

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 973 371**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/80 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2020** **PCT/EP2020/077638**
87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2021** **WO21064164**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2020** **E 20797035 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024** **EP 4038180**

54 Título: **Tratamiento de la enfermedad granulomatosa crónica**

30 Prioridad:

02.10.2019 EP 1920118045 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
19.06.2024

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)
Rämistrasse 71
8006 Zürich, CH

72 Inventor/es:

SILER, ULRICH, WOLFGANG;
REICHENBACH, JANINE y
HÄNSELER, WALTHER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, JuanObservaciones:

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

ES 2 973 371 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la enfermedad granulomatosa crónica

- 5 La presente invención se refiere a medios y métodos para tratar la enfermedad granulomatosa crónica.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad granulomatosa crónica (CGD) comprende un grupo de inmunodeficiencias congénitas con una incidencia de entre 1/19.230 en Arabia Saudí (Suliaman *et al.* (2009) *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology* 22, 21-26) y de 1/450.000 en Suecia (Ahlin *et al.* (1995) *Acta Paediatr* 84, 1386-1394). La enfermedad se manifiesta temprano en la vida ya que el cuerpo de los pacientes afectados no es capaz de protegerse a sí mismo de infecciones bacterianas y fúngicas. La esperanza de vida se ve fuertemente comprometida a pesar del tratamiento profiláctico de por vida con antibióticos y antimicóticos (Kuhns *et al.* (2010) *New Engl J Med* 363 (27) 2600-10; van den Berg *et al.* (2009) *Plos one* 4(4): e5234). La causa principal de la enfermedad es una capacidad fuertemente disminuida o ausente de los fagocitos (granulocitos, monocitos y macrófagos) para producir especies reactivas de oxígeno (ROS) para la inactivación de patógenos, debido a un defecto dentro del complejo enzimático de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidasa fagocítico. El complejo enzimático de NADPH oxidasa consiste en seis subunidades (gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox, p67phox y Rac2). En aproximadamente el 60 % de todos los pacientes con CGD, la enfermedad está provocada por mutaciones dentro del gen que codifica la subunidad gp91phox (CYBB) en el cromosoma X y, por lo tanto, se denomina X-CGD. Otro ~30 % de los pacientes presentan alteraciones del gen NCF1 autosómicas-recesivas (subunidad p47phox) (forma deficiente en p47phox de CGD), mientras que solo el 5 % de los casos se deben a mutaciones autosómicas recesivas en p67phox y p22phox (Roos *et al.* (2003) *Microbes Infect* 5: 1307-15).

25 La terapia génica es una nueva opción de tratamiento para pacientes que padecen enfermedades monogénicas. El principio de la terapia génica actual del estado de la técnica es introducir una versión funcional del gen mutado en el genoma de las células afectadas. Los enfoques clínicos actuales se basan principalmente en la administración del gen terapéutico por vectores basados en virus adenoasociados o por vectores retrovirales (gamma-retrovirales o lentivirales). La versión funcional insertada del gen mutado (transgén) da como resultado la expresión del nuevo producto génico, que compensa la ausencia del producto génico natural. Desde el primer éxito clínico en el año 2000, el número de enfermedades para las que se ha logrado el éxito clínico mediante este enfoque de adición génica de terapia génica ha aumentado continuamente.

35 Desarrollos posteriores de nucleasas de diseño (nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), metodología de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas CRISPR/Cas) permiten la modificación génica específica de secuencia (deleción o reparación), así como la inserción de ADN específica de secuencia. La alteración génica específica de secuencia para fines terapéuticos ya ha encontrado aplicación clínica (TALEN: W. Quasim *et al.* (2015) *Blood* 126: 2016; ZNF: identificador de ClinicalTrials.gov NCT02500849 y CRISPR/Cas9: Cyranoski D. *et al.* *Nature* 539, 479; identificador de ClinicalTrials.gov: NCT03057912). Actualmente, solo las nucleasas de dedos de zinc se evalúan clínicamente para la inserción específica de secuencia con el fin de curar la hemofilia B, MPS I y MPS II (<https://www.sangamo.com/product-pipeline>).

45 En la actualidad, la única terapia curativa para CGD es el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) alogénicas de un donante de antígeno leucocitario humano (HLA) idéntico. Para hasta aproximadamente el 75 % de los pacientes con descendencia europea no consanguínea, puede identificarse un donante de HLA idéntico (Grager *et al.* (2014) *N Engl J Med* 371: 339-48). Para el 25 % restante, la corrección basada en terapia génica de HSC autólogas representa una opción de tratamiento potencialmente curativa adicional.

50 La terapia génica para la CGD es, por lo tanto, una opción razonable para pacientes que carecen de donantes de HSC de HLA idéntico. Como se conoce de las portadoras femeninas de CGD ligada al cromosoma X, una actividad de NADPH oxidasa superior al 20 % puede estar asociada con un fenotipo sano (Bjorgvinsdottir *et al.* (1997) *Blood* 89, 41-48; Kuhns *et al.* (2010) *N Engl J Med* 363, 2600-2610). Por lo tanto, niveles de corrección terapéutica génica de aproximadamente el 20 % de la actividad NAPDH oxidasa se consideran suficientes para lograr el éxito clínico.

55 El primer ensayo de terapia génica de fase I/II clínicamente exitoso para pacientes con X-CGD se inició en el University Children's Hospital Zurich y Johann Wolfgang Goethe University Hospital Frankfurt en 2004 (NCT 00927134; NCT 00564759). En este ensayo, se trataron dos niños en Zurich y se trataron dos pacientes adultos en Frankfurt. El vector de terapia génica consistió en un vector gamma-retroviral dirigido por LTR (no autoinactivante (SIN)) con un ADNc que codifica gp91phox como transgén, dando como resultado la expresión ubicua del transgén. El estudio fue clínicamente exitoso, ya que los cuatro pacientes se recuperaron de infecciones resistentes al tratamiento preexistentes (Ott *et al.* (2006) *Nat Med* 12: 401-409; Siler *et al.* (2015) *Curr Gene Ther* 15: 416-427; Bianchi *et al.* (2009) *Blood* 114: 2619-2622). Sin embargo, el seguimiento a largo plazo reveló dos acontecimientos adversos graves (SAE) que condujeron a la finalización del ensayo en 2010:

• Transactivación: En clones en los que el vector viral se había integrado adyacente al gen *MDS1-EVI1*, secuencias potenciadoras presentes en la repetición terminal larga del vector gamma-retroviral interactuaron con el promotor del protooncoagén *MDS1-EVI1* (transactivación de *Evi1*), lo que condujo a una ventaja selectiva de estos clones de HSC. Esto provocó dominancia clonal, e inestabilidad genómica con monosomía 7 y desarrollo de síndrome mielodisplásico (MDS) en tres de los cuatro pacientes tratados con terapia génica.

• Silenciamiento: El promotor del vector viral se metiló progresivamente, lo que condujo a la disminución de la expresión del transgén terapéutico (silenciamiento del transgén), y a la reaparición de CGD.

Estos SEA obligaron al desarrollo de vectores de terapia génica más seguros, basados en vectores lentivirales autoinactivados (SIN) con

(I) un perfil de integración diferente, por ejemplo, el uso de vectores virales diferentes, para impedir la integración del vector viral en proximidad al gen *MDS1-EVI1*,

(II) expresión transgénica específica de tejido, es decir, solo en células derivadas de tejido mieloide que necesitan expresión transgénica, pero no en HSC, para evitar la posible ventaja selectiva de los clones de HSC en caso de transactivación, y

(III) prevención del silenciamiento de la expresión transgénica a lo largo del tiempo para facilitar la eficacia a largo plazo. Brendel *et al.* divulgan la expresión génica de p47phox dirigida por el promotor miR223 a partir de un vector gammaretroviral en células madre hematopoyéticas CD34+. También se divulgan vectores lentivirales que expresan el gen gp47phox bajo el control del promotor miR223 en monocitos.

Chiriaco *et al.* da a conocer la expresión génica de gp91phox dirigida por un promotor específico de tejido mieloide (promotor mínimo de gp91phox fusionado con el potenciador/promotor sintético SP146) a partir de un vector lentiviral en células madre hematopoyéticas CD34+. También se divulgan vectores lentivirales que expresan el gen gp91phox bajo el control del promotor miR223.

Términos y definiciones

El término “vector lentiviral”, cuando se usa en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a un genoma de virión o virus derivado de un lentivirus y adaptado para terapia génica humana. Comprende un transgén que incluye una secuencia codificante y un promotor operable en una célula de un paciente humano. El experto en la técnica conoce bien la terapia génica lentiviral; las publicaciones científicas recientes sobre el tema incluyen Milone y O'Doherty, (2018) *Leukemia* 32, 1529-1541; Yáñez-Muñoz *et al.* (2006) *Nature Medicine* 12, 348-353; Aiuti *et al.* (2013), *Science* 341 (6148), DOI: 10.1126/science.1233151).

El término “variante funcional”, cuando se usa en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a una variante de un gen que codifica un polipéptido, en donde está presente una variante disfuncional o no funcional de este gen en el paciente, pero la variante disfuncional o no funcional no cumple una función biológica particular dentro del paciente. En fagocitos estimulados de individuos sanos, la proteína gp91phox (codificada por el gen *CYBB*), la proteína p22phox (codificada por el gen *CYBA*), la proteína p47phox (codificada por el gen *NCF1*), la proteína p40phox (codificada por el gen *NCF4*), la proteína p67phox (codificada por el gen *NCF2*) forman juntas un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa. Esta NADPH oxidasa tiene actividad catalítica y es indispensable para la producción fagocítica de especies reactivas de oxígeno (ROS). La proteína Rac2 (codificada por el gen *RAC2*) es necesaria para inducir la formación del complejo enzimático de NADPH oxidasa tras la estimulación celular. Las mutaciones en cualquiera de estos genes pueden dar como resultado la síntesis de proteínas mal plegadas o la ausencia de un producto génico, lo que finalmente da como resultado la incapacidad de las células del paciente para formar un complejo de NADPH oxidasa activo y, por lo tanto, su incapacidad para producir ROS, provocando el fenotipo de CGD. La variante funcional codificada por un vector de terapia génica es capaz de complementar o reemplazar la variante disfuncional o no funcional y restaurar la función de la NADPH oxidasa.

