disolución que es adecuado para
administración intratecal. En una realización alternativa, la composición farmacéutica puede
ser un aerosol que es adecuado para administración mediada por inhalación. En una
realización preferida, la composición farmacéutica puede prepararse para administración
intratecal.

25 La composición farmacéutica puede comprender además excipientes y portadores habituales
que se conocen en el estado de la técnica. Para las composiciones farmacéuticas sólidas,
pueden usarse portadores sólidos no tóxicos convencionales, que incluyen, por ejemplo,
calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de
30 sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Para una
disolución para inyección, la composición farmacéutica puede comprender además
crioprotectores, lioprotectores, tensioactivos, agentes de carga, antioxidantes, agentes
estabilizantes y portadores farmacéuticamente aceptables. Para la administración en aerosol,
las composiciones farmacéuticas se suministran generalmente en forma finamente dividida
35 junto con un tensioactivo y propelente. Por supuesto, el tensioactivo no debe ser tóxico, y es
generalmente soluble en el propelente. Representativos de tales agentes son los ésteres o

ésteres parciales de ácidos grasos que contienen desde 6 hasta 22 átomos de carbono, tales como los ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol polihidroxiado alifático o su anhídrido cíclico. Puede emplearse ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. También puede incluirse un portador, según se desee, tal como, por ejemplo, lecitina para administración intranasal. Para los supositorios, las cargas y los portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialcalenglicoles o triglicéridos. En una realización preferida, el portador son nanopartículas. En una realización más preferida, las nanopartículas actúan como vehículo para introducir el polinucleótido comprendido en el vector lentiviral de la presente invención en el interior de la célula.

Por tanto, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otras realizaciones compatibles con las enseñanzas en el presente documento, el vector lentiviral puede administrarse directamente al sitio de la población celular adversa, es decir, a los hepatocitos, aumentando de ese modo la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

El vector lentiviral proporcionado en el presente documento puede administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o estado que necesita tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico). La administración de los vectores lentivirales proporcionados en el presente documento junto con o en combinación con una terapia complementaria significa la administración o aplicación secuencial, simultánea, coextensiva, concurrente, concomitante o contemporánea de la terapia y los polipéptidos divulgados.

Usos médicos y pauta, vía y dosis de administración

En un **quinto aspecto**, la presente invención proporciona el vector lentiviral según el primer aspecto o cualquiera de sus realizaciones, la célula huésped o la población de células según el segundo aspecto o cualquiera de sus realizaciones, el ácido nucleico aislado según el tercer aspecto o cualquiera de sus realizaciones o la composición farmacéutica del cuarto aspecto o cualquiera de sus realizaciones, para su uso como medicamento. En un **sexto aspecto**, la presente invención proporciona el vector lentiviral según el primer aspecto o cualquiera de sus realizaciones, la célula huésped o la población de células según el segundo aspecto o cualquiera de sus realizaciones, el ácido nucleico aislado según el tercer aspecto o cualquiera

de sus realizaciones o la composición farmacéutica del cuarto aspecto o cualquiera de sus realizaciones, para su uso en el tratamiento de anemia de Diamond-Blackfan (DBA), comprendiendo el uso administrar al sujeto dicho vector lentiviral, dicha célula huésped o población de células o dicha composición. En una realización preferida, el vector lentiviral que
5 comprende un nucleótido con una identidad de secuencia de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 17 se usa en el tratamiento de anemia de Diamond-Blackfan (DBA). Por tanto, los métodos y las composiciones de la presente divulgación encuentran uso, por ejemplo, en el tratamiento de
10 anemia de Diamond-Blackfan.

La presente invención también proporciona métodos de tratamiento, prevención o mejora del trastorno DBA en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del vector lentiviral según el primer aspecto o cualquiera de
15 sus realizaciones, la célula huésped o la población de células según el segundo aspecto o cualquiera de sus realizaciones, el ácido nucleico aislado del tercer aspecto o cualquiera de sus realizaciones o la composición farmacéutica del cuarto aspecto o cualquiera de sus realizaciones. En realizaciones particulares, el método se usa para tratar DBA, y el vector viral es un LV que comprende un constructo de expresión divulgado en el presente documento que
20 comprende un promotor de PGK humana ligado operativamente a un ADNc o una secuencia codificante del gen RPS19, y un Wpre mutado divulgado en el presente documento.

En otra realización, la administración de un vector lentiviral, la célula huésped o la población de células o la composición proporcionados en el presente documento no incluye ninguna
25 respuesta inmunitaria en un sujeto o induce una respuesta inmunitaria muy baja en dicho sujeto.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral, la célula huésped o la población de células o la composición de la presente invención se administran como dosis única o múltiples dosis. En
30 algunas realizaciones, el vector lentiviral, la célula huésped o la población de células o la composición de la presente invención se administran en una sola dosis o se dividen en múltiples subdosis, por ejemplo, dos subdosis, tres subdosis, cuatro subdosis, cinco subdosis, seis subdosis o más de seis subdosis. En algunas realizaciones, se administra más de un vector lentiviral. Lo más preferiblemente, el vector lentiviral, la célula huésped o la población
35 de células o la composición de la presente invención se administran como dosis única.

En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral de la presente invención, la célula huésped o la población de células de la presente invención o la composición farmacéutica se administra de forma repetida al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces o al menos diez veces.

El vector lentiviral de la presente invención, la célula huésped o la población de células de la presente invención o la composición farmacéutica pueden administrarse localmente o por vía sistémica. En una realización, la vía de administración de los vectores lentivirales es parenteral. El término parenteral, tal como se usa en el presente documento, incluye administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. En una realización, dicho vector lentiviral puede administrarse por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o a través de cualquier superficie de mucosa, por ejemplo, por vía oral, sublingual, bucal, nasal, rectal, vaginal o pulmonar. Se prefiere la forma intravenosa de administración parenteral. En una realización, una forma de administración sería una disolución para inyección, en particular, para inyección intravenosa o intraarterial o por goteo.

Las dosis eficaces de las composiciones proporcionadas en el presente documento, para el tratamiento de DBA, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del sujeto, si el sujeto es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el sujeto es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos, incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento pueden titularse usando métodos de rutina conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia. En una realización, los sujetos incluyen, pero no se limitan a, individuos con DBA. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto pediátrico, mientras que en otros aspectos, el sujeto es un sujeto adulto.

El vector lentiviral, la célula huésped o la población de células o la composición farmacéutica de la presente invención pueden administrarse de manera continua o en intervalos de tiempo específicos. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, dependiendo del desarrollo de la enfermedad o de los efectos curativos de dicho vector lentiviral. Pueden infundirse células transducidas inmediatamente después de completarse el proceso de transducción. Las cantidades eficaces de la dosis y/o la pauta posológica pueden determinarse fácilmente de manera empírica a partir de ensayos preclínicos, a partir de

ensayos de seguridad y aumento de la dosis e intervalo de dosis, relaciones individuales entre clínico y paciente. Pueden emplearse ensayos *in vitro* o *in vivo* para determinar los intervalos de dosis y/o esquemas óptimos para la administración. Además, las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas dosis-respuesta obtenidas de modelos animales.

5

En una realización preferida, el vector lentiviral de la presente invención, la célula huésped o la población de células de la presente invención o la composición farmacéutica se administra a una dosis de al menos 1×10^9 genomas de vector/kg de peso corporal, preferiblemente 1×10^{10} , 1×10^{11} ó 1×10^{12} genomas de vector/kg de peso corporal. Más preferiblemente, se administran al menos o aproximadamente $4,6 \times 10^{12}$ genomas de vector/kg de peso corporal.

Normalmente, una cantidad eficaz para conseguir un cambio en el paciente con DBA será de aproximadamente 1×10^8 genomas de vector o más, en algunos casos 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} ó 1×10^{13} genomas de vector o más, en determinados casos, 1×10^{14} genomas de vector o más. En algunos casos, la cantidad de genomas de vector que se administra es como máximo de aproximadamente 1×10^{15} genomas de vector, por ejemplo 1×10^{14} genomas de vector o menos, por ejemplo 1×10^{13} , 1×10^{12} , 1×10^{11} , 1×10^{10} ó 1×10^9 genomas de vector o menos, en determinados casos 1×10^8 genomas de vector, y normalmente no menos de 1×10^8 genomas de vector. En algunos casos, la cantidad de genomas de vector que se administra es de 1×10^{10} a 1×10^{11} genomas de vector. En algunos casos, la cantidad de genomas de vector que se administra es de 1×10^{10} a 3×10^{12} genomas de vector. En algunos casos, la cantidad de genomas de vector que se administra es de 1×10^9 a 3×10^{13} genomas de vector. En algunos casos, la cantidad de genomas de vector que se administra es de 1×10^8 a 3×10^{14} genomas de vector.

25

En una realización, el vector lentiviral puede administrarse a una concentración de 10^8 genomas de vector por ml o más, por ejemplo, 5×10^8 genomas de vector por ml; 10^9 genomas de vector por ml; 5×10^9 genomas de vector por ml, 10^{10} genomas de vector por ml, 5×10^{10} genomas de vector por ml; 10^{11} genomas de vector por ml; 5×10^{11} genomas de vector por ml; 10^{12} genomas de vector por ml; 5×10^{12} genomas de vector por ml; 10^{13} genomas de vector por ml; $1,5 \times 10^{13}$ genomas de vector por ml; 3×10^{13} genomas de vector por ml; 5×10^{13} genomas de vector por ml; $7,5 \times 10^{13}$ genomas de vector por ml; 9×10^{13} genomas de vector por ml; 1×10^{14} genomas de vector por ml, 5×10^{14} genomas de vector por ml o más, pero normalmente no más de 1×10^{15} genomas de vector por ml.

35

En algunos casos, el vector lentiviral de la presente invención, la célula huésped o la población de células de la presente invención o la composición farmacéutica que va a administrarse puede medirse usando multiplicidad de infección (MOI). En algunos casos, la MOI puede referirse a la razón, o múltiples genomas de vector o virales con respecto a las células a las que puede administrarse el ácido nucleico. En algunos casos, la MOI puede ser de 1×10^6 . En algunos casos, la MOI puede ser de 1×10^5 - 1×10^7 . En algunos casos, la MOI puede ser de 1×10^4 - 1×10^8 . En algunos casos, los virus recombinantes de la divulgación tiene una MOI de al menos aproximadamente 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} y 1×10^{18} . En algunas realizaciones, el intervalo de MOI es de desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 400. En algunos casos, los virus recombinantes de esta divulgación tienen una MOI de 1×10^8 a 3×10^{14} . En algunos casos, los virus recombinantes de esta divulgación tienen una MOI de como máximo aproximadamente 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} . En algunas realizaciones, la dosis de células que los pacientes reciben por infusión será la que se obtiene a partir del proceso de transducción. En diversas realizaciones preferidas, se infunden al menos aproximadamente 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 o más células CD34⁺/kg de peso del paciente al paciente. En algunas realizaciones, se infunden entre 1×10^6 y 4×10^6 células CD34⁺/kg de peso del paciente al paciente. En otras realizaciones, se infunden entre 3×10^5 y 4×10^6 células CD34⁺/kg de peso del paciente al paciente.

En algunas realizaciones, la cantidad de composición farmacéutica comprende de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{15} virus recombinantes, de aproximadamente de 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{14} virus recombinantes, de aproximadamente 1×10^{10} a aproximadamente 1×10^{13} virus recombinantes o de aproximadamente 1×10^{11} a aproximadamente 3×10^{12} virus recombinantes.

También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén dentro del alcance de la invención.

Con el fin de lograr una terapia génica exitosa en la DBA, es beneficioso extraer del sujeto un número "suficiente" de células madre hematopoyéticas (HSC). En algunas realizaciones de la presente invención, las HSC se obtienen de un sujeto tras la movilización. La movilización puede conseguirse tratando al sujeto con fármacos o compuestos que provocan el movimiento de células madre desde la médula ósea a la sangre. Las células madre pueden extraerse y almacenarse. En algunas realizaciones, la movilización se logra tratando al sujeto con G-CSF

(filgrastim). En otras realizaciones, la movilización se logra tratando al sujeto con plerixafor. En aún otras realizaciones, la movilización se logra tratando al sujeto con una combinación de filgrastim y plerixafor.

5 La dosificación y la frecuencia de administración del vector lentiviral de la presente invención, la célula huésped o la población de células de la presente invención o la composición farmacéutica pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones que contienen el vector lentiviral proporcionado en el presente documento a un sujeto que ya no presenta el estado patológico
10 para potenciar la resistencia por parte del sujeto o minimizar los efectos de la enfermedad. Una cantidad de este tipo se define como "dosis eficaz profiláctica". Una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos sujetos pueden continuar recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas.