Sumario de la invención

Basándose en estos antecedentes, el objetivo de la presente invención es proporcionar medios eficaces para el tratamiento de una enfermedad genética en la enfermedad granulomatosa crónica.

Este objetivo se logra mediante la materia objeto de las reivindicaciones independientes, con características ventajosas adicionales expuestas en las reivindicaciones dependientes.

Un primer aspecto de la invención se refiere a una célula madre hematopoyética humana (HSC) aislada o célula progenitora, particularmente una célula madre hematopoyética positiva para CD-34, en donde la célula madre o la célula progenitora es capaz de diferenciarse en una célula mieloide, transducida con un vector lentiviral.

El vector lentiviral comprende

- una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante funcional de un polipéptido disfuncional seleccionado del grupo que comprende gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox, p67phox y Rac2; bajo control transcripcional de, y

- 5 - una secuencia promotora operable en una célula humana, en donde el promotor comprende o consiste esencialmente en la secuencia promotora de miR223 (SEQ ID NO 01).

Secuencia promotora de miR223 (SEQ ID NO 01)

ACTTGTACAGCTTCACAGGGCTCCATGCTTAGAAGGACCCACACTTAGTTTAATGTTCT
GCTGTCATCATCTTGATATTCTTAATTTTTAAATAAAGGGCCTATCGTTTTTCATTTTTTACT
GGGCCTTGCAAATTATGTAGCTGGTTCTGTATGCCAGGAGAGAAGTTGGAAGTAAAATG
GTATTCAGGACCAGGAGGCATTCTGGCAGAGTGAAAGAACATGTGATTTGGAGTCCA
GGGGATGGGTTTTAAATTTTCAGCTTTCCACTAATTTGCTTTGTGATACTGAGTATTTCTTT
TATCCCTCAGAGGCTCTGTTTCTCAATTTTGAAGTACGGGTTTTTTCATTAGATAATGTCTC
AGTTCTGGTATTCCAGGTTTCCCTCAATTATTCTGGGAAAACCTCCTTGACCCACAGGC/
GAGCCTAGGGCAGCCAGGTGCTTTCTACTCTCTCTCTCTCTGCAGCTTGGAAGTTAGT
GTCTGTTGAAGGTCAGCTGGGAGTTGGTGGAGGCAGGGCAGTGGCCTGCTACTATTGC
TGCAGTAGCAGACCCTTTTCAACAGCATTGTTTTGTCAATTTTGCATCCAGATTTCCGTT
GGCTAACCTCAGTCTTATCTTCTCCTCATTTCTGTTTCTGTTGAAGACACCAAGGGCCCTT
CAAAACACAGAAGCTTCTTGCTCACGGCAGAAAGCCCAATTCCATCTGGCCCCCTGCAG
GTTGGCTCAGCACTGGGGAATCAGAGTCCCCTCCATGACCAAGGCACCACTCCACTGA
10 CAG.

En ciertas realizaciones, la célula se proporciona para el tratamiento de la enfermedad granulomatosa crónica, y dicho vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante funcional o variantes funcionales de gp91phox (número de UniProt P04839), p22phox (número de UniProt P13498), p40phox (número de UniProt Q15080), p47phox (número de UniProt P14598), p67phox (número de UniProt P19878) y/o Rac2 (número de UniProt P15153).

En ciertas realizaciones, el vector no comprende elementos promotores/potenciadores lentivirales. El término "elemento potenciador" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una secuencia corta de ácido nucleico a la que pueden unirse proteínas activadoras para aumentar la probabilidad de que se produzca la transcripción de una secuencia particular, particularmente una secuencia promotora.

El vector de terapia génica del inventor se basa o se deriva de un vector lentiviral.

En una realización del vector de terapia génica de la invención, el vector comprende o consiste esencialmente en un ácido nucleico caracterizado por la SEQ ID 02.

SEQ ID NO 02:

Lenti_mir223_p47phox_PRE4_KAN(UZH1p47CGD) 8688 pb (elementos de secuencia en dirección 5' a 3' indicados por la fuente:)

Fuente en minúsculas: promotor de CMV; minúsculas subrayadas: LTR lentiviral: 5'U5; cursiva en minúsculas: secuencia líder lentiviral; fuente en mayúsculas: promotor miR223; mayúsculas subrayadas: secuencia de Kozak; cursiva en mayúsculas: marco de lectura abierto de p47phox; cursiva en minúsculas subrayadas: sitios de restricción; minúsculas: elemento WPRE; cursiva en minúsculas subrayadas: sitios de restricción; minúsculas subrayadas: LTR lentiviral: 3'U3; cursiva en minúsculas: LTR lentiviral: 3' R; cursiva en minúsculas en negrita: LTR lentiviral: 3'U5; minúsculas:

ccattgcatacgttgatccatatcataatatgtacatttatattggctcatgtccaacattaccgccatgttgacattgattattgactag
 ttattaatagtaatacaattacggggtcattagttcatagcccataatggagttccggttacataacttacggtaaatggcccgctg
 gctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacg
 tcaatgggtggagtatttacggtaaaactgccacttggcagfacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaa
 tgacggtaaatggcccgctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtatttagtcatc
 gctattaccatgggtgatgctggtttggcagtacatcaatgggctggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccacccc
 attgacgtcaatgggagtttgggtttggcaccacaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaa
 tggcggttaggcgtgacgggtgggaggtctatataagcagagctcggttagtaaccggggctctctggttagaccagatctgag
 cctgggagctctctggttaactaggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgctcaagtagtggtgcccgtc
tggtgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcaagtgtggaatactctagcagtggtggccgaacagggactt
gaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgacggcaagaggcgaggg
gcggcgactgggtgagtagcgcacaaatgtttagactagcgaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgtcagattaa
cgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccaggggaaagaaaaataaaatataaactatagtagt
gggcaagcaggagctagaacgattcgagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaactgggaca
gctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaagga
tagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag
cggccgctgatcttcagacctggaggaggagatagagggacaattggagaagtgaaattatataaataaaagtagtaaaat
gaaccattaggagtagcaccaccaaaggcaagagaagagtggtgcagagagaaaaagagcagtggaataggagctt
gttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtc
tggtagtgtagcagcagcagaacaatttctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagtcgtgggcatcaa
gcagctccagggaagaatcctggctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctggggttgggtgtctctggaact
cattgcaccactgctgtgccttggatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttgaatcacacgacctggatggagt
ggacagagaaatatacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaa

gaattattggaattagataaatgggcaagtttggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgata
 gtaggaggcttgtaggttaagaatagttttgctgtactttctatagtagaagtagtaggcagggaattaccattatcgtttcaga
 cccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgagggaatagaagaagaagggtggagagagagacagagacaga
 tccattcgattagtagaacggaatcgcagcgtatcggttaacttttaaagaaaaggggggaltggggggtacagtgacaggggaa
 agaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaatttatcgatca
 cgagactagccctcgagaagcttgatataatagtcgacACTTGTACAGCTTCACAGGGCTCCATGCTTAGA
 AGGACCCACACTTAGTTTAATGTTCTGCTGTCATCATCTTGATATTCTTAATTTTTAAAT
 AAAGGGCCTATCGTTTTCATTTTTTACTGGGCCTTGCAAATTATGTAGCTGGTTCTGTAT
 GCCAGGAGAGAAGTTGGAAGTAAAATGGTATTCCAGGACCAGGAGGCATTCTGGCAGA
 GTGAAAGAACATGTGATTTGGAGTCCATGGGGATGGGTTTAAATTTTCAGCTTTCCACTA
 ATTTGCTTTGTGATACTGAGTATTTCCCTTTATCCCTCAGAGGCTCTGTTTCTCAATTTTG
 ACTACGGGTTTTTTCATTAGATAATGTCTCAGTTCTGGTATTCCAGGTTTCCCTCAATTA
 TTCTGGGAAAACCTCCTTGACCCACAGGCAGAGCCTAGGGCAGCCAGGTGCTTTCTAC
 TCTCTCTCTCTCTGCAGCTTGAAAGTTAGTGTCTGTTGAAGGTCAGCTGGGAGTTGGT
 GGAGGCAGGGCAGTGGCCTGCTACTATTGCTGCAGTAGCAGACCCTTTCACAACAGCA
 TTGTTTTGTCAATTTTGCATCCAGATTTCCGTTGGCTAACCTCAGTCTTATCTTCCTCATTT
 CTGTTTCTGTTGAAGACACCAAGGGCCCTTCAAAACACAGAAGCTTCTTGCTCACGGC
 AGAAAGCCCAATTCCATCTGGCCCTGCAGGTTGGCTCAGCACTGGGGAATCAGAGTC
 CCTCCATGACCAAGGCACCACTCCACTGACAGGGATCCAAGCTTGCCACCATGGGC
 GACACCTTCATCCGGCACATCGCCCTGCTGGGCTTCGAGAAGCGGTTCTGTGCCAGC
 CAGCACTACGTGTACATGTTTCTGGTGAAGTGGCAGGACCTGAGCGAGAAGGTGGTGT
 ACCGGCGGTTACCGAGATCTACGAGTTCCACAAGACCCTGAAAGAGATGTTCCCCAT
 CGAGGCCGGAGCCATCAACCCCGAGAACCGGATCATCCCCACCTGCCTGCCCCCAA
 GTGGTTCGACGGCCAGAGAGCCGCCGAGAACAGGCAGGGCACCTGACCGAGTACT
 GCAGCACCTGATGAGCCTGCCCACCAAGATCAGCCGGTGGCCTCACCTGCTGGATTT
 CTTCAAAGTGCGGCCCGACGACCTGAAGCTGCCCACCGACAACCAGACCAAGAAGCC
 CGAGACCTACCTGATGCCCAAGGACGGCAAGAGCACCGCCACCGACATCACCGGCCC
 CATCATCCTGCAGACCTACCGGGCCATCGCCGACTACGAGAAAACCAGCGGCAGCGA
 GATGGCCCTGAGCACCGGCGACGTGGTGGAGGTGGTGGAAAAGAGCGAGAGCGGGT
 GGTGGTTCTGCCAGATGAAGGCCAAGCGGGGCTGGATTCCCGCCAGCTTCTTGGAAC
 CCCTGGACAGCCCCGACGAGACCGAGGACCCCGAGCCCAACTACGCCGGCGAGCCC
 TACGTGGCCATCAAGGCCTACACCGCCGTGGAGGGCGACGAGGTGTCCCTGCTGGAA
 GGCGAGGCCGTGGAGGTGATCCACAAGCTGCTGGACGGATGGTGGGTGATCCGGAA
 GGACGACGTGACCGGCTACTTCCCCAGCATGTACCTGCAGAAGAGCGGCCAGGACGT
 CAGCCAGGCCAGCGGCAGATCAAGAGAGGCGCCCCCTCCAGGCGGAGCAGCATCC
 GGAACGCCACAGCATCCACCAGAGAAGCCGGAAGAGACTGAGCCAGGACGCCTACC
 GGCGGAACAGCGTGCGGTTCTGTCAGCAGCGGCGGAGGCAGGCCAGACCCGGCCCT

CAGAGCCCCGGCAGCCCCCTGGAAGAGGAACGGCAGACCCAGCGGAGCAAGCCCCA
 GCCCGCCGTGCCCCCTAGACCCAGCGCCGACCTGATCCTGAACCGGTGCAGCGAGAG
 CACCAAGCGGAAGCTGGCCAGCGCCGTGTGATGActcgagtattatcaagcttatcgataccgtcgaa
cccccgggctgcaggaattcgagcatcttacgccatttaccatattgtctgtttcttgatttgggtat
 aacataaatgggtgggcaatcattacatttttagggatattgaattactaggtcaggtgtattgccacaagacaaacatgtaaga
 aactttcccgtaattacgctctgttccgttaataacacctctggattacaaaattgtgaaagattgactgatattcttaactatgttgcctc
 tttaacgctgtgtggatattgtcttaataacacctctgtatcatgctattgtctccgtacggcttctgtttctcctctgtataaatcctggtt
 gctgtctcttatgaggagttgtggcccggtgtccgtcaacgtggcggtgtgtgtctgtgttgcgacgaacccccactggctggg
 gcattgccaccacgtcaactccttctgggacttctgttccccctcccgatcgccacggcagaactcatcgccgctgctgccttgc
 ccgctgctggacaggggctaggtgtgtggcactgataattccgtggtgtgtgtcggggaagggcctgctccggctctgcccct
 ctccgctcttgccttgcctcagacgagtcggatctcccttggggcgcctccccgcctggaattcgagctcggtacctttaag
accaatgactfacaaggaagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactcccaacg
aagacaagatctcttttctgtactgggtctctcgtgttagaccagatctgagcctgggagctctctggttaactagggaaacct
ctgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtggtgtgccgtctgtgtgtgactctgtgtaactagagatc
cctcagacccttttagtcagtggtggaanaatctctagcagtagtagtcatgtcatctattattcagatttataacttgcaagaa
 atgaalatcagagagtgagaggaactgtttattgcagcttataatggtfacaataaagcaatagcatcacaatttcacaaata
 aagcattttttcactgcattctagttgtgtgtgttgcacaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggtctagctatccgcccctaactcc
 gccatcccgccccctaactccgcccagttccgcccatttccgccccatggctgactaatttttttattatgcagagggccgaggcc
 gcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggtttttggaggccctaggacgtacccaattcgccctatagttagtctgt
 attacgctgctcactggcgtgtgtttacaacgtcgtgactgggaaaacccctggcgttaccctaacttaalcgcttgcagcacat
 ccccttctgccagctggcgttaatagcgaagaggcccgaccgatcgccctcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatg
 ggacgcgcctgttagcggcgcatlaagcgcggcggtgtgtgtgttacgcgcagcgtgaccgtacacttgccagcgccctag
 cggccgctcttctgcttcttccctccttctcgcacgttgcggcgttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttagggctc
 cgatttagtcttacggcacctcgacccccaaaaaacttgattaggggtgatggttacgtagtgggccatcgccctgatagacgggt
 ttctgccccttgacgttggagtcacgttcttaataagtgactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggctattctt
 gattataagggattttgccgatttgcgctattgttataaaaaatgagctgatttaacaaaaaattaacgcgaatttaacaaaaatata
 acgcttacaatttaggtggcacttttggggaaatgtgcgcggaacccctattgtttattttctaaatacatcacaatatgtatccgct
 catgagacaataaccctgataaatgcttcaataatagcacctagatcaagagacaggatgaggatcgttgcgatgattgaaca
 agatggattgcacgcaggttctccggccgttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggtgctct
 gatgcgcgcgtgttccggctgtcagcgcagggcgccgggttctttgtcaagaccgacctgtccggtgcctgaatgaactgca
 agacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacggcgcttctgtgcagctgtgtcgcagctgtcactgaagcgggaa
 gggactggctgtattggcggaagtgcggggcaggatctcctgtcatctcaccttgcctcgcgagaaagtatccatcatggct
 gatgcaatgcggcggtcgcatacgttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaacatcgatcgagcgcagcac
 gtactcggatggaagccggtctgtgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgcagccgaactgttgcgc
 aggtcaaggcgagcatgcccagcggcgaggatctcgtgtgacctatggcgatgctgtgtgcccgaatatcatggttggaaaa
 tggccgctttctggttcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgt
 gaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgttaccggtatcgccgctcccgattcgagcgcacgcttctatcg

cctcttgacgagttcttgaattattaacgcttacaatttctgatgcggtattttctcttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatc
 aggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttattttctaaatacaattcaaatatgtatccgctcatgacccaaat
 cccttaacgtgagtttctgctcactgagcgctagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaat
 ctgctgcttgcaaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaa
 ctggcttcagcagagcgagataccaaatactgttcttagttagccgtagtaggcccaccacttcaagaactctgtagcaccg
 cctacatacctcgctctgctaatacctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggtggactcaagacgat
 agttaccggataaggcgagcggtcggtgtaacggggggtcggtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccg
 aactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgctccgaagggagaaagggcgacaggtatccggtaagc
 ggcaggggtcggaacaggagagcgacgagggagctccagggggaacgcctgggtatctttatagtcctgtcggttccgca
 cctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggtt
 cctggccttttgcctgttgcctcacaatgttcttctgctgctatccctgattctgtggataaccgtatfaccgccttgagttagctgat
 accgctcgccgagccgaacgacccgagcgagcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgcaaaccg
 cctctccccgcgcttgccgattcattaatgcagctggcagcagaggttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgc
 aattaatgtgagttagctcactcattagggaccccgaggtttacactttatgctccggctcgtatgtgtgtggaattgtgagcggata
 acaatttcacacaggaaacagctatgacctgattacgccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggag
 ctgcaagcttg

La célula madre o progenitora se obtiene de un paciente que padece CGD y se transduce con el vector de terapia génica de la invención.

5

En ciertas realizaciones, la célula progenitora o célula madre mieloide humana aislada según la invención es una célula positiva para CD-34 humana. Mientras que las células madre hematopoyéticas repoblantes a largo plazo están enriquecidas en la población de células de médula ósea CD34+ humanas, las células con capacidades de injerto a largo plazo de ratones adultos normales son Lin-, c-kit+, Sca-1+ y CD34- (Sato T., Laver J. H. & Ogawa M. (1999) Blood 94: 2548-2554). Las células madre humanas y de ratón difieren no solo en la expresión de marcadores de superficie, sino también en las condiciones de crecimiento (medio, citocinas...) para la expansión celular y para la transducción viral.

10

Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método de fabricación de una célula progenitora humana capaz de diferenciarse en una célula de monocitos o macrófagos. El método comprende las etapas de:

15

- proporcionar *ex vivo* una HSC CD34+ obtenida de un paciente que padece CGD, y

- transducir dichas HSC CD34+ con un vector lentiviral que comprende

20

- una secuencia de ácido nucleico codificante que codifica una variante funcional de un polipéptido seleccionado de gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox, p67phox y Rac2; estando la secuencia codificante bajo el control transcripcional de

25

- una secuencia promotora operable en una célula humana, particularmente en una célula mieloide,

en donde dicha secuencia promotora comprende o consiste esencialmente en la secuencia promotora de miR223 (SEQ ID NO 01).

30

La invención también se refiere a un método de tratamiento de un paciente diagnosticado de enfermedad granulomatosa crónica. Este método comprende las etapas de

- proporcionar una HSC CD34+ aislada del paciente,

35

- transducir esta HSC CD34+ con un vector lentiviral que comprende

- una secuencia de ácido nucleico codificante que codifica una variante funcional de un polipéptido seleccionado de gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox, p67phox y Rac2; estando la secuencia codificante bajo el control

transcripcional de

- una secuencia promotora operable en una célula humana, particularmente en una célula mieloide,

5 en donde dicha secuencia promotora comprende o consiste esencialmente en la secuencia promotora de miR223 (SEQ ID NO 01)

- administrar dichas HSC CD34+ al paciente.