15

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos en los que las células están en contacto con el lentivirus, el polinucleótido o la composición según la presente invención. Tal como se indicó anteriormente, el contacto puede producirse *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Además, la presente invención incluye un método para transducir una célula de mamífero, por ejemplo,
20 una célula madre hematopoyética humana u otra célula descrita en el presente documento, que comprende poner en contacto la célula con un vector de inserción de genes, por ejemplo, un vector LV, divulgado en el presente documento o que comprende una unidad de transcripción descrita en el presente documento. En determinadas realizaciones, la célula se obtuvo previamente de un sujeto que va a tratarse, o de otro donante. En realizaciones
25 particulares, al sujeto se le diagnosticó DBA, y la célula se transduce con un LV que comprende un casete de expresión que codifica para el gen RPS19 humano o ADNc de RPS19. Se entiende que los métodos divulgados, por ejemplo, los usados para administrar el producto génico RPS19, por ejemplo, usando una secuencia de ADNc de RPS19, a un sujeto también pueden usarse para tratar la DBA. En realizaciones particulares, las células
30 transducidas son una población de células obtenida de un sujeto con DBA, que va a tratarse con las células una vez que se hayan transducido. Las células pueden obtenerse de médula ósea o sangre. En determinadas realizaciones, el sujeto con DBA se trata con agentes para movilizar las células madre, luego se extrae sangre del sujeto, se retiran los eritrocitos y se seleccionan las células CD34⁺. Tras la selección, a continuación se transducen las células.
35 En realizaciones particulares, las células transducidas se almacenan o congelan antes de su uso, mientras que en determinadas realizaciones, se proporcionan al sujeto inmediatamente

o poco después de que se hayan transducido, por ejemplo, en el plazo de una hora, dos horas o cuatro horas.

Otras realizaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica con la consideración de la memoria descriptiva y la práctica de la invención divulgada en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren únicamente a modo de ejemplo, indicándose un alcance y espíritu verdaderos de la invención mediante las reivindicaciones adjuntas.

10 EJEMPLOS

EJEMPLO 1- Materiales y Métodos

1. Construcción de vectores lentivirales

Se han desarrollado dos vectores lentivirales (LV, del inglés "lentiviral vector (LV)") terapéuticos adecuados para uso clínico en pacientes con haploinsuficiencia en el gen *RPS19*. Estos dos vectores llevan la versión con codones optimizados del gen *RPS19* humano (mutado en el 25% de los pacientes con DBA). En estos LV, la expresión de *RPS19* es dirigida por el promotor de la fosfoglicerato quinasa humana (*PGK*) en el LV *PGK.CoRPS19.Wpre**, o por la versión corta del promotor del factor de elongación humano-1 α (EF-1alpha short o EF-1 α (s); en el LV *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre**. Además, ambos vectores albergan una secuencia *Wpre* mutada (*Wpre**) que aumenta la producción de la proteína de interés al actuar estabilizando el ARNm de la misma (Ver **Figura 1**).

La razón por la que se eligieron dos promotores diferentes fue la intensidad con la que fueron capaces de dirigir la expresión del transgén de interés. Por un lado, tenemos el promotor PGK que muestra una expresión suave y estable del gen de interés. En segundo lugar, se eligió el promotor EF1 α por su mayor actividad.

Estos vectores son vectores lentivirales auto-inactivantes. Se generaron a partir de un vector lentiviral desarrollado en nuestro laboratorio, que lleva una versión optimizada de codones del gen *PKLR*, y se desarrollaron a su vez a partir del vector *pCCL.sin.ppt.hPGK.EGFPY.Wpre**, construido y proporcionado por el laboratorio del Dr. Naldini. (HSRTIGET, San Raffaele Telethon Institute o Gene Therapy y Vita Salute San Raffaele University Medical School, Milán, Italia). Este vector portaba el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK). El primer paso en el desarrollo del vector terapéutico *PGK.CoRPS19.Wpre** consistió en extraer el gen *PKLR* y

la introducción de una versión optimizada del gen *RPS19*, utilizando las dianas de restricción XbaI y Sall, que se introdujeron mediante síntesis química durante el diseño en la secuencia del transgén de interés.

El segundo vector lentiviral terapéutico (*EF1α(s).CoRPS19.Wpre** LV) tiene como elemento diferencial el promotor del Factor de Elongación Alfa humano (EF1α) en su versión corta (EF1α(s)). En este caso, para reemplazar el promotor PGK por el EF1α(s), la secuencia del promotor EF1α(s) se amplificó mediante PCR usando *p'HR.EF1αS.eGFP.Wpre* como vector plantilla (proporcionado por el laboratorio del Dr. Adrian Trasher; UCL Great Ormond Street Institute Of Child Health). Para introducir las secuencias dianas de las enzimas de restricción EcoRV y Sall en la secuencia obtenida con el promotor EF1α(s), se incluyeron estas secuencias dianas junto con dos bases nucleotídicas (EcoRV-AT y -TC-Sall) en los extremos 3' y 5' de los oligos usados. El fragmento obtenido se aisló y clonó utilizando el sistema Zero Blunt® TOPO® Cloning Kit. Una vez clonado el promotor EF1α (s), se aisló utilizando las dianas de las enzimas de restricción EcoRV y Sall, y se clonó en el backbone citado extrayendo previamente el promotor PGK del esqueleto del primer vector terapéutico, generando así el segundo vector lentiviral terapéutico *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**.

Por lo tanto, en un aspecto de la presente invención, se propone un enfoque de terapia génica para tratar DBA que consiste en células autólogas enriquecidas en CD34⁺ transducidas con un vector lentiviral autoinactivante que contiene la secuencia de codones optimizada para el gen *RPS19* (*CoRPS19*).

1) Los vectores lentivirales autoinactivantes (SIN-LV, del inglés “self-inactivating lentiviral vectors”) proporcionan una expresión más robusta y son menos susceptibles al silenciamiento transcripcional que los vectores gammaretrovirales (Pfeifer et al. 2002). También muestran un perfil de integración mucho más seguro (Mitchell et al. 2004; Schroder et al. 2002; Wu et al. 2003) y debido a la delección de 400 pares de bases (pb) que llevan en la secuencia 3' LTR (Miyoshi et al. 1998), la expresión del transgén está regulada por promotores internos, lo que aumenta la seguridad de la modificación genética basada en LV.

2) La secuencia del vector también incluye varias modificaciones para mejorar la expresión del transgén y la seguridad en las células diana:

- El promotor de fosfoglicerato quinasa humana (PGK), ya caracterizado por su expresión estable y a largo plazo *in vivo* después de la reinfusión de las CMH corregidas en pacientes y sus propiedades de seguridad mejoradas en comparación con otros promotores utilizados en terapia génica (Biffi et al. 2013; Modlich et al. 2009; Montini et al. 2006) . El

promotor PGK conduce a una expresión más fisiológica del transgén y una menor susceptibilidad al silenciamiento transcripcional (Garcon et al. 2013; Zychlinski et al. 2008).

- Una versión de codones optimizada de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína RPS19 (CoRPS19) para aumentar la estabilidad del ARNm tras la transcripción. Para la optimización se ha utilizado el software GeneScript®, aumentando el contenido de GC y eliminando sitios de empalme críticos con el fin de evitar el silenciamiento transcripcional y por tanto aumentar la expresión transgénica. La secuencia optimizada de CoRPS19 tiene un 81% de homología con el gen RPS19 humano, sin cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína.
- También se incluye un elemento regulador postranscripcional mutado del virus de la hepatitis de la marmota (*Wpre**), que carece de cualquier marco de lectura abierto residual, para mejorar el nivel de expresión y dar estabilidad al gen terapéutico.

1. 1 Secuencias:

1.1.1 Secuencias de elementos

5 ' LTR o repetición terminal larga (del inglés "Long Terminal Repeat") (SEC ID N°: 1):

es responsable de la transcripción de provirus durante la producción del vector lentiviral. En esta construcción de vector lentiviral, el 5 ' LTR está compuesto por una forma quimérica del promotor de CMV y una parte del 5' LTR, RU5 de VIH-1 de tipo salvaje . La falta de secuencia U3 de LTR 5 ' de tipo salvaje implica que esta construcción de vector lentiviral es independiente de Tat y, por lo tanto, se producirá en tercera generación.

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC
ATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCA
25 ACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGG
ACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA
TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG
CCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTAC
GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTG
30 ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTT
TGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCGCCCCATTGA
CGCAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGT
GAACCGGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAG

GGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGC
CCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGG
AAAATCTCTAGCAG

- 5 - **Promotor CMV quimérico (SEC ID N°: 2):** esta secuencia lidera la transcripción del provirus durante la producción del vector lentiviral. Está compuesta por dos secuencias diferentes, una con actividad potenciadora y otra con actividad promotora.

10 GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAG
 CCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC
 CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG
 CCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCAC
 TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC
 GGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACT
 TGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAG
15 TACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA CTACGCGGATTTC AAGTCTCCACCC
 CATTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG
 TCGTAACA ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAG
 GTCTATATAAGCAGAGCT

- 20 ○ **Potenciador de CMV (SEC ID N°: 3):**

25 GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT
 AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
 TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG
 GTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAA
 ACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG
 ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTAT
 GGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG

- 30 ○ **Promotor de CMV (SEC ID N°: 4):**

 GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA CTACGCGG
 GGATTTC AAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAA

ATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGG
GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT

- **RU5: LTR 5' truncado sin RU3 (SEC ID N°: 5).** Esta secuencia es necesaria para la retrotranscripción y la integración del genoma proviral en células transducidas.

5

**GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA
ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC
CGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTG
GAAAATCTCTAGCAG**

10 **PBS SL123 (sitio de unión del cebador, del inglés “Primer Binding Site”) (SEC ID N°: 6):**

El ARNt se fusiona con el elemento PBS durante la transcripción inversa del genoma proviral después de la transducción de la célula diana y antes de la integración en el genoma celular.

TGGCGCCCGAACAGGGAC

15 **Ψ (señal de empaquetamiento) (SEC ID N°: 7):** Este elemento es responsable de la dimerización y empaquetamiento de las partículas del vector lentiviral.

CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGG
CGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGT
GCGAGAGCGTC

20 **RRE (elemento de respuesta a Rev, del inglés “Rev-responsive element”) (SEC ID N°: 8):** Rev se fusionará con esta secuencia en la transcripción del vector lentiviral para ayudar a la exportación nuclear del provirus durante la producción de estos LVs.

25 AGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCA
ATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGACGAGCAGAGAACA
TTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCA
AGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT

cPPT (tracto central de polipurina, del inglés “central polypurin tract”) (SEC ID N°: 9): este elemento actúa como un cebador para la transcripción de la cadena de ADN positiva durante la transcripción inversa de vectores lentivirales después de la transducción en las

células diana. También aumenta la importación nuclear de ADN proviral y, por lo tanto, la eficacia de la transducción del vector lentiviral. Además, aumenta los títulos de los vectores lentivirales.

TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATA
5 ATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTT

1.1.2. Promotores internos eucarióticos (uno u otro):

- Promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK) del inglés “phosphoglycerate kinase”
(SEC ID N°: 10):

GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTGCAGGGACGCGGCTG
10 CTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACGCAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCACATTCTTC
ACGTCCGTTTCGAGCGTCACCCGGATCTTCGCCGCTACCCTTGTGGGCCCCCGGCGA
CGCTTCCTGCTCCGCCCCTAAGTCGGGAAGGTTCTTGCGGTTTCGCGGCGTGCCGGAC
GTGACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAGCGCCAGGG
AGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCAATAGCGGCTGCTCAGCAGG
15 GCGCGCCGAGAGCAGCGGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGGGCG
GTAGTGTGGGCCCTGTTCTGCCGCGCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGC
GCACGTCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCCAG

- Promotor del factor de elongación alpha 1 en su versión corta 1 (EF1 α (s), del inglés
“Elongation factor Alpha 1”) (SEC ID N°: 11):

20 ATCATGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGA
AGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAA
ACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC
GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAA
CACAGGTGTCGTGACGCTCG

25 Versión optimizada de codones de RPS19 (CoRPS19) (SEC ID N°: 12):

ATGCCCGGCGTGACCGTGAAGGACGTGAACCAGCAGGAGTTCGTGAGGGCCCTGGCA
GCCTTTCTGAAGAAGAGCGGCAAGCTGAAGGTGCCCGAGTGGGTGGACACAGTGAAG
CTGGCCAAGCACAAGGAGCTGGCCCCTTACGATGAGAACTGGTTCTATACCAGGGCAG

CCTCCACAGCAAGGCACCTGTACCTGAGGGGAGGAGCAGGAGTGGGCTCTATGACCAA
 GATCTATGGCGGCAGGCAGCGCAATGGCGTGATGCCATCTCACTTTAGCCGGGGCAGC
 AAGTCCGTGGCAAGGAGAGTGCTGCAGGCCCTGGAGGGCCTGAAGATGGTGGAGAAG
 GACCAGGATGGCGGCAGAAAGCTGACACCACAGGGACAGCGGGACCTGGATAGAATC
 5 GCAGGACAGGTGGCAGCAGCCAATAAGAAGCACTGATAG

Wpre mutado (WHV (virus de la hepatitis de la marmota, del inglés “woodchuck hepatitis virus”) elemento regulador postranscripcional, del inglés “post-transcriptional regulatory element”) (Wpre *) (SEC ID N°: 13): aumenta la expresión del transgén en las células transducidas debido a las mejoras en la poliadenilación, la exportación de ARN de los núcleos y la síntesis de proteínas. Contiene una mutación en el marco del gen X para aumentar la seguridad.

CGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTCTTGATTTGGGTATACAT
 TTAAATGTAAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTAGGGATATGTAATTA
 CTAGTTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTAAAGAACTTTCCCGTTATTTACGCT
 15 CTGTTCTGTAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAA
 CTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTATT
 GCTTCCCGTACGGCTTTTCGTTTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTAT
 GAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACG
 CAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTTCGCT
 20 TTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGA
 CAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAG

3' LTR: DR3RU5 (SEC ID N°: 14): 3' LTR está implicado en la poliadenilación de ARNm durante la producción de vectores lentivirales. En este caso, 3' LTR está compuesto por un elemento U3 truncado y los elementos R y U5 del VIH-1 de tipo salvaje, siendo un vector lentiviral autoinactivante. El genoma viral integrado contendrá una delección en la región promotora viral (U3), lo que dará como resultado la inactivación transcripcional de genomas virales potencialmente empaquetables en las células transducidas.

TGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTAAGTGGTCT
CTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTG
 30 **CTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTG**
 TGAAGTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA

- ΔU3 (SEC ID N°: 15):

TGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGACTG

- RU5 (SEC ID N°: 16):

GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACC

5 CACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTG
TTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCT
AGCAG

SV40 secuencia señal de poliadenilación (PolyA) (SEC ID N°: 33) :

AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAA
10 ATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA

1.1.3 Secuencia completa FASTA del vector

A) PGK.CoRPS19.Wpre* - Secuencia del LV (SEC ID N°: 17):

GTGTTTAAACCTAGATATTGATAGTCTGATCGGTCAACGTATAATCGAGTCCTAGCTTTT
GCAAACATCTATCAAGAGACAGGATCAGCAGGAGGCTTTCGCATGATTGAACAAGATGG
15 ATTGCACGCAGGTTCTCCGGCGGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCA
CAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGTC
CGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCA
GCGCGGCTATCGTGGCTGGCGACGACGGGCGTTCTTGC GCGGCTGTGCTCGACGTT
GTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTC
20 CTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCG
GCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCCGACCACCAAGCGAAACATCGCATC
GAGCGAGCACGTA CTGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAG
AGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGTCTATGCCCG
ACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCACGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGA
25 AAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGTCTGGGTGTGGCGGACCGCTAT
CAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTG
ACCGCTTCCTTGTGCTTTACGGTATCGCCGCGCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTAT
CGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGACCGATTCTAGGTGCATTGGCGCAGAAAAAATGCC
TGATGCGACGCTGCGCGTCTTATACTCCACATATGCCAGATTAGCAACGGATACGGC

TTCCCCAACTTGCCCACTTCCATACGTGTCCTCCTTACCAGAAATTTATCCTTAACGATC
GGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC
CTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGAT
TTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGA
5 CCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATC
AAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAA
CCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAA
GGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGT
TAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTG
10 TTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGAC
GATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGC
CCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA
AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGT
CGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGT
15 CCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
GCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCT
GGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTA
CCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
20 GGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGA
GCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTAT
GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACA
GCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTG
GAGCTGCAAGCTTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATT
25 GGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT
CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGG
TAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGAC
GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTT
ACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA
30 TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG
GACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCT
CCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAA
AATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGA
35 GGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTG
AGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGC

CTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCC
CTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTG
AAAGCGAAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGC
GCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTACTAGCG
5 GAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTA
GATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTA
CATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGA
AACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGAT
CAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGA
10 TAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGT
AAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGG
GACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTA
GCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGACAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAG
GAGCTTTGTTCTTGCGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAAT
15 GACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATT
TGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAA
GCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTG
GGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAG
TTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACA
20 GAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGC
AAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGT
TTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGT
AGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTC
ACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGA
25 ATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGAT
CTCGACGGTATCGGTTAACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGG
GGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAAT
TACAAAAATTCAAAATTTTATCGATCACGAGACTAGCCTCGAGAAGCTTGATATCGAATT
CCACGGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTGCAGGGACGCG
30 GCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACGCAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCACAT
TCTTCACGTCCGTTTCGACGCTCACCCGGATCTTCGCCGCTACCCTTGTGGGCCCCC
GGCGACGCTTCCTGCTCCGCCCTAAGTCGGGAAGGTTCTTGCGGTTGCGGCGTG
CCGGACGTGACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAGCG
CCAGGGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCAATAGCGGCTGCTC
35 AGCAGGGCGCGCCGAGAGCAGCGGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGT
GGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCTGCCCGCGCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCT

CCGGAGCGCACGTGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCC
AGGGGGATCCGTCGACACACCGGTATGCCCCGGCGTGACCGTGAAGGACGTGAACCAG
CAGGAGTTCGTGAGGGCCCTGGCAGCCTTTCTGAAGAAGAGCGGCAAGCTGAAGGTG
CCCCAGTGGGTGGACACAGTGAAGCTGGCCAAGCACAAAGGAGCTGGCCCCCTTACGAT
5 GAGAACTGGTTCTATACCAGGGCAGCCTCCACAGCAAGGCACCTGTACCTGAGGGGAG
GAGCAGGAGTGGGCTCTATGACCAAGATCTATGGCGGCAGGCAGCGCAATGGCGTGAT
GCCATCTCACTTTAGCCGGGGCAGCAAGTCCGTGGCAAGGAGAGTGCTGCAGGCCCT
GGAGGGCCTGAAGATGGTGGAGAAGGACCAGGATGGCGGCAGAAAGCTGACACCACA
GGGACAGCGGGACCTGGATAGAATCGCAGGACAGGTGGCAGCAGCCAATAAGAAGCA
10 CTGATAGGATCCCATCTAGAGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGAGCATCTTACCGC
CATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAA
CAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTATAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTAT
TGCCACAAGACAAACATGTTAAGAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCCTGTTAATC
AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAGATTGACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTT
15 TACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGC
TTTCGTTTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCC
CGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGC
TGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCGAT
CGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTT
20 GCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGGGCCTGCTGCCGGCTCTGCG
GCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCC
TCCCCGCCTGGAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTA
GATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAACG
AAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCT
25 GGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA
GTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAG
ACCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAG
TATTTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAACTTGTTTATTGCAGCT
TATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCAC
30 TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCT
ATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTC
CGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGG
CCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGG
CCTAGGGACGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCG
35 TCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCA
GCACATCCCCCTTTCCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTT

CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAG
CGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC
GCCCCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCCGTC
AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGAC
5 CCCAAAAAATTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGT
TTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGG
AACAACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCG
GCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATCG
TTCCCTCAGGACGTC

10 **B) *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** - Secuencia del LV (SEC ID N°: 18)**

GTGTTTAAACCTAGATATTGATAGTCTGATCGGTCAACGTATAATCGAGTCCTAGCTTTT
GCAAACATCTATCAAGAGACAGGATCAGCAGGAGGCTTTGCGATGATTGAACAAGATGG
ATTGCACGCAGGTTCTCCGGCGGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCA
CAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGTC
15 CGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCA
GCGCGGCTATCGTGGCTGGCGACGACGGGCGTTCTTGCGCGGCTGTGCTCGACGTT
GTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTC
CTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCG
GCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTGACCAAGCGAAACATCGCATC
20 GAGCGAGCACGTA CTGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAG
AGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGTCTATGCCCG
ACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCACGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGA
AAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGTCTGGGTGTGGCGGACCGCTAT
CAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTG
25 ACCGCTTCCTTGCTTTACGGTATCGCCGCGCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTAT
CGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGACCGATTCTAGGTGCATTGGCGCAGAAAAAATGCC
TGATGCGACGCTGCGCGTCTTATACTCCACATATGCCAGATTCAGCAACGGATACGGC
TTCCCCAACTTGCCCACTTCATACGTGTCCTCCTTACCAGAAATTTATCCTTAACGATC
GGACGGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC
30 CTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGAT
TTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA
CCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATC
AAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAA
CCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAA

GGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGT
TAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTG
TTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGA CTCAAGAC
GATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGC
5 CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA
AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGT
CGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGT
CCTGTCTGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCT
10 GGCTTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTA
CCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
GGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGA
GCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTAT
15 GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACA
GCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTG
GAGCTGCAAGCTTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATT
GGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT
CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGG
20 TAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGAC
GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTT
ACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA
TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG
GACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG
25 TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCT
CCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAA
AATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGA
GGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTG
AGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGC
30 CTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCC
CTCAGACCTTTTTAGTCAGTGTGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTG
AAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGC
GCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTACTAGCG
GAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTA
35 GATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTA
CATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTAGA

AACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGAT
CAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGA
TAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGT
AAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGG
5 GACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTA
GCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAG
GAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAAT
GACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATT
TGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAA
10 GCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTG
GGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAGAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGAATGCTAG
TTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACA
GAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGC
AAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGT
15 TTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGT
AGGTTTAAGAATAGTTTTTGGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTC
ACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGA
ATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGAT
CTCGACGGTATCGGTAACTTTTAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGG
20 GGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAAT
TACAAAAATTCAAAATTTTATCGATCACGAGACTAGCCTCGAGAAGCTTGATATCATGGC
TCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGG
GGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAA
AGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAA
25 GTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGT
GTCGTGACGCTCGTCGACACACCGGTATGCCCGGCGTGACCGTGAAGGACGTGAACC
AGCAGGAGTTCGTGAGGGCCCTGGCAGCCTTTCTGAAGAAGAGCGGCAAGCTGAAGGT
GCCCCGAGTGGGTGGACACAGTGAAGCTGGCCAAGCACAAGGAGCTGGCCCCCTTACGA
TGAGAACTGGTTCTATACCAGGGCAGCCTCCACAGCAAGGCACCTGTACCTGAGGGGA
30 GGAGCAGGAGTGGGCTCTATGACCAAGATCTATGGCGGCAGGCAGCGCAATGGCGTG
ATGCCATCTCACTTTAGCCGGGGCAGCAAGTCCGTGGCAAGGAGAGTGCTGCAGGCCC
TGGAGGGCCTGAAGATGGTGGAGAAGGACCAGGATGGCGGCAGAAAGCTGACACCAC
AGGGACAGCGGGACCTGGATAGAATCGCAGGACAGGTGGCAGCAGCCAATAAGAAGC
ACTGATAGGATCCCATCTAGAGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTGAGCATCTTACCG
35 CCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAA
ACAAAATGGTGGGGCAATCATTTTACATTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTA

TTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCCTGTTAATC
AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACATGTTGCTCCTTT
TACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGC
TTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCC
5 CGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGC
TGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCGAT
CGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTT
GCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTGCGGGGAAGGGCCTGCTGCCGGCTCTGCG
GCCTCTTCGCGCTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCC
10 TCCCCGCCTGGAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTA
GATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAACG
AAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCT
GGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA
GTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAG
15 ACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAG
TATTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAACTTGTTTATTGCAGCT
TATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTAC
TGCACTTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCT
ATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTC
20 CGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGG
CCGAGGCCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGG
CCTAGGGACGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCG
TCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCA
GCACATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTT
25 CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAG
CGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC
GCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCCGTC
AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGAC
CCCCAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGT
30 TTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGG
AACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCG
GCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATCG
TTCCCTCAGGACGTC

2. Producción de los vectores lentivirales

Los lentivirus se produjeron utilizando plásmidos de tercera generación y la línea celular HEK293T como células de empaquetamiento. Las producciones se llevaron a cabo en placas de 150 mm (p150, Corning) a una confluencia celular del 60-70% y transfectando los diferentes plásmidos requeridos con el método de precipitación de ADN con CaCl₂.