10 La secuencia de ácido nucleico nativa del paciente que codifica el polipéptido disfuncional, que provoca CGD, se complementa con una secuencia de ácido nucleico "sano", que codifica un polipéptido funcional transduciendo la célula CD34+ con el vector de la invención. La célula HSC o progenitora así transducida (y complementada) se transfiere entonces de nuevo al paciente.

15 El vector de la invención puede usarse para transducir células progenitoras hematopoyéticas o HSC CD34+ autólogas capaces de diferenciarse en células mieloides tales como, por ejemplo, monocitos, macrófagos o neutrófilos. Las células CD34+ se obtienen del paciente que padece la enfermedad genética. Las HSC transducidas se transfieren de nuevo al paciente para que experimenten división y diferenciación en células mieloides.

20 La enfermedad genética tratada por la invención es enfermedad granulomatosa crónica, y el vector o la HSC o célula progenitora hematopoyética capaz de diferenciarse en una célula mieloide, en particular un monocito/macrófago o neutrófilo, comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante funcional o variantes funcionales de un gen seleccionado del grupo que comprende gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox, p67phox y Rac2. La HSC o célula progenitora hematopoyética comprende o está transducida por el vector.

25 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para corregir el fenotipo de CGD en células mieloides. El método comprende proporcionar una HSC o célula progenitora hematopoyética de la invención y administrar la HSC o célula progenitora hematopoyética de la invención a un paciente que padece la enfermedad.

30 En ciertas realizaciones, la HSC o célula progenitora hematopoyética de la invención se proporciona obteniendo una HSC o célula progenitora hematopoyética del paciente que padece CGD y transduciendo la HSC o célula progenitora hematopoyética con el vector como se especifica en el presente documento.

35 La enfermedad genética en las células mieloides es CGD, y la HSC o célula progenitora hematopoyética obtenida del paciente comprende o se transduce con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante funcional o variantes funcionales de gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox, p67phox y/o Rac2.

La HSC o célula progenitora hematopoyética transducida se transfiere de nuevo al paciente.

40 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras, a partir de lo cual pueden obtenerse realizaciones y ventajas adicionales. Estos ejemplos pretenden ilustrar la invención, pero no limitar su alcance.

Descripción de las figuras

45 Las figuras 1 y 2 muestran ciertas realizaciones del vector para su uso en la invención.

La figura 3 muestra que la expresión de p47phox dirigida por miR223 tras la terapia génica gammaretroviral restaura la producción de ROS y la destrucción de *E. coli* en granulocitos humanos;

50 la figura 4 muestra la restauración de la producción de ROS en macrófagos humanos de un paciente con CGD deficiente en p47phox después de la transducción de monocitos derivados del paciente tras la transducción lentiviral de monocitos;

55 la figura 5, metilación de ADN del potenciador/promotor SFFV sensible al silenciamiento (isla CpG), así como de una parte del transgén p47phox en células CD34+ humanas después de cuatro semanas en cultivo celular. Las células CD34+ se transdujeron de manera gamma-retroviral y se cultivaron durante cuatro semanas. Se aisló ADN tratado con bisulfito de sodio, se amplificó en una reacción PCR y se secuenció después de eso. Cada línea horizontal representa un resultado de secuenciación en el que el contenido de información se redujo a dinucleótidos CpG: círculos vacíos = CpG no metilados; círculos negros = CpG metilados.

60 La figura 6, expresión de GFP dirigida por miR223 en células CD11b+ tras la transducción de HSC humanas de un donante sano con un vector lentiviral que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor miR223 o el promotor SFFV, seguido de diferenciación mieloide a células CD11b+ en cultivo celular líquido.

65

Ejemplos

La presente invención se basa particularmente en el sorprendente hallazgo de que el uso del promotor miR223 en vectores de terapia génica supera ventajosamente los problemas conocidos de transactivación y/o inactivación epigenética. Esto se demostró particularmente por el vector de terapia génica LV-SIN para CGD deficiente en p47phox autosómica-recesiva. Cabe destacar que la transducción lentiviral de HSC humanas con un vector lentiviral que codifica p47phox bajo el control del promotor miR223 para el tratamiento de CGD de p47phox nunca se mostró antes.

Vectores utilizados preclínicamente para caracterizar la expresión transgénica

Se generaron datos que confirman una expresión transgénica altamente mioespecífica con vectores gamma-retrovirales y vectores lentivirales. Se muestran ejemplos de vectores gamma-retrovirales utilizados en la figura 1. El constructo de fusión ΔLNGFR-2A-p47phox da como resultado dos proteínas separadas (p47phox citoplasmática y ΔLNGFR en la superficie celular) ambas derivadas de un ARNm (v). Se muestran ejemplos de vectores lentivirales utilizados en la figura 2.

Prevención de la transactivación en HSC limitando la expresión a células mieloides

Mioloespecificidad de la actividad del promotor miR223 mostrada en estudios con animales

Se aislaron células de médula ósea negativas para el linaje de ratones p47phox^{-/-} y se transdujeron con vectores gamma-retrovirales que codifican p47phox o el constructo de fusión ΔLNGFR-2A-p47 bajo el control del promotor miR223 (figura 1). Se irradiaron letalmente ratones p47^{-/-} receptores y se les reinfundió por vía intravenosa células transducidas de médula ósea. Seis semanas después de la reinfusión, se restauraron la expresión de p47phox y la producción de ROS en granulocitos, lo que indica un injerto exitoso de células transducidas de médula ósea (Brendel *et al.*, (2013) Hum Gene Ther Methods. 24: 151-159).

En paralelo, se aislaron células de médula ósea negativas para el linaje de ratones gp91phox^{-/-} y se transdujeron con un vector LV-SIN que codifica gp91phox bajo el control del promotor miR223. Se irradiaron letalmente ratones receptores gp91phox^{-/-} y se les reinfundió por vía intravenosa células transducidas de médula ósea. Se injertaron las células transducidas, lo que conduce a la expresión transgénica y la restauración de la producción de ROS en granulocitos periféricos de estos ratones (Brendel *et al.* (2013) *ibid.*).

El análisis de la expresión transgénica reveló una especificidad de linaje extraordinaria conferida por el promotor miR223 en ambos experimentos con animales limitando la expresión transgénica casi exclusivamente a las células mieloides (Brendel *et al.* (2013) *ibid.*).

Restauración de la función de los fagocitos por la expresión transgénica dirigida por miR223 en material primario derivado del paciente

En los experimentos con animales mencionados anteriormente, la expresión de gp91phox dirigida por miR223 (vector lentiviral) así como la expresión de p47phox dirigida por miR223 (vector gamma-retroviral) restauraron la producción de ROS en fagocitos tras el tratamiento con terapia génica en los modelos animales correspondientes.

La reconstitución de la producción de ROS y la reconstitución de la destrucción de *E. coli* se sometieron a prueba en granulocitos humanos después del tratamiento de HSC con un vector gamma-retroviral y la diferenciación de células en cultivo celular. Para la detección de la expresión transgénica de p47phox citoplasmática en granulocitos vivos, los inventores generaron un vector gamma-retroviral que codifica un constructo de fusión que consiste en el marcador de superficie ΔLNGFR, unido a p47phox por medio de la secuencia 2A del virus de la fiebre aftosa. Este constructo de fusión conduce a la síntesis de dos proteínas a partir de un transcrito de ARNm, en un proceso de traducción: la proteína p47phox citoplasmática y el marcador de superficie ΔLNGFR. Esta coexpresión permite la detección indirecta de p47phox por tinción de superficie de ΔLNGFR (Wohlgensinger *et al.* (2010) Gene Ther. 17: 1193-1199). En el vector gamma-retroviral utilizado, los inventores expresaron este constructo de fusión o bien bajo el control del promotor SFFV constitutivamente activo, o bien del promotor miR223.

Los inventores transdujeron HSC humanas de un paciente con CGD deficiente en p47phox con estos vectores gamma-retrovirales, seguido de la diferenciación de las células a granulocitos en cultivo celular. La diferenciación se confirmó mediante la medición por FACS de la expresión del marcador de superficie CD11b granulocítico. La detección del marcador de superficie ΔLNGFR indicó indirectamente la expresión de p47phox.

La producción de ROS se detectó mediante un ensayo de oxidación de dihidrorodamina 123 (DHR) tras la estimulación de células con PMA o con *E. coli*. Se observó producción de ROS en granulocitos diferenciados *ex vivo* solo en células positivas para ΔLNGFR (figura 3).

Se aislaron granulocitos diferenciados (CD11b⁺) y positivos para ΔLNGFR, y células diferenciadas y negativas para ΔLNGFR (no transducidas) mediante clasificación por FACS, y se aplicaron en un ensayo de destrucción de *E. coli* como se describe (Ott *et al.* (2006) Nat Med 12: 401-409). En este ensayo, la destrucción exitosa de *E. coli* da como

resultado un aumento de DO420 nm. De manera importante, usando el vector gammaretroviral SIN p47phox miR223, se restauraron la expresión del transgén p47phox, la producción de ROS y la destrucción de *E. coli* a cantidades similares a las de un vector gamma-retroviral SIN p47phox en el que la expresión transgénica está dirigida por el promotor SFFV fuerte constitutivamente activo (figura 3).

La figura 3 muestra que la expresión de p47phox dirigida por miR223 restaura la producción de ROS y la destrucción de *E. coli* en granulocitos humanos. Las HSC negativas para el linaje de un paciente con CGD de p47phox se transdujeron de manera gamma-retroviral con el constructo de coexpresión de Δ LNGFR/p47phox bajo el control del promotor SFFV o miR223, y se diferenciaron a granulocitos CD11b+. Los granulocitos que expresan Δ LNGFR/p47phox se clasificaron por FACS, y se aplicaron en un ensayo de destrucción de *E. coli*. Un aumento en la DO420 nm indica la restauración de la destrucción de *E. coli*.

La restauración de la función de los fagocitos también se mostró en material primario derivado del paciente con CGD de p47phox. Se usó el vector lenti_miR223_p47_WPREmut6 (figuras 2 y 4) para transducir monocitos de un paciente con CGD deficiente en p47phox. Los monocitos transducidos se diferenciaron a macrófagos durante siete días, lo que dio como resultado macrófagos CD14+/CD206+. La expresión del transgén p47phox se confirmó por tinción intracelular de FACS, y la producción de ROS tras la estimulación con PMA se confirmó en un ensayo de reducción de nitroazul tetrazolio (NBT) (figura 4).

La figura 4 ilustra la restauración de la producción de ROS en macrófagos humanos de un paciente con CGD deficiente en p47phox. Se aislaron monocitos de un paciente con CGD de p47phox de la sangre, se transdujeron con el vector LV-SIN lenti_miR223 p47_WPREmut6 y se diferenciaron a macrófagos. La diferenciación a macrófagos CD14+/CD206+ y la restauración de la expresión de p47phox se confirmaron mediante FACS (izquierda). La restauración de la producción de ROS tras la estimulación con PMA se confirmó mediante un ensayo de NBT. Flecha amarilla: positivo para NBT, es decir, producción de ROS, macrófagos, flecha vacía: macrófago negativo para NBT.

Prevención de la inactivación epigenética de la expresión transgénica

Cinética de inactivación epigenética in vivo y en cultivo celular

En el primer estudio clínico de terapia génica con X-CGD con éxito temporal, la expresión transgénica estaba dirigida por el promotor/potenciador gammaretroviral dentro de la LTR viral. La inactivación epigenética de la expresión transgénica comenzó aproximadamente un año después de la terapia génica, manifestándose en una discrepancia creciente entre el marcaje génico y la función génica en el plazo de 1,5 años después (Siler *et al.* (2015) *Current Gene Therapy* 15: 416-427). La secuencia del promotor/potenciador dentro de la LTR del vector gamma-retroviral utilizado corresponde al promotor/potenciador SFFV utilizado en diversos vectores como promotor ubicuamente activo. Este promotor SFFV se sometió a prueba para determinar su susceptibilidad a la modificación epigenética en animales con CGD tres y seis meses después del tratamiento de terapia génica. La inactivación epigenética del promotor SFFV por metilación de ADN en ratones ya era detectable después de tres meses y aumentó posteriormente a lo largo del tiempo (Zhang *et al.* (2010) *Mol Ther* 18: 1640-49).

Las células en un estado de diferenciación muy primitivo como las líneas celulares de carcinoma embrionario (He *et al.* (2005) *J Virol* 79: 13497-508), células madre embrionarias (Liew *et al.* (2007) *Stem Cells* 25: 152128) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (Hotta y Ellis (2008) *J Cell Biochem* 105: 940-8) se conocen por su alta actividad de metilación del ADN. La inactivación epigenética del promotor de SFFV dentro de un vector lentiviral por células de carcinoma embrionario P19 ya es detectable de seis a 12 días después de la transducción de las células (Zhang *et al.* (2010) *ibid.*).

Actividad anti-silenciamiento novedosa del promotor miR223

Los inventores sometieron a prueba la susceptibilidad del promotor miR223 a la metilación del ADN en células P19 y en una línea celular p47phox iPSC.

Dentro de un vector lentiviral (figura 2), un promedio del 57,1 % de los CpG dentro del promotor miR223 y más del 70 % de los CpG dentro del promotor SFFV estaban metilados en células P19 después de 20 días (datos no publicados). Como las células P19 no pueden diferenciarse en el linaje mielóide (a fagocitos) y como el promotor miR223 es un promotor mieloespecífico, los inventores sometieron a prueba su vector lentiviral que codifica p47phox bajo el control del promotor miR223 en iPSC derivadas de pacientes con CGD de p47phox (iPSC CGD1.1; Jiang *et al.* (2012) *Stem Cells* 30: 599-61) ya que estas células poseen una alta actividad de metilación del ADN y pueden propagarse a fagocitos.

Se transdujeron células iPSC CGD1.1 con un vector lentiviral que codifica p47phox bajo el control del promotor miR223 (véase la tabla 1 a continuación) a una multiplicidad de infección de 2 (MOI 2, es decir, dos veces el número de partículas víricas que células).

Comenzando el día +13 después de la transducción, las iPSC se propagaron en primer lugar a "cuerpos embrioides"

y además a “fábricas de monocitos” liberadoras de monocitos. Los primeros monocitos pudieron entonces recogerse comenzando el día +43 después de la transducción. Los monocitos recogidos se diferenciaron adicionalmente a macrófagos mediante incubación de siete días en medio suplementado con M-CSF.

Se determinó el número promedio de copias del vector de terapia génica por genoma (VCN) por qPCR el día +16 en iPSC, así como el día +85 en monocitos recogidos. La expresión de p47phox se cuantificó por análisis de citometría de flujo (FACS) el día +6, +10, +16, +20 en iPSC, el día +23 en células madre CD133+ dentro de cuerpos embrioides, en células CD38dim/CD34+ en cuerpos embrioides el día +104, en células CD14+ el día +52, en células CD15+ el día +48, en células CD206+ el día +68. Se determinaron el porcentaje de células positivas para p47phox por número de copias de vector y la intensidad fluorescente media (MFI) derivada de FACS de células positivas para p47phox para comparar la actividad del promotor miR223 en poblaciones de células individuales.

El análisis de la expresión de p47phox en diversas etapas de diferenciación reveló que, a nivel de células madre promedio (iPSC, células CD133+, células CD34+) (n=6), la expresión de p47phox dirigida por miR223 apenas era detectable, con el porcentaje de células positivas para p47 por número de copias de vector de 0,67+/-0,33 (desv. est.). Tras la diferenciación mieloide, la expresión de p47phox aumentó fuertemente, con un porcentaje de células positivas para p47 por número de copias de vector de 5,26+/-0,66. Este aumento en el porcentaje de células que expresan p47phox discurrió en paralelo con un fuerte aumento en la intensidad de la señal de FACS (MFI), lo que indica fuertemente una activación del promotor miR223 tras la diferenciación del nivel de células madre a células mieloides.

La restauración mediada por terapia génica de la producción de p47phox en granulocitos, monocitos y macrófagos generados a partir de iPSC con CGD de p47phox transducidas dio como resultado la restauración de la producción de ROS como se reveló en un ensayo de oxidación de dihidrorodamina 123 (DHR) y en un ensayo de reducción de nitroazul tetrazolio (NBT).

En paralelo con el análisis de la actividad del promotor miR223 en diversos niveles de diferenciación entre iPSC y células mieloides (granulocitos, monocitos, macrófagos), el análisis de la metilación del ADN del promotor miR223 dentro del vector de terapia génica y del gen de promotor miR223 endógeno dentro del genoma de las células transducidas se realizó en iPSC el día +20 después de la transducción, y en monocitos obtenidos de iPSC transducidas tras la diferenciación el día +85 después de la transducción de iPSC. El análisis de iPSC y monocitos derivados de iPSC tras la transducción con el vector que comprende p47phox bajo el control del promotor SFFV sensible al silenciamiento sirvió como control.

Este análisis (tabla 1) reveló que, en paralelo con células P19 a nivel de células madre, la gran mayoría (>80 %) de los dinucleótidos CpG del promotor miR223 estaban metilados, dentro del promotor miR223 codificado por el vector de terapia génica, así como dentro del promotor del gen de miR223 endógeno nativo en el genoma de las células transducidas. En un nivel funcional, el promotor miR223 metilado era inactivo, como se mostró por el análisis de expresión de p47phox.

Análisis de metilación del ADN del promotor en iPSC (día +20) y monocitos derivados de iPSC (día +85) después de la transducción de iPSC con un vector lentiviral			
% de CpG metilados +/- EEM	MiR223 codificado viral	Promotor del gen de miR223 endógeno	Promotor SFFV
En iPSC	86,8 % +/-4,8	80,0 +/-7,5	72,4 +/-9,7
En monocitos	31,3 +/-4,0	20,8 +/-7,4	70,6 +/-6,3
Valor p (iPSC frente a monocitos)	<0,001	<0,001	>0,05

Tabla 1: Análisis de metilación del ADN del promotor miR223 codificado por el vector de terapia génica y del promotor del gen de miR223 nativo a nivel de iPSC (células madre progenitoras inducidas) (día +20) y en monocitos derivados de iPSC el día +85 después de la transducción de iPSC. Un vector que codifica el promotor SFFV sensible al silenciamiento sirvió como control. El cambio en la desmetilación del ADN del promotor miR223 fue estadísticamente significativo.

Sorprendentemente, los inventores descubrieron que el promotor miR223 inicialmente metilado dentro del vector de terapia génica analizado y el promotor del gen de miR223 genómico nativo se desmetilaron ambos tras la diferenciación mieloide (tabla 1).

En paralelo a un aumento en la actividad del promotor, el porcentaje de metilación de dinucleótidos CpG dentro del promotor miR223 disminuyó del 87 % al 31 %.

En el ensayo clínico previo de terapia génica de X-CGD (forma de CGD deficiente en gp91phox) gamma-retroviral de los inventores, la expresión transgénica estaba dirigida por un promotor constitutivamente activo (SFFV). Un aumento gradual en la metilación del promotor codificado por vector de terapia génica provocó clínicamente una disminución gradual en la eficacia terapéutica a lo largo del tiempo (Ott *et al.* (2006) Nat Med 12: 401-409; Siler *et al.* (2015) Curr

Gene Ther 15: 416-427). En este ensayo, el promotor constitutivamente activo se metiló en HSC, y dio como resultado una liberación de HSC de la médula ósea con el promotor metilado dentro del vector de terapia génica, y por lo tanto con expresión transgénica terapéutica disminuida.