- 5 Los plásmidos utilizados fueron amablemente proporcionados por el Dr. L. Naldini (HSR-TIGET, Milán, Italia) y producidos por Plasmid Factory. Los plásmidos utilizados fueron: plasmido de transferencia (transgén de interés; 37 µg / p150), plásmido rev (pRSV-REV; 9 µg / p150), plásmido gag y pol (pMDLg / pRRE; 23,5 µg / p150) y plásmido de la envuelta VSV (pMD2-VSVG ; 12,3 µg / p150). Los plásmidos se mezclaron con 457 µl / p150 de CaCl₂ 2,5
- 10 M y 3,2 ml / p150 de agua. Posteriormente, se añadieron gota a gota a la mezcla (3,6 ml / p150) de HBS 2x (NaCl 281 mM, HEPES 100 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, pH 7) para generar precipitados de Ca²⁺ / ADN y esta solución se añadió a los cultivos de células HEK293T.

- Después de 5-6 horas, se retiró el medio y se añadió medio de recogida (IMDM complementado con HyClone al 5%). El sobrenadante se recogió 48 horas después de la
- 15 transfección, se centrifugó (450 g, 7 minutos) y se filtró (0,22 µm, PES, Merck) para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se concentró mediante ultracentrifugación (70000g, 2 horas, 20°C; Ultracentrífuga Optima L-100 XP, Beckman-Coulter) utilizando tubos "ultraclean" (Beckman-Coulter). El sedimento viral se reconstituyó en 100-300 µl de solución salina (NaCl al 0,9%).

20 3. Titulación de los vectores lentivirales

- La titulación del vector lentiviral *PGK.CoRPS19.Wpre** se realizó en HEK293T. Para la titulación del LV, se sembraron 5x10⁴ células en placas de 24 pocillos. Veinticuatro horas después de la siembra, las células se transdujeron con diluciones seriadas del LV en medio de cultivo y se determinó el número de células en el día 0. 14 días después de la transducción,
- 25 se recolectaron las células y se extrajo el ADN genómico (ADNg) usando el kit NucleoSpin® Tissue (Macherey Nagel®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El número de copias del genoma del vector lentiviral (VCN; del inglés "vector copy number") integrados en células transducidas se determinó mediante qPCR. Para analizar las copias del genoma del vector lentiviral utilizamos cebadores ((SEC ID N°19)

- 30 Fw: 5'-CAGGACTCGGCTTGCTGAAG-3'; (SEC ID N°: 20) Rv: 5'-TCCCCGCTTAATACTGACG-3' y una sonda (SEC ID N°: 21) 5'-CGCACGGCAAGAGGCGAGG-3' (Taqman®, Thermo Fisher Scientific) diseñado en la

secuencia ψ del vector lentiviral. Para determinar la cantidad de ADN endógeno utilizamos cebadores ((SEC ID N°: 22) Fw: 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTG-3' ; (SEC ID N°: 23) Rv: 5'-ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC-3') y una sonda ((SEC ID N°: 24) 5'-CCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCC-3') (Taqman®, Thermo Fisher Scientific) contra el gen de la albúmina humana. También utilizamos una curva estándar para determinar el número de copias de la secuencia específica ψ del LV y el número de genomas diploides por muestra, lo que nos permite calcular el número de copias del LV por célula (**VCN = número de copias de ψ / número de diploides genomas**). Finalmente, a partir de este parámetro se calculó el título del LV, definido como el número de partículas virales por mililitro, con la siguiente fórmula:

$$Title (UT/mL) = \frac{number\ of\ cells\ at\ day\ 0 \cdot VCN\ per\ diploid\ genome}{LV\ volume\ (mL)}$$

Se realizó una curva estándar para extrapolar los datos de qPCR usando diluciones en serie de un fragmento de ADN que contiene la secuencia ψ y una secuencia de albúmina humana. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®).

4. Animales experimentales

Se trasplantaron células CD34⁺ humanas en ratones Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) inmunodeficientes diabéticos no obesos (NOD, del inglés "non-obese diabetic"). Esta cepa NSG porta dos mutaciones en el fondo genético NOD/ShiLtJ: una que causa una inmunodeficiencia combinada grave (scid) y otra que induce una ausencia completa de la cadena gamma común del receptor de la interleuquina 2, IL2 (IL2rgnull). La mutación scid tiene lugar en el gen *Prkdc*, que codifica un complejo de reparación del ADN y origina una deficiencia en las células B y T. La mutación IL2rgnull previene la señalización de citoquinas a través de múltiples receptores, lo que provoca una deficiencia de la función de las células NK. La inmunodeficiencia grave permite que los ratones se humanicen mediante el injerto de células CD34⁺ humanas, xenoinjertos derivados de pacientes o células madre y tejidos adultos.

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa europea y española en la materia: Convenio europeo ETS 123, relativo al uso y protección de mamíferos vertebrados utilizados en experimentación y otros fines científicos, Directiva

2010/63/UE y Ley española 6/2013 y Real Decreto (RD) 53/2013 relativo a la protección y uso de animales en la investigación científica.

5. *Procedimientos con animales*

Los procedimientos que involucraron Organismos Genéticamente Modificados se llevaron a
5 cabo de acuerdo con la normativa europea y española correspondiente: Directiva 2009/41/CE,
Ley 9/2003 y RD 178/2004. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de
Experimentación Animal del CIEMAT de acuerdo con todas las pautas externas e internas de
bioseguridad y bioética, y previamente autorizados por el Gobierno de España (Código
PROEX # 070-15 # Terapia celular y génica en enfermedades raras con inestabilidad
10 cromosómica).

Los ratones se alojaron y se criaron en el Centro de Animales de Laboratorio del CIEMAT
(número de registro ES280790000183), donde se les realizó un cribado rutinario de patógenos
de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Española de Ciencia Animal de
Laboratorio (SECAL) y la Federación Europea de Asociaciones de Ciencia Animal de
15 Laboratorio (FELASA, Tomworth, Reino Unido) y confirmando la ausencia de patógenos.

A los ratones se les proporcionó alimento (TEKLAD Global Diet 2918, irradiado con rayos
gamma de 25 KGy) y agua (acidificada y esterilizada en autoclave) ad libitum, en condiciones
ambientales controladas. Los ratones fueron alojados durante los protocolos experimentales
en jaulas tipo ILL con microaisladores ventilados individualmente con 25 cambios de jaula de
20 aire por hora. Se alojó un máximo de 6 ratones en cada jaula. La iluminación de la habitación
se controló con ciclos de luz/oscuridad de 13/11 horas, y la temperatura y la humedad se
regularon a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y $55 \pm 10\%$, respectivamente. Filtros de aire HEPA estaban presentes
en todas las habitaciones.

Los ratones se mantuvieron bajo dieta estándar (agua y comida *ad libitum*) y todos los
25 protocolos se realizaron siguiendo las leyes y normativas europeas y españolas (Convención
europea ETS123 sobre el uso y protección de mamíferos vertebrados utilizados en
experimentación y otros fines científicos y la ley española RD 53/2013).

6. *Muestras humanas de donantes sanos y pacientes DBA*

Las muestras humanas utilizadas en los resultados presentados fueron sangre periférica y
30 médula ósea, tanto de donantes sanos como de pacientes con DBA, así como sangre de
cordón umbilical de donantes sanos recogidas bajo consentimiento informado.

Todas las muestras se han utilizado en el contexto del proyecto "Estudios preclínicos para demostrar la eficacia y la seguridad de un enfoque de terapia génica *ex vivo* en la anemia de Diamond Blackfan con vectores lentivirales", financiado por el CIBERER-ISCIII-Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras y que fue aprobado por el comité de
5 ética de la Fundación Jiménez Díaz el 8 de mayo de 2018. Esta evaluación señala que:

- El estudio cumple los requisitos establecidos en la legislación vigente (Real Decreto 1090/2015 y Decreto 39/94 de la CAM).
- Cumple con los estándares éticos estándar de la institución en este tipo de estudios.
- Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración
10 de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

Los análisis hematológicos de muestras de pacientes con DBA y donantes sanos se realizaron en el analizador de hematología Sysmex XN-1000™ (Sysmex, Kobe, Japón) a partir de 120 µl de sangre periférica o médula ósea en modo predilución.

7. Determinación de VCN en ratones inyectados con LV

- 15 Después del sacrificio de los animales, se recogieron diferentes tejidos (hígado, bazo, pulmones, médula ósea, ganglios linfáticos, cerebro, testículos, páncreas y riñones) y se conservaron a -80°C. Para la determinación del número de copias del provirus integrado en estos tejidos, se extrajo el ADN genómico con el NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 20 El número de copias de vectores lentivirales integradas (VCN, del inglés "vector copy number") se determinó mediante qPCR en los tejidos de ratones trasplantados. Para analizar el número de copias de LV utilizamos cebadores ((SEC ID N°: 25) Fw: 5'-CAGGACTCGGCTTGCTGAAG-3'; (SEC ID N°: 26) Rv: 5'-TCCCCGCTTAATACTGACG-3') y una sonda ((SEC ID N°: 27) 5'-CGCACGGCAAGAGGCGAGG-3') (Taqman®, Thermo Fisher
25 Scientific) diseñados en la secuencia ψ del vector lentiviral. Para determinar la cantidad de ADN endógeno utilizamos cebadores ((SEC ID N°: 28) Fw: 5'-AAAACGAGCAGTGACGTGAGC-3'; (SEC ID N°: 29) Rv: 5'-TTCAGTCATGCTGCTAGCGC-3') y una sonda ((SEC ID N°: 30) 5'-TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC-3') contra el gen de *titina* de ratón. Una vez determinado el número de copias del LV y el número de genomas
30 diploides por muestra, se calculó el VCN con la siguiente fórmula: **VCN = número de copias de ψ / número de genomas diploides.**

Para el cálculo del VCN se realizó una curva estándar usando diluciones seriadas de un fragmento de ADN que contiene ψ y las secuencias de *titina*. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®).

8. Determinación de la expresión de *CoRPS19*

- 5 La determinación de la expresión del transgén *CoRPS19* integrado por los vectores terapéuticos, así como su versión fisiológica no optimizada *RPS19*, se realizó mediante Q-PCR. El ARN se extrajo de las células utilizando el kit RNeasy Tissue (Qiagen GMBH) y el proceso de transcripción inversa se llevó a cabo utilizando el kit Superscript Vilo (Invitrogen SuperScript IV VILO Master Mix, ThermoFisher). Una vez que se obtuvo el ADNc, se realizó
- 10 el análisis de expresión con un sistema de PCR en tiempo real 7500 (ThermoFisher Scientific). Para el cálculo de la expresión del gen endógeno *RPS19*, así como la versión *CoRPS19* optimizado, se usó una variación del método de cuantificación relativa de Livak ($2^{-\Delta C_t}$) 209. Para ello se calculó inicialmente la eficiencia de amplificación de los genes de interés (*hRPS19* y *CoRPS19*) y el gen de referencia *hGAPDH*. Una vez que se ha asumido una eficiencia del
- 15 100% en la amplificación, la expresión relativa del gen de interés se normaliza con un gen de referencia, en este caso *GAPDH* mediante la fórmula:

$$\text{Expresión relativa de } RPS19 = 2^{(CT_{GAPDH}) - (CT_{RPS19})}$$

$$\text{Expresión relativa de } CoRPS19 = 2^{(CT_{GAPDH}) - (CT_{RPS19})}$$

Cebador / Sonda		Secuencia	Tm (°C)
Cebadores	<i>h GAPDH</i> Fw	GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC	60
	<i>h GAPDH</i> Rv	ACGACCAAATCCGTTGACTC	60
	<i>RPS19</i> Fw	AGCCGAGGCTCCAAGAGT	57,3
	<i>RPS19</i> Rv	CCCTGAGGTGTCAGTTTGC	59,25
	<i>CoRPS19</i> Fw	GTGAACCAGCAGGAGTTCGT	73,9
	<i>CoRPS19</i> Rv	TCAGCTTGCCGCTCTTCT	75,7
Sondas		SYBER Verde	

- 20 **Tabla 1.** Secuencias de los cebadores y sondas utilizadas para la detección de la expresión del transgén *CoRPS19* y su versión salvaje *RPS19*.

9. Northern blot y análisis de extensión de cebadores del procesamiento de pre-rRNA.

5 μ g de ARN total extraído con el reactivo TRI (Invitrogen) se resolvió en un gel de agarosa desnaturalizante y se procesó para transferencia mediante *Northern*. Las transferencias mediante *Northern blot* se expusieron a placas de imagen Fuji (Fujifilm) y la cuantificación se realizó en un *phosphorimager* (FLA-7000; Fujifilm) utilizando el software MultiGauge (Fujifilm, v 3.1).