Utilizando el promotor mieloespecífico miR223 como promotor interno dentro de un vector de terapia génica, el patrón de metilación observado sorprendentemente indica que el promotor es inactivo y está metilado a nivel de células madre. Solo tras la diferenciación, el promotor miR223 se activa y se desmetila. Esto indica fuertemente que este promotor es capaz de proporcionar eficacia a largo plazo. Como hay un flujo continuo de células mieloides derivadas de HSC que se liberan de la médula ósea, en estas células recién producidas, el promotor miR223 se desmetiló activamente antes de la liberación de la médula ósea.

Cinética de metilación del ADN del promotor

En un experimento de cultivo celular, los inventores introdujeron el promotor SFFV en células de médula ósea CD34+ humanas mediante transducción gamma-retroviral, cultivaron las células durante cuatro semanas y cuantificaron la metilación del ADN después de eso. Los inventores no pudieron detectar cantidades significativas de metilación de ADN en células CD34+ humanas después de cuatro semanas en cultivo celular (figura 5).

Se notificó que el silenciamiento del promotor SFFV *in vivo* en la médula ósea de ratón se volvió detectable tres meses después de la terapia génica, y progresó adicionalmente en los siguientes tres meses (Zhang *et al.* (2010) *ibid.*).

Se notifica que los vectores retrovirales se silencian inmediatamente en células madre pluripotentes, incluidos embriones de preimplantación temprana, células madre embrionarias (ES) y células de carcinoma embrionario (EC) (Pannell D, Ellis J. (2001) Rev Med Virol 11: 205-217). La línea celular de carcinoma embrionario P19 se ha utilizado intensamente para someter a prueba la susceptibilidad de los promotores dentro de los vectores de terapia génica al silenciamiento (Knight *et al.* (2012) J Virol 86: 9088-95; Brendel *et al.* (2012) Gene Therapy 19: 1018-29; Zhang, Santilli & Thrasher (2017) Sci Rep. 7: 10213; Zhang *et al.* (2010) *ibid.*). El silenciamiento del promotor SFFV se notifica constantemente en este modelo que ya ha finalizado después de 12 a 17 días.

Puesto que las células P19 no pueden diferenciarse, este modelo no es compatible con promotores específicos de tejido de prueba. Mientras tanto, se sabe que la expresión retroviral está silenciada en células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (Maherali *et al.* (2007) Cell Stem Cell 1: 55-70; Okita, Ichisaka & Yamanaka (2007) Nature 448: 313-317; Wernig *et al.* (2007) Nature 448: 318-324), que tienen la capacidad de diferenciarse en cultivo celular en cualquier tipo de célula. Se generaron iPSC a partir de material del paciente con CGD. Se demostró que estas iPSC tienen el mismo defecto genético que se encontró en el material del paciente. Las células pueden diferenciarse a monocitos y macrófagos maduros, y en contraste con monocitos y macrófagos de iPSC sin CGD, los monocitos y macrófagos derivados de iPSC con CGD no muestran producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como es cierto para monocitos y macrófagos de pacientes con CGD (Jiang *et al.* (2012) Stem Cells 30:599-611).

Tras la introducción retroviral del promotor SFFV en iPSC con CGD, el promotor SFFV, que se silenció *in vivo* en médula ósea humana en el ensayo clínico de X-CGD comenzando después de 10 meses, en médula ósea de ratón después de 3 a 6 meses, y que se silenció en células P19 después de 12 a 17 días, se silenció en iPSC con CGD en el plazo de 20 días (Hänseler *et al.* (2018) Matters; doi.: 10.19185/matters.201805000005). Tras la diferenciación de iPSC con CGD que albergan el promotor SFFV, la expresión transgénica dirigida por el promotor SFFV disminuyó fuertemente en monocitos y macrófagos diferenciados terminalmente. Esto muestra que 1) las iPSC tienen una fuerte actividad de silenciamiento del promotor, 2) el promotor SFFV, una vez silenciado, permanece silenciado tras la diferenciación celular de iPSC a monocitos (Hänseler *et al.* (2018) Matters; doi.: 10.19185/matters.201805000005). Se habían usado iPSC para el desarrollo de sistemas que evitan el silenciamiento de promotores ubicuamente activos como el promotor SFFV. Estos sistemas anti-silenciamiento se basan principalmente en el uso de aisladores (Sanchez-Hernandez *et al.* (2018) Mol Ther Nucleic Acids 13: 16-28) o en el uso del elemento de apertura de cromatina ubicuo (UCOE) (Pfaff *et al.* (2013) Stem Cells 31: 488-99; Ackermann *et al.* (2014) Biomaterials 35: 1531-42; Hoffmann *et al.* (2017) Gene Ther. 24: 298-307).

En resumen, las iPSC son un modelo relevante para el análisis de la metilación del vector de terapia génica, pero este modelo nunca se había aplicado para analizar la susceptibilidad de promotores específicos de tejido al silenciamiento.

Análisis del promotor miR223 específico de tejido por su susceptibilidad al silenciamiento

Para el análisis de la susceptibilidad al silenciamiento del promotor miR223, los inventores utilizaron iPSC, que se desarrollaron a partir de un paciente que padecía CGD deficiente en p47phox (iPSC con CGD de p47phox) y que fueron capaces de diferenciarse en monocitos y macrófagos que mostraban el fenotipo de CGD (Jiang *et al.* (2012) Stem Cells 30:599-611).

Se transdujeron iPSC con CGD de p47phox lentiviralmente (día +1) con el vector de terapia génica de los inventores (UZH1p47CGD), o con un vector lentiviral que codifica p47phox bajo el control de una versión constitutivamente activa y resistente al silenciamiento del promotor SFFV (Lenti UCOE 1662fwd SFFV p47). Se diferenciaron iPSC transducidas

en primer lugar a cuerpos embrioides (EB), luego además a monocitos y macrófagos. El número promedio de copias del vector por célula (VCN) se determinó por qPCR en iPSC el día +16, y en monocitos el día +85 después de la transducción. Se monitorizó la expresión transgénica en células madre positivas para CD133 en cuerpos embrioides el día +23, en células CD38^{dim}/CD34⁺ dentro de cuerpos embrioides (que son células comparables a HSC) el día +104, en monocitos el día +52 y en macrófagos el día +68 después de la transducción. La expresión de p47phox se detectó mediante análisis de FACS tras la tinción intracelular de la proteína p47phox en combinación con tinción de superficie de CD34, CD38, CD14 y CD206. Para corregir las diferencias en las eficiencias de transducción, los porcentajes de células positivas para p47phox se dividieron entre el VCN.

Expresión del transgén p47phox:

En iPSC y en el homólogo derivado de iPSC de HSC, es decir, las células CD38^{dim}/CD34^{alto} dentro de los cuerpos embrioides (de ahora en adelante en este contexto denominadas "HSC"), el promotor miR223 dentro del vector de terapia génica de los inventores UZH1p47CGD dio como resultado una expresión transgénica de p47phox marcadamente más débil, medida por la intensidad de la señal, y un bajo porcentaje de células positivas para p47phox por número de copias del vector. Por el contrario, en monocitos y macrófagos diferenciados, la intensidad de la señal y el porcentaje de células positivas para p47phox por número de copias del vector fueron altos en las células transducidas (véase la siguiente tabla 2).

Inducción de la expresión de p47phox tras la diferenciación		en células madre CD133+ derivadas de iPSC	en células CD34+ similares a HSC derivadas de iPSC	en monocitos CD14+ derivados de iPSC	en macrófagos CD206+ derivados de iPSC
% de p47+/VCN	SFFV	14,7	3,4	6	4,6
	miR223	0,6	0,2	5,5	5,7
MFI de células p47+	SFFV	0,96	3,56	1,56	1,8
	miR223	0,57	1,93	2,39	3,75
	Control de CGD	0,48	3,09	1,12	1,22
Inducción en veces de MFI en rel. con el contr.	SFFV	2	1,15	1,39	1,48
	miR223	1,19	0,62	2,13	3,07

Tabla 2: muestra la expresión del transgén p47phox en iPSC y poblaciones de células derivadas de iPSC caracterizadas por el porcentaje de células positivas para p47phox por número de copias de vector (VCN) y por la intensidad de señal fluorescente media derivada de citometría de flujo (MFI). Se transdujeron iPSC negativas para p47phox lentiviralmente y se propagaron por medio de cuerpos embrioides a monocitos y a macrófagos. Se determinó el número promedio de copias del vector (VCN) en iPSC, y en monocitos derivados de iPSC. La expresión transgénica se monitorizó en células madre CD133+, en células CD34+ similares a HSC dentro de cuerpos embrioides, en monocitos y en macrófagos. La expresión de p47phox se detectó mediante análisis de FACS tras la tinción intracelular. Los porcentajes de células positivas para p47phox se normalizaron para las eficiencias de transducción mediante el cálculo del porcentaje de células positivas para p47 por VCN. La expresión de p47phox dirigida por miR223 mostró una expresión marginal en células CD133+ y en células CD34+ y un aumento en la expresión tras la diferenciación como lo revela el porcentaje de células positivas para p47phox, así como en MFI.

De manera importante, el promotor miR223 dirigió la expresión de p47phox que condujo a una baja señal de fondo (porcentaje de células positivas/VCN), así como fuerza de expresión (MFI) en células madre. La baja señal de fondo en las células madre indica un excelente perfil de seguridad del vector de terapia génica UZH1p47CGD.

Se transdujeron HSC humanas de un donante sano con un vector lentiviral que codificaba GFP bajo el control del promotor SFFV o miR223, seguido de diferenciación a células mieloides positivas para CD11b en cultivo celular líquido. La expresión de GFP se analizó en células positivas para CD11b derivadas de HSC humanas mediante análisis de FACS. La detección de células mieloides derivadas de HSC humanas positivas para GFP (figura 6, datos no publicados) estaba en línea con un número de copias del vector (VCN) de 0,05 y muestra la actividad de expresión transgénica del promotor miR223 en células mieloides derivadas de HSC humanas según se requiere para el tratamiento de terapia génica de CGD.