10. Citometría de flujo

10.1 Caracterización hematopoyética de pacientes con DBA

10 El inmunofenotipo de pacientes con DBA y donantes sanos se analizó mediante citometría de flujo utilizando seis paneles diferentes, especificados en la Tabla 2. Se agregaron anticuerpos que se muestran en la Tabla 2, se incubaron durante 30 minutos a 4°C y luego se lavaron con PBA (PBS con 0,2% de azida sódica, Merck, y 1% de BSA, Sigma). Para el panel 1 y 2, las muestras de sangre periférica se diluyeron previamente en PBA en proporciones de 1:400 y
15 1:10, respectivamente. Después de la incubación del anticuerpo, se realizó una etapa de lisis con tampón de cloruro de amonio (NH_4Cl 0,155M, KHCO_3 0,01M, EDTA 0,1mM; incubación de 10 min a temperatura ambiente) en los paneles 3, 4, 5 y 6 para eliminar la fracción eritroide. Se añadió DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) hasta una concentración final de 1 μ g/ml para identificar las células muertas. Los eventos se adquirieron y registraron con un Fortessa LSR
20 (BD Biosciences) y los datos de citometría se analizaron con el software FlowJo (BD, Becton, Dickinson & Company).

Panel	Epítipo	Fluorocromo	Clon	Proveedor	Catálogo	V _{final} (μL)	V _{ab} /V _{final}
1: progenitos eritroides	CD71	PE	YDJ.1.2.2	Beckman Coulter	IM2001U	50	2,5
	CD235a	FITC	11E4B-7-6	Beckman Coulter	B49206		5
2: Megacariocitos y plaquetas	CD41a	PE	B61391	BD Pharimigen	555472	50	5
	CD42b	FITC	4336556	Beckman Coulter	A07781		5
3: progenitores hematopoyéticos	CD34	PE	8G12	BD Pharimigen	345802	100	4
	CD38	FITC	T16	Immunotech	IM0775		4
	CD45	APC	2D1	Biolegend	368512		5
4: población linfoide	CD3	APC	UCHT1	BioLegend	300439	100	2
	CD4	PE	13B8.2	Beckman Coulter	A07751		2
	CD8	FITC	B9.11	Beckman Coulter	A07756		2
5: población mieloide	CD3	APC	UCHT1	BioLegend	300439	100	2
	CD14	BV711	M5E2	Biolegend	301837		1
	CD15	PE	VIMC6	Miltenyi Biotec	130-091-375		2
	CD19	PECy7	SL25C1	eBiosciencia	25-0198-42		1,5

Tabla 2. Panel de anticuerpos utilizados para el inmunofenotipo de pacientes con DBA y donantes sanos.

5 10.2 Análisis multistem

La determinación de los diferentes progenitores hematopoyéticos en médula ósea de pacientes DBA y donantes sanos se realizó mediante citometría de flujo utilizando la combinación de anticuerpos reflejada en la Tabla 3. El protocolo de marcaje fue similar al utilizado en la determinación del inmunofenotipo de muestras de pacientes y donantes sanos adquiridos con Fortessa RSL (BD Biosciences). El número mínimo de células analizadas fueron 1×10^6 para la evaluación correcta de los diferentes análisis. Los resultados de la citometría se analizaron mediante el software FlowJo (BD, Becton, Dickinson & Company).

ANTICUERPOS												
TUBO #	CD155 BV421 2 µl	CD49f BV510 2 µl	HECA452 BV605 2 µl	CD135 BV711 2 µl	CD10 FITC 2 µl	PI (20µg/ml)	CD38 PECy5.5	CD7 PE (h14)	CD34 PECY7	CD90 APC (h164)	CD45RA APCe	
1: CD155	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	
2: CD49f	----	2 µl	----	----	----	----	----	----	----	----	----	
3: HECA452	----	----	2 µl	----	----	----	----	----	----	----	----	
4: CD135	----	----	----	2 µl	----	----	----	----	----	----	----	
5: CD10	----	----	----	----	2 µl	PI	----	----	----	----	----	
6: PI	----	----	----	----	----	PI	1,5 µl	----	----	----	----	
7: CD38	----	----	----	----	----	----	1,5 µl	----	----	----	----	
8: CD7	----	----	----	----	----	----	----	2 µl	1,5 µl	----	----	
9: CD34	----	----	----	----	----	----	----	----	1,5 µl	----	----	
10: CD90	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1,5 µl	----	
11: CD45RA	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1,5 µl	
12: CD155	----	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	PI	1,5 µl	2 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	
13: CD49f	2 µl	----	2 µl	2 µl	2 µl	PI	1,5 µl	2 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	
14: HECA452	2 µl	2 µl	----	2 µl	2 µl	PI	1,5 µl	2 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	
15: CD135	2 µl	2 µl	2 µl	----	2 µl	PI	1,5 µl	2 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	
16: CD10	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	----	PI	1,5 µl	2 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	
17: PI	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	----	1,5 µl	2 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	
18: CD38	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	PI	----	2 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	
19: CD7	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	PI	1,5 µl	----	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	
20: CD34	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	PI	1,5 µl	2 µl	----	1,5 µl	1,5 µl	
21: CD90	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	PI	1,5 µl	2 µl	1,5 µl	----	1,5 µl	
22: CD45RA	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	PI	1,5 µl	2 µl	1,5 µl	1,5 µl	----	
23A: MUESTRA	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	PI	1,5 µl	2 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	
23B: MUESTRA	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	PI	2,5 µl	3 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	

Tabla 3. Panel de anticuerpos utilizados para la determinación de progenitores hematopoyéticos en médula ósea.

10.3 Inmunofenotipo de diferenciación eritroide

- 5 El inmunofenotipo de los progenitores hematopoyéticos diferenciados hacia el linaje eritroide se analizó mediante citometría de flujo utilizando la combinación de anticuerpos especificada en la Tabla 4.

Panel	Epítipo	Fluorocromo	Clon	Casa comercial	Catálogo N°	Vanticuerpo/100µl (µl)
1	CD36	PE	CB38 (NL07)	BD Pharmigen	555455	1
	CD45	APCCy7	HI30	Biolegend	304014	1
	CD71	PECy5	M-A712	BD Pharmigen	551143	1
	CD235a	PECy7	HI264	Biolegend	34111	1

- 10 **Tabla 4.** Panel de anticuerpos utilizados para el inmunofenotipo de células diferenciadas hacia el linaje eritroide.

Las células se diluyeron hasta un volumen final de 100 µl, se marcaron durante 30 minutos a 4°C y se lavaron con PBA. Se añadió DAPI (concentración final de 1 µg / ml) y los eventos se registraron con un citometro Fortessa LSR (BD Biosciences). Los resultados fueron analizados con el software FlowJo (BD Biosciences).

15 11. Cultivos de líneas celulares

La línea celular K562 (leucemia mielógena crónica; ATCC: CCL-243) se cultivó en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; Gibco), HyClone (10%; GE Healthcare) y penicilina / estreptomycin (1%; Gibco). Las células se mantuvieron a una concentración de 1×10^5 - 1×10^6 células / ml.

- 20 La línea celular HEK293T (línea celular de riñón embrionario humano competente para replicar vectores que llevan el antígeno T de SV40; ATCC: CRL-3219) se cultivó en medio de

Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; Gibco), HyClone (10%; GE Healthcare) y penicilina / estreptomycin (1%; Gibco). Las células se mantuvieron a una concentración de 5×10^5 células / ml.

- Las condiciones de incubación fueron las mismas para todas las líneas celulares utilizadas:
- 5 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

12. Ensayos funcionales de progenitores hematopoyéticos y células madre hematopoyéticas

- Se obtuvieron células CD34⁺ de muestras de sangre periférica y médula ósea de pacientes con DBA y donantes sanos para estudios de caracterización y corrección lentiviral, y de sangre
- 10 de cordón umbilical de donantes sanos para estudios de seguridad. Primero, la sangre total o la médula ósea se sometieron a un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, la banda de células mononucleadas se recogió y se lavó con PBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, Sigma), denominada en el presente documento PBE; Hyclone 2%, GE
- 15 Healthcare; EDTA 2 mM. Una vez obtenida la banda de células mononucleadas, se separó la fracción de células CD34⁺ utilizando el kit comercial de Microbeads CD34⁺ (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), junto con las columnas y el separador magnético QuadroMACS y OctoMACS (Miltenyi Biotec). Una vez obtenidas las células CD34⁺, se realizó un análisis de citometría de flujo para determinar la pureza de la muestra. Para ello, se recogió
- 20 una alícuota y se marcó con un anticuerpo anti-CD34 PE durante 30 minutos a 4° C, se lavó con PBA y se analizó el porcentaje de células CD34⁺ con un Fortessa LSR (BD Biosciences) y se analizaron los datos de la citometría con el software FlowJo (BD, Becton, Dickinson & Company).

- Las células se cultivaron en medio StemSpan (StemCell Technologies) o medio X-VIVO 20
- 25 (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con GlutaMAX™ al 1% (Gibco), P/S al 1% (Gibco), 100 ng/ml de hSCF y hFlt3, 20 ng/ml de hTPO y hIL3 (todas EuroBioSciences GmbH) en condiciones hipóxicas (37° C, 5% O₂, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa).

- Los progenitores hematopoyéticos humanos se diferenciaron hacia el linaje eritroide utilizando tres medios diferentes (Figura 11). El primer medio (día 1-7) se basó en StemSpan SFEM I
- 30 (Stem Cell Technologies) suplementado con hSCF (50 ng/ml; EuroBioSciences), ligando hFlt3 (16,7 ng/ml; EuroBioSciences), proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4, 6,7 ng/ml; Peprotech), interleucina 3 humana (hIL-3, 6,7 ng/ml; EuroBioSciences), interleucina 11 humana (hIL-11, 6,7 ng/ml; EuroBioSciences) y eritropoyetina humana (h-EPO, 1,3 U/ml; Amgen). El día 7 de

expansión, las células se transfirieron al segundo medio compuesto de IMDM (medio de Dulbecco modificado de Iscove) suplementado con glutamina (suplementado con IMDM GlutaMAX; Gibco) y enriquecido con BSA (1%; Sigma), insulina (0,01 mg/ml; Sigma), transferrina humana (0,2 mg/ml; Sigma), β -mercaptoetanol (91 μ M; Gibco), penicilina /
5 estreptomicina (1%; Gibco), mezcla de lípidos 1 (1x; Sigma), etanolamina (0,004%, Sigma), hSCF (5 ng/ml; EuroBioSciences), hIL-3 (6,7 ng/ml; EuroBioSciences), hIL-11 (6,7 ng/ml; EuroBioSciences), hEPO (1, 3 U/ml; Amgen), insulina -como factor de crecimiento-1 (IGF-1, 20 ng/ml; PeproTech) e hidrocortisona (1 μ M; Sigma) y se cultivaron hasta el día 14. Después del día 14 y durante 2 días, las células se transfirieron al tercer medio que también contenía
10 medio IMDM GlutaMAX (Gibco) suplementado con BSA (1%; Sigma), insulina (0.01 mg/mlmg/ml; Sigma), transferrina humana (0.2 mg/ml; Sigma), β -mercaptoetanol (91 μ M; Gibco), penicilina / estreptomicina (1%; Gibco), mezcla de lípidos 1 (1x; Sigma), etanolamina (0,004%; Sigma) y hEPO (10 U/ml Amgen).

Todos los medios se filtraron a través de filtros de 0,22 μ m antes de su uso. El conteo y
15 análisis por citometría de flujo de células se realizó en los días 3, 5, 7, 10 y 14. Durante la diferenciación eritroide, las células se mantuvieron a una concentración de entre 4×10^5 y 4×10^6 células/ml. Las condiciones de incubación eran también 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

El número de progenitores hematopoyéticos en sangre periférica y médula ósea en pacientes
20 con DBA se evaluó de acuerdo con el siguiente protocolo: se resuspendieron células hematopoyéticas mononucleares y / o células CD34⁺ en medio X-vivo y se sembraron en medio semisólido de metilcelulosa (StemMACS™ HSC-CFU suplementado con suero de ternera fetal al 30%, BSA al 1%, glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 nM, 50 ng/ml de SCF, 20 ng/ml de GM-CSF, 20 ng/ml de G-CSF, 20 ng/ml de IL-3, 20 ng/ml de IL-6, 3 U/ml de EPO;
25 Miltenyi) a una concentración de 3×10^5 células nucleadas /ml en el caso de la sangre periférica y 5×10^4 células nucleadas/ml en el caso de la médula ósea en placas de cultivo de 25 mm². Se hicieron triplicados para cada muestra usando 1 ml para cada réplica. Después de 14 días de incubación en hipoxia (37°C, 5% de O₂ y 5% de CO₂, 98% de humedad relativa) se contaron las colonias formadas usando un microscopio invertido Nikon ELWD 0.3 de contraste de fase.
30 Los resultados se expresaron como la media del número total de colonias por cada 10^5 células sembradas.