Reconstitución de la producción de ROS:

Se monitorizó la producción de ROS en monocitos y macrófagos mediante oxidación de DHR y mediante ensayo de reducción de NBT tras la estimulación con PMA (monocitos) o con PMA+fMLP (macrófagos). En el ensayo de DHR, la dihidrorodamina no fluorescente se vuelve fluorescente tras la oxidación por ROS. Las intensidades de la señal de fluorescencia se detectaron mediante análisis de FACS. De manera correspondiente, en el análisis de FACS, un

desplazamiento a la derecha indica la restauración de la producción de ROS. En el ensayo de NBT, la formación de precipitados de formazán azul oscuro indica la producción de ROS. Monocitos/macrófagos de iPSC con CGD no transducidos sirvieron como controles negativos. Como control positivo sirvieron monocitos/macrófagos obtenidos de iPSC con CGD, que se transdujeron con un vector que codifica p47phox bajo el control de una versión ubicuamente activa y resistente al silenciamiento del promotor SFFV (Lenti UCOE1662fwd SFFV p47).

La expresión de p47phox dirigida por miR223 mediante el vector de terapia génica de los inventores UZH1p47CGD dio como resultado la reconstitución de la producción de ROS y, por lo tanto, la corrección del fenotipo de CGD, como se visualiza tanto en el ensayo de DHR como en el ensayo de NBT.

Análisis de silenciamiento (metilación del ADN) en el modelo de iPSC:

Los inventores utilizaron iPSC p47^{-/-} para someter a prueba la metilación de su vector de terapia génica (UZH1p47CGD) y la actividad de expresión transgénica tras la diferenciación de iPSC a fagocitos. Se transdujeron iPSC negativas para p47phox lentiviralmente y se propagaron a monocitos. Se aisló ADN de iPSC transducidas (día +20) y de monocitos derivados de iPSC (d+97). Para el análisis de metilación del ADN, se expuso ADN aislado a bisulfito de sodio, que convierte solo la citosina no metilada en uracilo. La posterior amplificación por PCR convierte el uracilo en timidina. La comparación de la secuencia original con la secuencia después de la conversión con bisulfito revela la metilación del ADN, es decir, en todas las secuencias metiladas se detecta una citosina mediante secuenciación, mientras que en secuencias no metiladas se detecta timidina.

El análisis de metilación del ADN se realizó en iPSC y monocitos derivados de iPSC tras la transducción con el vector de terapia génica (UZH1p47CGD) que codifica p47phox bajo el control de miR223. El análisis de metilación cubrió toda la secuencia promotora de miR223, así como una parte del transgén p47phox. Además, los inventores analizaron la metilación del ADN de la secuencia promotora del gen de miR223 nativo del genoma de iPSC.

De manera importante, en iPSC tanto el promotor miR223 codificado por virus, así como el promotor miR223 nativo, se metilaron casi por completo en el plazo de 20 días. En consecuencia, en iPSC CD133⁺ y en células madre CD34⁺CD38⁻ derivadas de iPSC, la expresión del transgén p47phox fue extremadamente baja (véase la tabla 1 anterior).

Ni a nivel de iPSC ni en monocitos, el grado de metilación entre la secuencia promotora de miR223 codificada por el vector de terapia génica y los promotores miR223 nativos no difirió significativamente. De manera sorprendente y en contraste con los resultados obtenidos con el promotor SFFV (Hänseler *et al.* (2018) *Matters*; doi.: 10.19185/matters.201805000005), los inventores descubrieron que, tras la diferenciación de iPSC a células diferenciadas terminalmente, la metilación tanto del promotor viral como del miR223 nativo disminuyó significativamente, lo que indica desmetilación activa tras la diferenciación (tabla 1) y, por lo tanto, activación (tabla 2). Extrapolando a la situación a largo plazo *in vivo*, este hallazgo indica la actividad a largo plazo del promotor miR223, como está silenciado en HSC inactivas, se espera que el promotor miR223 se vuelva activo tras la activación y diferenciación de HSC. Como se mencionó anteriormente, se desarrollaron sistemas basados en UCOE, que pueden evitar el silenciamiento del SFFV, o del promotor Chim (Zhang, Santilli & Thrasher (2017) *Sci Rep* 7: 10213). Pero el sistema UCOE incorporado en un vector de terapia génica retroviral alberga el riesgo de alterar la metilación de ADN del ADN cerca del sitio de integración retroviral, también en HSC. Esta actividad podría, en las HSC, activar oncogenes cerca del sitio de integración del vector de terapia génica con todas las consecuencias. A diferencia del sistema UCOE, el promotor miR223 dentro del vector UZH1p47CGD se adaptó al patrón de metilación circundante en células madre y solo se desmetiló tras la diferenciación, lo que es una característica de seguridad significativa.

REIVINDICACIONES

1. Célula madre hematopoyética humana aislada o célula progenitora mieloide, transducida con un vector lentiviral, comprendiendo dicho vector lentiviral
5
- una secuencia de ácido nucleico codificante que codifica una variante funcional de un polipéptido seleccionado de gp91phox y p47phox; bajo control transcripcional de
- la secuencia promotora de miR223 caracterizada por la SEQ ID NO 01.
10
2. Célula madre hematopoyética humana aislada o célula progenitora mieloide según la reivindicación 1, en la que dicho vector lentiviral comprende o consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico caracterizada por la SEQ ID NO 02.
- 15 3. Célula madre hematopoyética humana o célula progenitora mieloide según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la célula es una célula madre hematopoyética positiva para CD34.
4. Método para preparar una preparación celular terapéutica, que comprende las etapas de:
20
a. proporcionar una preparación de células que comprende células madre hematopoyéticas, particularmente una preparación de células madre hematopoyéticas positivas para CD34, aisladas de un paciente que padece enfermedad granulomatosa crónica asociada con un defecto génico asociado con un gen defectuoso que codifica un polipéptido seleccionado de gp91phox y p47phox;
25
b. transducir dicha preparación de células con un vector lentiviral que comprende
i. una secuencia de ácido nucleico codificante que codifica una variante funcional de un polipéptido seleccionado de gp91phox y p47phox; bajo control transcripcional de
30
ii. la secuencia promotora de miR223 caracterizada por la SEQ ID NO 01.
5. Célula madre hematopoyética humana aislada o célula progenitora mieloide según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o preparación celular obtenida por un método según la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad granulomatosa crónica.
35
6. Célula madre hematopoyética humana aislada o célula progenitora mieloide para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad granulomatosa crónica según la reivindicación 5, en donde la célula es una célula autóloga.