13. Trasplante de células hematopoyéticas humanas en ratones NSG

La fracción de células mononucleares se obtuvo de la médula ósea de pacientes con DBA y donantes sanos y se separó por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE

Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el caso de los ensayos de seguridad, las células mononucleadas se obtuvieron a partir de sangre de cordón umbilical utilizando el mismo proceso. La fracción CD34⁺ se obtuvo mediante separación inmunomagnética utilizando el kit comercial Microbeads CD34⁺ (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), junto con las columnas y el separador magnético QuadroMACS y OctoMACS (Miltenyi Biotec). Antes del injerto, los ratones NSG se irradiaron con una dosis submieloablativa (1,5 Gy) y se trasplantaron con 2x10⁵ células CD34⁺ purificadas de ratón. Se analizó el injerto hematopoyético en sangre periférica y médula ósea de los ratones NSG a los días 30, 60 y 90 y en el caso de las pruebas de seguridad hasta el día 120 post-infusión por citometría de flujo. Para evaluar el nivel de injerto hematopoyético humano, las células fueron recogidas por aspiración femoral de la médula ósea a las 4, 8 y 12 semanas después del trasplante y marcado con el anticuerpo hCD45 APC-Cy7 (eBioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los análisis de injertos multilínea se realizaron utilizando CD45 APC-Cy7 (BioLegend), CD34 APC (BD Biosciences), CD33 PE (BD Biosciences), CD19 PE-Cy7 y CD3 FITC (BioLegend), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron isotipos de fluorocromo pareados como controles. Se excluyeron del análisis las células positivas 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en el Fortessa LSR (BD Biosciences) y se analizaron con el software FlowJo v7.6.5. Para realizar el trasplante secundario, los receptores primarios de NSG fueron anestesiados y se les extrajo sangre para obtener los resultados hematológicos. Una vez anestesiados, se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajeron los fémures y tibias de las patas traseras de cada ratón. La médula ósea de los fémures y tibias se obtuvo perfundiendo cada hueso. Una vez que se obtuvieron las células de la médula ósea, las células CD45⁺ humanas se seleccionaron mediante separación celular por citometría de flujo. Una vez purificadas, las células se trasplantaron de nuevo a ratones NSG inmunodeficientes irradiados con 1,5 Gy. Los análisis se realizaron a los 30, 60, 90 y 120 días postrasplante.

14. Análisis del sitio de integración (ISA, del inglés “integration site analysis”)

El análisis de estas integraciones se realizó tanto en las células expandidas *in vitro* durante 14 días, como en las células injertadas en receptores NSG primarios y secundarios de ambos experimentos. Los análisis se realizaron en colaboración con la empresa Genewerk. La técnica utilizada por Genewerk se basa en S-EPTS / LM-PCR (PCR mediada por ligación de selección de primera etiqueta de extensión de cizallamiento), que amplifica y secuencia regiones desconocidas que flanquean el ADN del vector integrado. Las muestras de ADN se fragmentan mediante sonicación en fragmentos de 500 pares de bases, luego se amplifican

mediante PCR utilizando cebadores biotinilados específicos para las secuencias LTR del vector integrado. Después de la amplificación, los productos biotinilados se purifican, los productos se ligan en casetes que incluyen marcadores moleculares (código de barras) y se someten a un segundo paso de amplificación por PCR con cebadores que permiten la
5 secuenciación mediante tecnología MiSeq (Illumina, Thermofisher). Para el análisis de sitios de integración, se utilizaron los 10 sitios de integración más frecuentes.

15. *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism, versión 7.0 para Windows. Se realizaron estudios estadísticos previos para comprobar si los datos seguían una distribución
10 normal mediante el análisis estadístico de columnas y aplicando el test de normalidad de D'Agostino & Pearson, el test de normalidad de Shapiro-Wilk y el test de normalidad KS. Una vez estudiada la distribución en los diferentes análisis, se aplicó la prueba más adecuada siendo la prueba estadística de Mann-Whitney, la prueba t de Student y la prueba ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

15 Los resultados se describen en los ejemplos 2-4 a continuación.

EJEMPLO 2: Caracterización de las poblaciones de células madre hematopoyéticas (CMH) de médula ósea de pacientes con DBA

Con el fin de determinar hasta qué punto el fallo de médula ósea presente en los pacientes con DBA podía limitar la colecta de células madre hematopoyéticas (CMH), necesaria para
20 llevar a cabo un protocolo de terapia génica *ex vivo*, como ocurre por ejemplo en otro fallo de médula ósea como es la anemia de Fanconi (FA, del inglés "Fanconi anemia"), el primer objetivo fue conocer el contenido de CMH en los pacientes con DBA caracterizando muestras de médula ósea (MO) de estos pacientes y comparándolas con donantes sanos y con pacientes con FA.

25 2.1 Determinación del número de células CD34⁺ en la médula ósea de pacientes con DBA.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que los niveles de células CD34⁺, así como la población más primitiva de progenitores CD34⁺/CD38⁻, no se encontraban reducidos en muestras de médula ósea de pacientes con DBA, cuando se comparó con muestras de donantes sanos. Estos resultados (Ver **Figura 2**) muestran que, al contrario de lo que ocurre
30 en otras enfermedades, como en FA, donde los pacientes presentan una marcada caída en

el número de células CD34⁺, la obtención de números clínicamente relevantes de CMH en pacientes con DBA no constituirían una limitación para su uso en un ensayo de terapia génica.

2.2 Análisis de progenitores hematopoyéticos multilinaje CD34⁺ en la médula ósea de pacientes con DBA.

- 5 Aunque la población de CMH no parecía verse afectada, varios estudios han descrito un número reducido de progenitores eritroides en pacientes con DBA, e incluso en algunos casos neutropenia y trombocitopenia durante el curso de la enfermedad (Giri et al.2000; Santucci et al. 1999; Tsai, Arkin y Lipton 1989). Para estudiar más a fondo los progenitores hematopoyéticos en pacientes con DBA, se analizaron las poblaciones de precursores
- 10 hematopoyéticos intermedios (Doulatov et al. 2012). Nuestros resultados mostraron que no existía reducción significativa en ninguno de estas poblaciones de progenitores (véase la **Figura 3: a)** HSC (del inglés “hematopoietic stem cells”: células madre hematopoyéticas; Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻), **b)** MPP (del inglés “multipotent progenitors”, progenitores multipotentes: CD34⁺CD38⁻Thy-1⁻CD45RA⁻Flt3⁺CD7⁻CD10⁻), **c)** MLP (del inglés “multilymphoid progenitors”, progenitores multilinfoides; CD34⁺CD38⁻Thy1^{bajo}CD45RA⁻Flt3⁺CD7^{-/+}CD10⁻), **d)** CMP (del inglés “common myeloid progenitors”, progenitores mieloides comunes; CD34⁺CD38⁺Thy-1⁻CD45RA⁻Flt3⁺CD7⁻CD10⁻), **e)** MEP (del inglés “megakaryocytic and erythroid progenitors”: progenitores megacariocíticos y eritroides: CD34⁺CD38⁺Thy-1⁻CD45RA⁻Flt3⁻CD7⁻CD10⁻) y **f)** GMP (del inglés “granulocytic-monocytic progenitors”: progenitores granulo-monocíticos : CD34⁺CD38⁺Thy-1⁻CD45RA⁺Flt3⁺CD7⁻CD10⁻).
- 15
- 20

2.3. Análisis de progenitores hematopoyéticos comprometidos en la médula ósea de pacientes con DBA

- Una vez que se confirmó que el número de células CD34⁺ no estaba afectado significativamente en la médula ósea de los pacientes con DBA, el siguiente punto a evaluar
- 25 fue su funcionalidad mediante ensayos clonogénicos *in vitro*. Varios estudios han observado que la capacidad de las células CD34⁺ de pacientes con DBA para generar unidades de formación de colonias eritroides (BFU-Es del inglés “burst-forming unit-erythroid progenitors”) está disminuida (Hamaguchi et al. 2003; Iskander et al. 2015; Ruggero y Shimamura 2014). Nuestros resultados fueron consistentes con esta observación (**Figura 4**), ya que hay una
- 30 disminución muy significativa en el recuento de progenitores eritroides (BFU-Es) (**Figura 4b**). En cuanto a los progenitores del linaje mieloide (CFU-GMs: unidades formadoras de colonias granulo-macrófagicas, del inglés “granulocyte-macrophage progenitor colony forming units”))

(Figura 4a), los resultados mostraron una disminución en comparación con los donantes sanos, aunque mucho menos marcada que la observada en BFU-Es.

2.4 Análisis de la capacidad de injerto y diferenciación de las CMH de pacientes con DBA.

- Es importante considerar que para que un protocolo de terapia génica tenga éxito a la hora de tratar a pacientes con DBA requiere que se produzca el injerto de las células corregidas. Por lo tanto, adicionalmente se evaluó el potencial de repoblación de estas células en ratones NSG inmunodeficientes que permiten el xenoinjerto humano, como se ha explicado en el apartado de Material y Métodos. Nuestros resultados mostraron que, aunque no hubo diferencias significativas durante los primeros 60 días posteriores al trasplante entre células derivadas de médula ósea de pacientes con DBA y de donantes sanos, cuando llegamos al final del experimento el día 90, se observó una disminución significativa a nivel de injerto de las células de los pacientes con DBA (Figura 5a), lo que podría indicar una menor capacidad de repoblación a largo plazo de las CMH de estos pacientes. Aunque el potencial de repoblación mostró una caída a los 90 días postrasplante, no sucedió lo mismo con el potencial de diferenciación. La Figura 5b muestra la proporción de los diferentes linajes generados dentro de las células CD45⁺ humanas, y se muestra que no existen diferencias significativas entre las células de pacientes con DBA y de donantes sanos. Estos resultados indicaron que el potencial de diferenciación de la población CD34⁺ de pacientes con DBA trasplantados seguía siendo similar al observado en donantes sanos.
- En conclusión, los resultados obtenidos en este apartado permiten predecir que la colección de CMH no debería constituir una limitación significativa en pacientes con DBA. En principio, en las muestras estudiadas no hay reducción en el contenido de células CD34⁺CD38⁻ ni en el contenido de progenitores inmaduros comprometidos con ciertos linajes. Sin embargo, a pesar de la ausencia de una disminución en el número de progenitores hematopoyéticos, el menor potencial clonogénico, principalmente a nivel de CFU-GM y BFU-Es, permite vislumbrar un menor potencial eritropoyético de esta población. Junto a esto, cabe señalar que las células de pacientes con DBA mantienen un alto potencial de repoblación en ratones inmunodeficientes, a diferencia de las células de pacientes con FA, donde se ha observado un potencial de repoblación altamente defectuoso (Rio et al.2019).
- EJEMPLO 3: Generación de un vector lentiviral (LV) terapéutico aplicable en clínica: Estudios de eficacia en la línea celular K562 y en células CD34⁺ con haploinsuficiencia de *RPS19* de pacientes con DBA.**

Respaldados por la viabilidad real de recoger suficiente número de CMH en los pacientes con DBA, que podrían después corregirse usando un protocolo de terapia génica, decidimos desarrollar dos vectores lentivirales (LV) clínicamente aplicables usando una versión optimizada de *codones del* gen *RPS19*, bajo el control del promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK) o el factor de elongación alfa en su versión corta (*EF1α (s)*).

3.1. Análisis de la funcionalidad de los vectores terapéuticos en la línea celular K562 interferida para *RPS19*.

En primer lugar, se comprobó la capacidad de expresar el transgén de interés mediante los vectores terapéuticos, que consistía en la versión del codón optimizado del gen *RPS19* (*CoRPS19*; codón optimizado *RPS19*). Para hacer esto, las células K562 fueron inicialmente transducidas con dos vectores lentivirales portadores de dos secuencias shRNA específicas para interferir la expresión de *RPS19* (*LV-THM.shRPS19* y *LV-MISSION® pLKO.1-pure TurboGFP™ shRPS19*), generando de esta manera un modelo de DBA; posteriormente, estas células en las que la expresión de *RPS19* estaba afectada, se corrigieron con los vectores terapéuticos.

La interferencia con el vector *LV-THM.shRPS19* mostró que era capaz de silenciar los niveles de ARNm del gen *RPS19* a niveles del 50-60% como se muestra en la **Figura 6a**. Junto a este resultado, se confirmó la expresión de vectores terapéuticos (transgén *CoRPS19*) en las células interferentes, tanto en aquellas condiciones de control sin interferir pero transducidas con vectores terapéuticos, como en las condiciones interferidas y posteriormente corregidas con los vectores terapéuticos (**Figura 6a**) .

Este mismo estudio se realizó para el segundo vector *LV-MISSION® pLKO.1-pure TurboGFP™ shRPS19*, que mostraba una mayor capacidad de interferencia mostrando un silenciamiento de ARNm del 95% del gen *RPS19* (**Figura 6b**). Sin embargo, incluso con esta capacidad de interferir con el gen de interés, el análisis de la versión optimizada *CoRPS19* mostró los mismos resultados que en el experimento anterior, observándose solo la expresión de la secuencia *CoRPS19* en las condiciones transducidas con los vectores terapéuticos (**Figura 6b**).

*3.1.1 Análisis del proceso de biogénesis ribosomal en la línea K562 interferido en el gen *RPS19* y corregido con vectores terapéuticos.*

Puesto que las células de pacientes con Blackfan -Diamond anemia se caracterizan por un defecto en el proceso de biogénesis ribosomal, se estudió en qué grado podía estar este

proceso afectado en las K562 células en las que la expresión de *RPS19* se había interferido. Para ello, se procedió al estudio de células K562 transducidas con los dos vectores de interferencia generados. Paralelamente, se analizó la posible reversión del defecto al corregir las células K562 interferidas i para el gen *RPS19* y posteriormente corregida con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** y *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre**.

El análisis de estas muestras reveló que había una acumulación de 21S pre rRNA en las células interferidas. El vector de interferencia LV-THM.shRPS19 genera una acumulación de pre rRNA 21S/21C significativamente mayor que la observada en los controles: células K562 sin transducción (Mock) y células K562 interferidas con un vector interferente inespecífico LV-THM.shscramble (scramble). Cuando las células K562, interferidas o no, se transdujeron con cualquiera de los dos vectores terapéuticos, los niveles de ARNr pre-21S mostraron niveles similares a los observados en las condiciones de control (**Figura 7a**).

Cuando las células fueron interferidas con el LV-MISSION® pLKO.1-puro TurboGFP™ shRPS19 vector interferencia, la acumulación de pre-rRNA 21S/21C en las células interferidas era más de dos veces mayor que la observada cuando las células se interfirieron con el vector LV-THM.shRPS19 es de destacar que incluso en estas condiciones, cuando se transdujeron las células con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** y *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre**, los niveles de pre-rRNA 21S/21C mostraron valores similares al control (**Figura 7b**), observándose a su vez que el vector *PGK.CoRPS19.Wpre** siempre mostraba una recuperación más significativa que el vector *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre**.

3.2. Estudios de eficacia de la terapia génica lentiviral en células de pacientes con DBA.

Una vez que la funcionalidad de los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** y *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre** había sido determinada en líneas celulares, el siguiente paso fue continuar estos estudios en células primarias de pacientes con DBA. Estos estudios se realizaron en células CD34⁺ de la médula ósea en diferentes pacientes con DBA. El objetivo de estos experimentos fue: 1) evaluar la posibilidad de transducir los progenitores hematopoyéticos de pacientes con DBA, 2) confirmar si los vectores terapéuticos tenían toxicidad en los progenitores hematopoyéticos, 3) evaluar el grado de reversión del fenotipo de estas células y 4) evaluar si las células corregidas eran capaces de injertarse en un modelo de trasplante xenogénico *in vivo*.

3.2.1 Análisis del potencial clonogénico (CFC) de los progenitores hematopoyéticos de pacientes con DBA transducidos con vectores terapéuticos.

Con el fin de evaluar el efecto de la transducción en células progenitoras hematopoyéticas de pacientes DBA, células CD34⁺ de médula ósea (MO) de pacientes DBA se transdujeron con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** y *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** y con un vector control *PGK.EGFP.Wpre**. A continuación, se realizaron ensayos clonogénicos para

5 comprobar si la transducción con diferentes vectores terapéuticos modificaba el potencial clonogénico de las células CD34⁺. El hecho de que el número de colonias generadas (CFCs del inglés “colony forming cells”) por células CD34⁺ de pacientes con DBA no disminuía al traducir con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** y *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** indicó la ausencia de toxicidad mediada por estos vectores (**Figura 8**). Por el contrario, la

10 determinación del número total de colonias formadas reveló que la transducción con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** y *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** aumentaba el número de colonias en comparación con las células transducidas con el vector control *PGK.EGFP.Wpre**, siendo significativa la diferencia en el número de colonias BFU-E en muestras transducidas con el vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** (**Figura 8b**).

15 3.2.2 *Determinación del número de copias del vector (VCN) y el porcentaje de transducción en progenitores hematopoyéticos de pacientes con DBA después de la transducción con vectores terapéuticos*

La experiencia de nuestro laboratorio en la transducción de CD34⁺ primarias y en particular de células de pacientes con fallas de la médula ósea, permitió el uso de un protocolo

20 optimizado de transducción de estas células de pacientes con DBA. Para determinar la eficacia de este protocolo en progenitores hematopoyéticos de pacientes con DBA, se determinó el número de copias del vector integrado (VCN) en las células transducidas detectando la señal de empaquetamiento del provirus Q-PCR (Ψ). Estos análisis se realizaron, tanto en el conjunto de células CD34⁺ transducidas expandidas en cultivo líquido durante 14

25 días, como en las colonias individuales obtenidas en ensayos clonogénicos (CFCs). A partir de estas colonias se determinó el porcentaje de transducción, cuantificando el número de colonias positivas a provirus frente a los totales.

La determinación de la eficacia de la transducción reveló que el 77,93% de las CFCs se habían transducido con el vector *PGK.CoRPS19.Wpre** y el 57,79% con el vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**, el 48,85% con el vector control *PGK.EGFP.Wpre** (**Figura 9a**). La detección

30 del número de copias de los vectores lentivirales, tanto en cultivo líquido (**Figura 9b**) como en las colonias recolectadas (**Figura 9c**) mostró la presencia de aproximadamente dos copias del provirus por célula en todas las condiciones. Los resultados de la transducción de células CD34⁺ individuales de cada paciente se enumeran en la **Tabla 5**.

Paciente	Vector	Células CD34 ⁺ (%)	Transducción (%)	MOI	VCN/célula en CFCs	VCN/Célula en cultivo líquido
DBA-31	<i>PGK.EGFP.Wpre*</i>	ND	12,5	300	0,10	1,80
	<i>PGK.CoRPS19.Wpre*</i>		69,2		2,20	2,20
DBA-25	<i>PGK.EGFP.Wpre*</i>	92.6	33,3	200	0,10	2,10
	<i>PGK.CoRPS19.Wpre*</i>		66,7		0,50	1,90
	<i>EF1α(s).CoRPS19.Wpre*</i>		36,4		0,50	1,50
DBA-36	<i>PGK.EGFP.Wpre*</i>	70	66,6	200	2,30	2,10
	<i>PGK.CoRPS19.Wpre*</i>		66,6		2,40	2,00
	<i>EF1α(s).CoRPS19.Wpre*</i>		41,2		2,60	1,60
DBA-5	<i>PGK.CoRPS19.Wpre*</i>	ND	100,0	100	2,43	4,23
	<i>EF1α(s).CoRPS19.Wpre*</i>		83,3		1,86	3,30
DBA-13	<i>PGK.EGFP.Wpre*</i>	ND	16,7	100	0,40	1,90
	<i>PGK.CoRPS19.Wpre*</i>		ND		5,80	1,40

Tabla 5. Resultados obtenidos tras la transducción de células CD34⁺ de pacientes con DBA con los vectores terapéuticos, *PGK.CoRPS19.Wpre** o *EF1 α (s) CoRPS19.Wpre**, o con el vector control *PGK.EGFP.Wpre**.

5 3.2.3 Análisis del efecto de la transducción sobre la proliferación de progenitores hematopoyéticos en pacientes con DBA

Estos experimentos permitieron comprobar si la complementación con vectores terapéuticos generaba una ventaja proliferativa *in vitro* de los progenitores hematopoyéticos corregidos sobre los no corregidos. Una vez que las células CD34⁺ se habían transducidos con los

vectores terapéuticos, *PGK.CoRPS19.Wpre** o *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre**, o con el vector control *PGK.EGFP.Wpre**, se mantuvieron en cultivo líquido durante 14 días. El análisis de la curva de crecimiento no reveló diferencias significativas en el crecimiento celular de los progenitores hematopoyéticos transducidos con los vectores terapéuticos

5 *PGK.CoRPS19.Wpre** o *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre** o con el vector control *PGK.EGFP.Wpre** durante el intervalo de tiempo analizado (**Figura 10**).

3.2.4 Análisis de la diferenciación eritroide en progenitores hematopoyéticos de pacientes DBA corregidos con vectores terapéuticos

El proceso de diferenciación eritroide de células de pacientes con DBA muestra un bloqueo

10 en las fases de maduración de los progenitores eritroides generando menos eritrocitos. Por tanto, se analizó si los vectores terapéuticos eran capaces de revertir el bloqueo de la diferenciación eritroide en comparación con las células no corregidas.

Para determinar este proceso, se transdujeron células CD34⁺ derivadas de médula ósea de pacientes con DBA con los vectores terapéuticos, *PGK.CoRPS19.Wpre** o

15 *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre**, o con el vector de control *PGK.EGFP.Wpre**. Después de la transducción, las células se cultivaron en un medio que promueve la diferenciación eritroide y se analizaron las diferentes etapas del proceso de diferenciación eritroide mediante citometría de flujo utilizando los marcadores previamente descritos CD45, CD36, CD71 (receptor de transferrina) y CD235a (glicoforina A; GPA) característica del proceso de diferenciación

20 eritroide.

El análisis de citometría se realizó utilizando la siguiente estrategia: en la primera selección C36⁺/CD45⁻ que son aquellas células que se están diferenciando hacia el linaje eritroide. Dentro del grupo de células C36⁺/CD45⁻ se seleccionan dos ventanas; la primera recopila los eventos CD71⁺/CD235a⁺ correspondientes a los progenitores eritroides, y la segunda ventana

25 recopila los eventos CD71⁻/CD235a⁺ correspondientes a reticulocitos y eritrocitos maduros.

La determinación del proceso de diferenciación eritroide en progenitores hematopoyéticos de pacientes con DBA reveló dos observaciones. Las muestras transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** y *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre** tienen un mayor porcentaje de eritrocitos maduros (ventana CD71⁻/CD235a⁺) en comparación con las condiciones

30 transducidas con el vector control *PGK.EGFP.Wpre** (**Figura 11**). Este hecho sugiere que el bloqueo en la maduración de progenitores eritroides entre fases CD71⁺/CD235a⁺ y CD71⁻/CD235a⁺ se invierte mediante transducción con vectores terapéuticos.

3.3. Análisis del fenotipo hematológico de los progenitores hematopoyéticos de pacientes con DBA transducidos con los lectores terapéuticos y trasplantados en ratones inmunodeficientes NSG.

- Para estudiar si el proceso de transducción con los vectores terapéuticos
- 5 *PGK.CoRPS19.Wpre** y *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre** afectaba la capacidad de repoblación de CMH en pacientes con haploinsuficiencia para *RPS19*, se realizaron trasplantes de células transducidas en ratones inmunodeficientes NSG .

3.3.1 Análisis del potencial de reconstitución de células de médula ósea CD34⁺ de pacientes con DBA transducido con vectores terapéuticos

- 10 Para estos experimentos, se transdujeron células CD34⁺ de pacientes con DBA con los vectores terapéuticos, *PGK.CoRPS19.Wpre** o *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre**, o con el vector de control *PGK.EGFP.Wpre** y se trasplantaron en ratones inmunodeficientes NSG. A los 30 y 60 días, se obtuvieron muestras de médula ósea mediante punción del fémur y el día 90 se sacrificaron los ratones.
- 15 El estudio del porcentaje de células CD45⁺ humanas (hCD45⁺) en la médula ósea de ratones trasplantados reveló la capacidad de repoblación de estas células corregidas, no observándose diferencias significativas entre las muestras suplementadas con vectores terapéuticos y las transducidas con *PGK.EGFP.Wpre** hasta el día 90 después del trasplante (**ver Figura 12**). También se investigó la capacidad de los progenitores hematopoyéticos
- 20 corregidos con vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** y *EF1 α (s).CoRPS19.Wpre** y con el vector control *PGK.EGFP.Wpre** para generar diferentes linajes. La **Figura 12** muestra que el potencial pluripotente de CD34⁺, así como la capacidad de generar células mieloides (CD33⁺) o linfoides b (CD19⁺), fue similar en todos los grupos de células transducidas.

- #### *3.3.2 Análisis del número de copias de vectores en células de pacientes con DBA transducidas e injertadas en ratones NSG*
- 25

- La confirmación de que el injerto obtenido en la sección anterior correspondía a nuestras células transducidas terapéuticamente se obtuvo mediante el siguiente proceso; una vez que los ratones se sacrificaron en el día 90 después del trasplante, las células humanas de se seleccionaron a partir de la médula ósea de los ratones trasplantados mediante selección
- 30 celular con el marcador humano CD45 (selección de la población de interés mediante citometría de flujo). Una vez que se obtuvieron las células humanas que habían injertado, se determinó el VCN por Q-PCR (**Figura 13**). La determinación del VCN en células de pacientes

transducidas con los vectores terapéuticos e injertadas en ratones NSG reveló que, en el día 90 postrasplante, se observa integración de los vectores terapéuticos a niveles de aproximadamente 2 copias por célula en promedio para el vector *PGK.CoRPS19.Wpre** y una copia por célula para el vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**.