Fig. 1

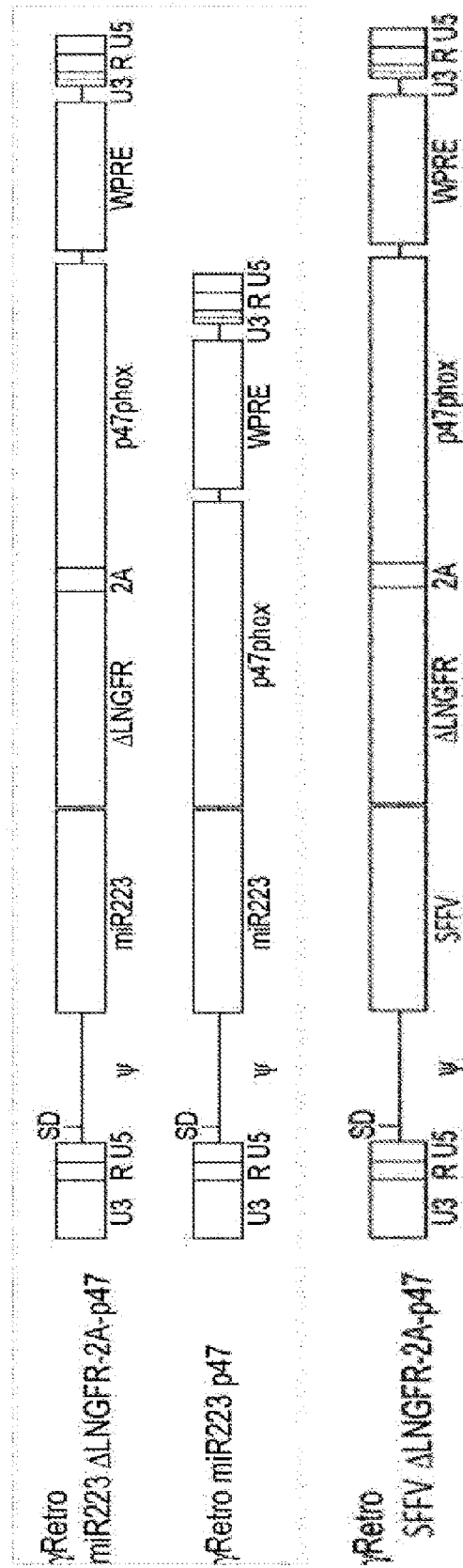


Fig. 2

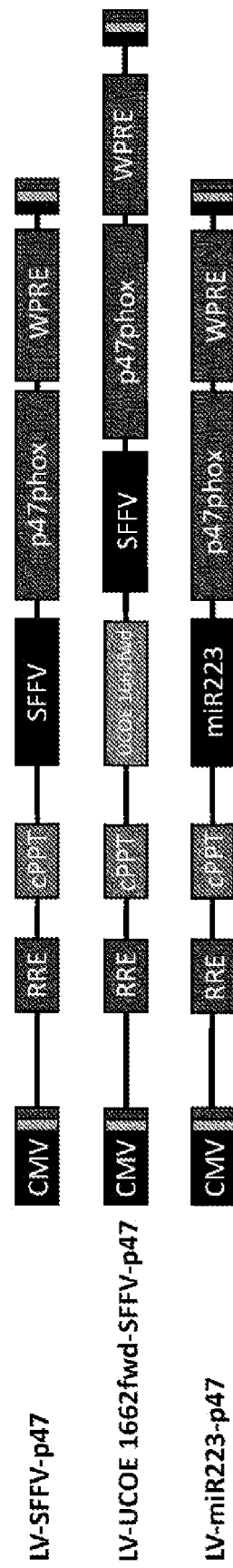


Fig. 3

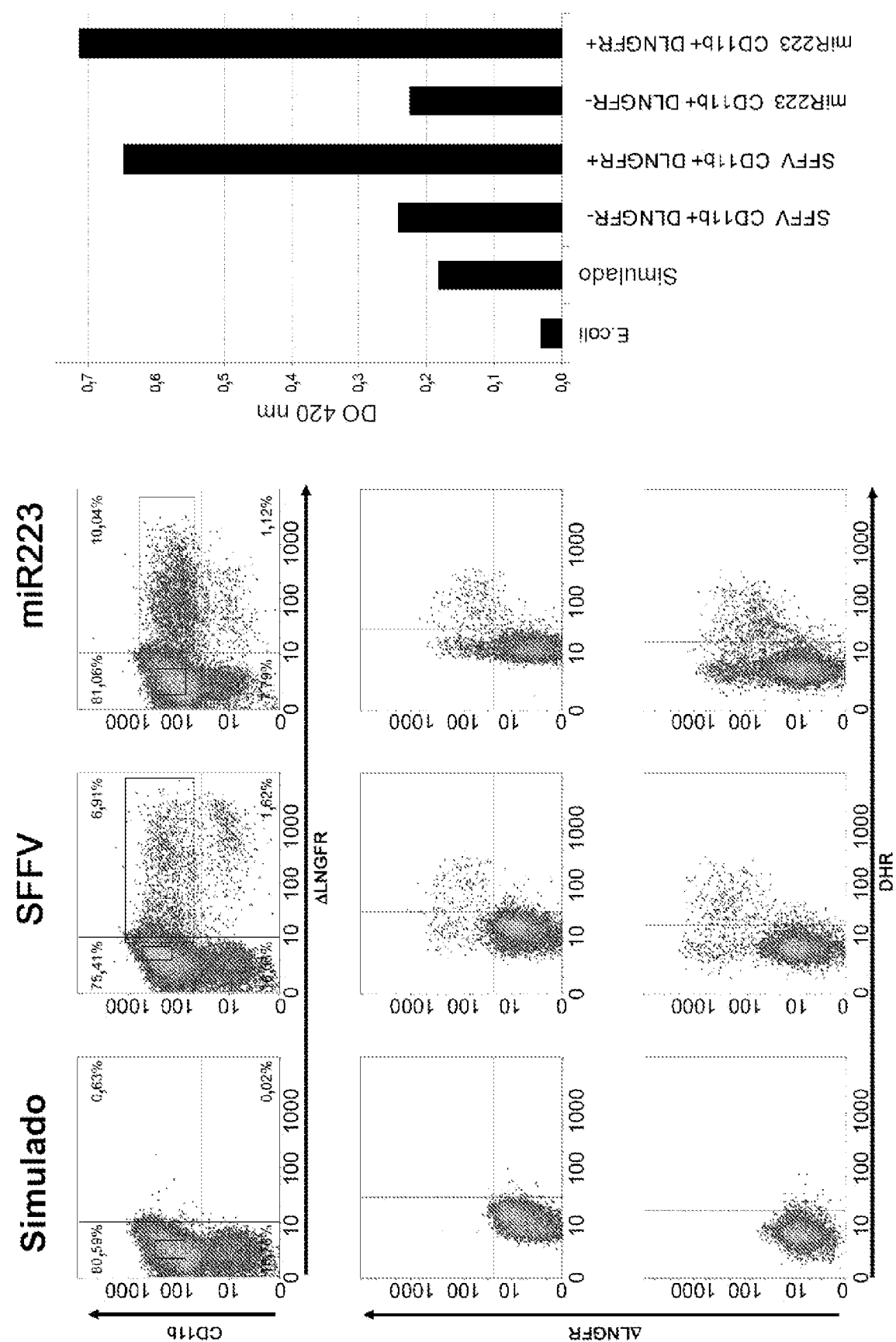


Fig. 4

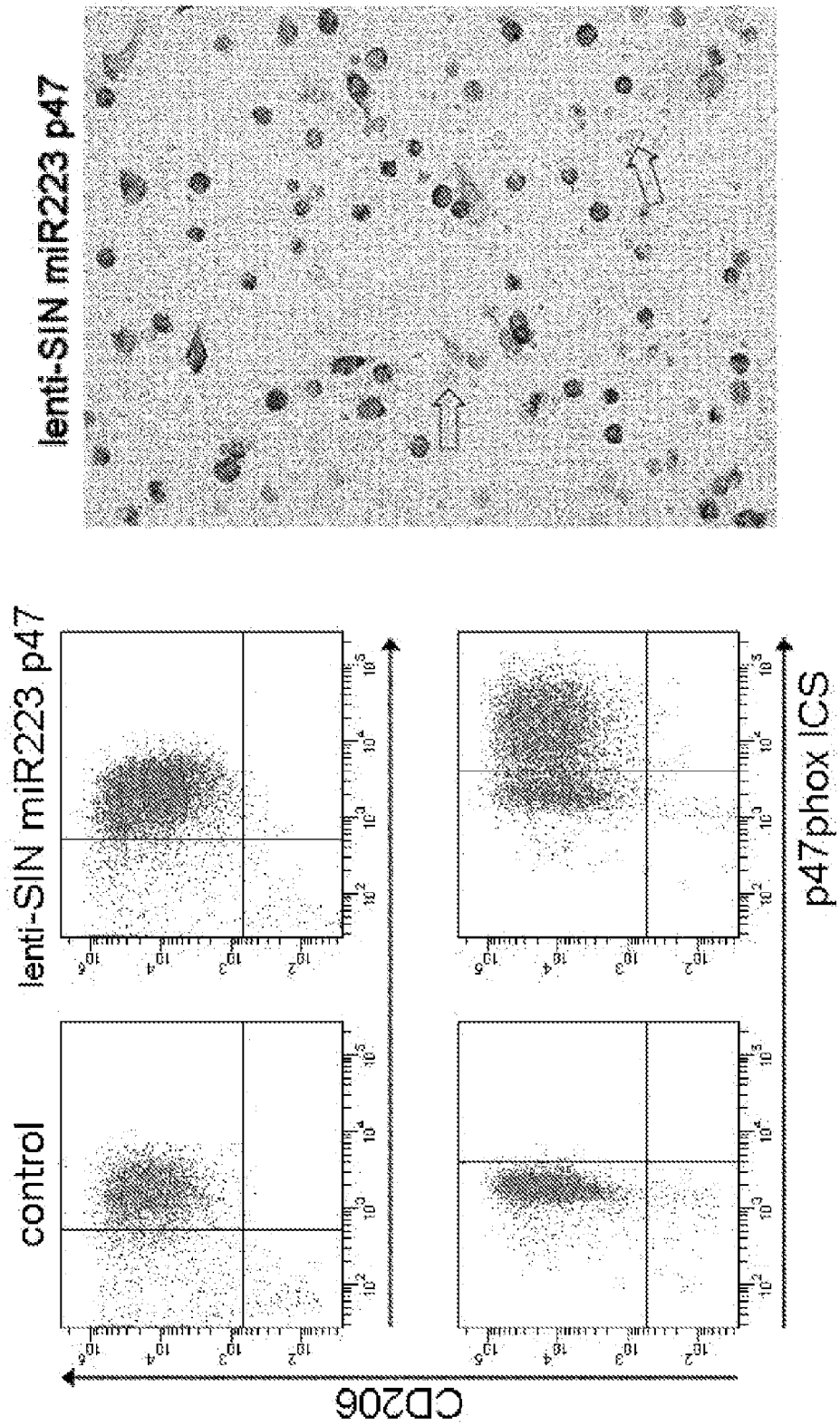


Fig. 5

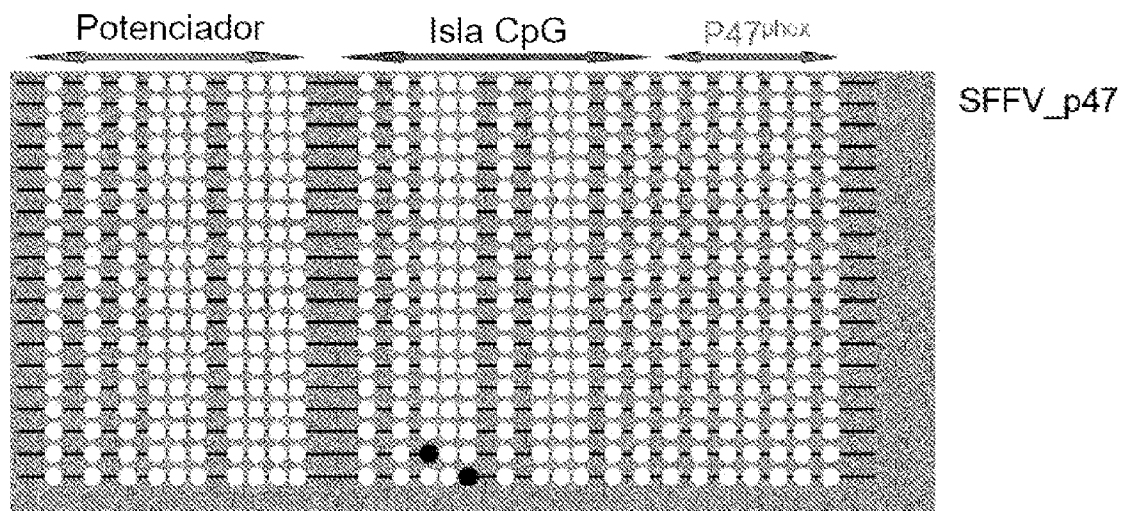


Fig. 6