5 EJEMPLO 4: Estudios de seguridad asociados con la terapia génica de CMH en pacientes con DBA

4.1. Estudios de seguridad *in vitro*.

Para realizar estudios que nos permitieran evaluar la seguridad de la transducción de CMH de pacientes con DBA con los vectores lentivirales *PGK.CoRPS19.Wpre** y *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**, se realizaron experimentos de la transducción de células CD34⁺ de sangre de cordón umbilical de donantes sanos.

4.1.1 *Análisis clonogénico de progenitores hematopoyéticos de donantes sanos y transducidos con vectores terapéuticos*

Para analizar si la transducción con ambos vectores terapéuticos mostraba efectos tóxicos sobre los progenitores hematopoyéticos de donantes sanos, se transdujeron células CD34⁺ con los dos vectores terapéuticos, *PGK.CoRPS19.Wpre** o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**, o con el vector de control *PGK.EGFP.Wpre**.

La determinación del número de colonias generadas a partir de las células transducidas mostró que el número de CFU-GM (**Figura 14a**) era similar con todos los vectores. Sin embargo, se observó una disminución significativa del 20,32% en el número de BFU-Es en las células transducidas con el vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**, en comparación con las células transducidas con el vector *PGK.EGFP.Wpre** (**Figura 14b**).

4.1.2. *Análisis del número de copias del provirus y los niveles de expresión de CoRPS19 en colonias y cultivo líquido postransducción de células CD34⁺ de donantes sanos.*

Para verificar que los niveles de transducción eran comparables entre las diferentes condiciones, se analizó el número de copias de vector por célula en colonias y en cultivo líquido. La determinación del VCN por célula realizada a partir de las colonias individuales recogidas de los experimentos anteriores mostró que, tomando como colonia positiva la que tiene un valor superior a 0,3 copias por célula, la eficiencia de transducción de las colonias con el vector *PGK.EGFP.Wpre** fue del 85,9% y la eficacia para el vector

*PGK.CoRPS19.Wpre** fue del 77,03%. En cuanto al vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**, su eficiencia de transducción fue del 67,83%, siendo esta significativamente menor que la mostrada por el vector control *PGK.EGFP.Wpre** y el vector terapéutico *PGK.CoRPS19.Wpre** (**Figura 15a**).

- 5 El número medio de copias observadas en el análisis del cultivo líquido fue de $3,40 \pm 0,91$ copias por célula para la condición *PGK.EGFP.Wpre**, $5,80 \pm 1,80$ copias para la condición *PGK.CoRPS19.Wpre** y $2,00 \pm 0,49$ para la condición *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**, siendo este significativamente menor que los mostrados en los dos vectores anteriores (**Figura 15b**).

- En los siguientes tres experimentos se determinó la expresión del transgén *CoRPS19* en base a la transducción con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**, tomando como referencia el vector control *PGK.EGFP.Wpre**. Como puede observarse en la Figura 15, la expresión del ARNm correspondiente a la versión optimizada del gen *RPS19* solo se observa en células transducidas con vectores terapéuticos. Además, se determinó la expresión del transgén *CoRPS19* de cada vector en función del número de copias integradas. La **Figura 15c** muestra que los niveles de expresión de *CoRPS19* inducidos por los vectores terapéuticos fueron similares.
- 10
15

4.1.3. Análisis del crecimiento celular de células CD34⁺ de donantes sanos transducidos con los vectores terapéuticos y el vector de control

- En estos experimentos investigamos el crecimiento de células CD34⁺ después de la transducción con vectores terapéuticos. Para ello, se cultivaron las células CD34⁺ transducidas y se cuantificó el número de células en cultivo líquido una vez a la semana durante tres semanas.
- 20

- Como se muestra en la **Figura 16**, el crecimiento de las células transducidas con los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** y *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** y el control *PGK.EGFP.Wpre**, no mostró diferencias significativas, avalando la falta de toxicidad de ambos vectores.
- 25

4.2 Estudios de seguridad *in vivo*.

4.2.1. Análisis del potencial de repoblación de células CD34⁺ de donantes sanos transducidos con vectores terapéuticos

Para analizar el potencial de repoblación de las CMHs de donantes sanos transducidos, estas células se trasplantaron en ratones NSG inmunodeficientes. A los 30, 60, 90 y 120 días después del trasplante, se determinó la proporción de células CD4⁺ humanas que se habían injertado en los receptores primarios. Asimismo, las células de la médula ósea de estos receptores primarios se trasplantaron de nuevo a receptores secundarios para estudiar el potencial de repoblación a largo plazo (30 y 120 días después del trasplante secundario).

Como se muestra en la **Figura 17a**, no se observaron diferencias significativas en el nivel de injerto de los receptores primarios entre los diferentes grupos experimentales. El análisis del receptor secundario reveló un nivel significativamente menor de injerto en el día 120 después del trasplante secundario en las células transducidas con el vector de control *PGK.EGFP.Wpre**, en comparación con las células transducidas con el vector *PGK.CoRPS19.Wpre**. Presumiblemente, la diferencia significativa observada se debe a la homogeneidad de los resultados en el grupo de células transducidas con el vector *PGK.CoRPS19.Wpre**, frente a la alta heterogeneidad obtenida con el vector *PGK.EGFP.Wpre**.

Junto con el análisis anterior, la cuantificación de los diferentes linajes generados por las células injertadas se llevó a cabo, sin observar diferencias significativas en el potencial de diferenciación, ni en el primario ni en los receptores secundarios (**Figura 17b**).

4.2.2. Análisis del número de copias de provirus en ratones NSG trasplantados con células CD34⁺ de donantes sanos transducidos con vectores terapéuticos

Tras el sacrificio de los ratones NSG del experimento anterior, se obtuvo la médula ósea y se determinó el VCN por célula para confirmar que las células injertadas portaban la secuencia proviral de los vectores terapéuticos *PGK.CoRPS19.Wpre** o *EF1α(s).CoRPS19.Wpre**.

Como se puede observar en la **Figura 18**, la determinación el número de copias de provirus integradas por célula mostró diferencias significativas entre en las células transducidas con el vector control *PGK.EGFP.Wpre** ($2,6 \pm 1,87$ copias) y las transducidas con el vector *PGK.CoRPS19.Wpre** ($5,9 \pm 1,8$ copias), no observándose estas diferencias con el vector *EF1α(s).CoRPS19.Wpre** ($5,65 \pm 3,67$) (**Figura 18**).

4.2.3. *Análisis de la variación de peso corporal y hematologías en ratones NSG trasplantados con células CD34⁺ derivadas del cordón umbilical de donantes sanos y transducidas con vectores terapéuticos.*

5 Para evaluar el estado de salud de los animales trasplantados, se evaluó el peso corporal y la hematología de los ratones NSG trasplantados cada 30 días hasta el día del sacrificio en los receptores primarios y los días 30 y 120 en los receptores secundarios.

La determinación del peso corporal de los ratones NSG trasplantados con las células transducidas reveló que no había diferencias significativas entre las diferentes condiciones, como se muestra en la **Figura 19**.

10 Los parámetros hematológicos determinados en los receptores NSG primarios y secundarios mostraron que no existían diferencias significativas en los receptores primarios en los eritrocitos, plaquetas, leucocitos o neutrófilos (**Figura 20**). Sin embargo, el análisis de los receptores secundarios mostró un ligero aumento significativo en el número de eritrocitos y en la concentración de hemoglobina entre el grupo control *PGK.EGFP.Wpre** y el grupo correspondiente al vector *PGK.CoRPS19.Wpre**. A pesar de esto, ninguno de los otros parámetros correspondientes al linaje eritroide (HCT, MCV) mostró diferencias significativas entre grupos.

4.3 Estudios de genotoxicidad: análisis de la integración del provirus en el genoma de las células hematopoyéticas de donantes sanos transducidas con el vector *PGK.CoRPS19.Wpre*.

20 El análisis de los sitios de integración del vector se llevó a cabo en células CD34⁺ de cordón umbilical de donantes sanos transducidas con el vector terapéutico *PGK.CoRPS19.Wpre** y trasplantadas a los ratones NSG mostrados en la sección anterior. Genewerk llevó a cabo un análisis de los sitios de integración más comunes para evaluar la posible oncogénesis o eventos clonales dominantes. El estudio se realizó en dos tipos de muestras: células mantenidas en cultivo líquido previo al trasplante y en células CD45⁺ humanas presentes en ratones trasplantados. Para el análisis, se hizo referencia a los 10 sitios de integración más comunes para cada muestra (lista de 114 genes usados para determinar los 10 principales de cada uno).

30 El primero de los estudios de análisis del sitio de integración se realizó con muestras de cultivo líquido de experimentos de seguridad previos al trasplante en ratones NSG. En estas muestras de cultivo líquido, la mayor contribución de los sitios de integración correspondió al

4,37% como top 1, sin mostrar signos de dominancia clonal. El segundo análisis se llevó a cabo a partir de células humanas presentes en receptores primarios y secundarios trasplantados. Para los destinatarios primarios, el análisis del sitio de integración reveló que la contribución más alta representó el 5,009% del total. Para los receptores secundarios, la
5 contribución más alta representó el 32,33 %.

El análisis de los sitios de integración común (CIS) reveló una composición diversa en términos de las 10 regiones cis principales, ninguna de las cuales se asoció con eventos adversos como el crecimiento clonal o los procesos oncogénicos. Junto con esto, tampoco hubo integración específica en genes cercanos o involucrados en efectos adversos descritos
10 en otros ensayos de terapia génica (CCND2, LMO2, MDS1 / EVI1 (MECOM), MN1).

En definitiva, las muestras transducidas con *PGK.CoRPS19.Wpre**, tanto las mantenidas en cultivo líquido como las trasplantadas en ratones NSG, mostraron un patrón de integración policlonal, observándose un crecimiento clonal más fuerte en dos de las muestras trasplantadas a receptores secundarios del experimento de seguridad 3, donde la contribución
15 relativa de IS top 1 alcanzó el 32,336%.

REIVINDICACIONES

1. Vector lentiviral, en el que el vector lentiviral comprende un polinucleótido, en el que el polinucleótido se caracteriza porque comprende desde 5' hasta 3' los siguientes nucleótidos:
- a) una repetición terminal larga en 5' (5' LTR) que a su vez comprende un promotor quimérico de citomegalovirus,
 - b) un sitio de unión a cebador (PBS),
 - c) una señal psi de empaquetamiento,
 - d) un elemento que responde a Rev (RRE),
 - e) un tracto central de polipurina con fragmento de ADN (cPPT),
 - f) un promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) humana,
 - g) una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19,
 - h) un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (Wpre) optimizado mutado, y
 - i) una repetición terminal larga en 3' (3' LTR),
- en el que las regiones 5' y 3' LTR se han vuelto sustancialmente inactivas transcripcionalmente en virtud de una delección total o parcial en la región U3 de la LTR, y en el que f) y h) están operativamente ligados a y regulan la expresión de g).
2. Vector lentiviral según la reivindicación 1, en el que el promotor de PGK humana tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, con respecto a la longitud completa de SEC ID N°: 11.
3. Vector lentiviral según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína RPS19 es una secuencia de nucleótidos con codones optimizados con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 12.
4. Vector lentiviral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (Wpre) optimizado mutado tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, con respecto a la longitud completa con SEC ID N°: 13.
5. Vector lentiviral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polinucleótido comprendido en el vector lentiviral comprende además una secuencia señal de poliadenilación (PolyA) situada después de la 3' LTR.

6. Vector lentiviral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polinucleótido de longitud completa de dicho vector lentiviral tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferiblemente el 98%, con SEC ID N°: 17.
- 5 7. Vector lentiviral según la reivindicación 6, en el que la identidad de secuencia con SEC ID N°: 17 es del 100%.
8. Población de células transducidas con el vector lentiviral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 10 9. Población de células según la reivindicación 8, en la que las células están enriquecidas en células progenitoras y células madre hematopoyéticas CD34⁺.
- 15 10. Población de células según cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, en la que las células son autólogas del sujeto.
11. Composición farmacéutica que comprende el vector lentiviral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la población de células según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 12. Vector lentiviral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, población de células según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, o composición farmacéutica según la reivindicación 11, para su uso como medicamento.
- 25 13. Vector lentiviral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, población de células según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, o composición farmacéutica según la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento de anemia de Diamond-Blackfan en un sujeto que lo necesita.
- 30 14. Vector lentiviral según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, para su uso en el tratamiento de anemia de Diamond-Blackfan en un sujeto que lo necesita.
15. Vector lentiviral para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, en el que el sujeto que lo necesita es un ser humano.