

MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE BETA-TALASEMIA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 62/828.182, presentada el 2 de abril, 2019; Solicitud Provisional de EE. UU. No. 62/930.846, presentada el 5 de noviembre, 2019; y Solicitud Provisional de EE. UU. No. 62/944.626, presentada el 6 de diciembre, 2019, cuyas descripciones se incorporan por el presente documento por referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y que se incorpora por el presente documento por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 10 de enero, 2020, se denomina 8328-0194_40_SL.txt y tiene un tamaño de 8.701 bits.

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a métodos para tratar la β -talasemia, y a terapia génica.

ANTECEDENTES

La β -talasemia es una anemia hereditaria caracterizada por la síntesis ausente o defectuosa de la cadena de globina β (Higgs y Engel (2012) *Lancet* 379(9813):373-83). El defecto causa un desequilibrio en la producción de cadenas de globina, y una reducción en la hemoglobina (que está compuesta por dos cadenas de globina α y dos de globina β). Como consecuencia del desequilibrio en las cadenas de la globina, se forman tetrámeros inestables de cadenas de globina α en las células sanguíneas rojas (RBC) o precursores de RBC, y se produce la destrucción intramedular, apoptosis, eritropoyesis inefectiva, sobrecarga de hierro, y anemia profunda (Origa, R. (2017) *Genet Med* 19(6):609-619).

Las talasemias (β y α) son las enfermedades monogénicas más comunes en el hombre. Tienen una distribución a lo largo del mundo, pero son más comunes en el sur de Asia, el subcontinente indio, el Oriente medio y las regiones mediterráneas, y el África subsahariana (Modell *et al.* (2008) *J Cardiovasc Magn Reson.* 10:42; Colah *et al.* (2010) *Expert Rev Hematol* 3(1):103-17). Se estima que aproximadamente el 1,5 % de la población global es

portador de una mutación de β -talasemia (*p. ej.*, una mutación G->C en el nucleótido 5 del IVS-I "IVS-I-5"; una mutación C>T en el nucleótido 654 de IVS-II "IVS-II-654", naciendo aproximadamente 60.000 individuos sintomáticos cada año (Galanello y Origa (2010) *Orphanet J Rare Dis.* 5:11).

La gravedad clínica de la β -talasemia está determinada por la cantidad de hemoglobina normal producida, y define tres afecciones clínicas y hematológicas, referidas clásicamente como β -talasemia menor, β -talasemia intermedia, y β -talasemia mayor. Los pacientes con β -talasemia menor tiene una anemia leve o ausente, y habitualmente son portadores asintomáticos. Los pacientes con β -talasemia intermedia tienen una anemia moderadamente grave, y pueden beneficiarse de transfusiones para mejorar su calidad de vida, pero posteriormente en su vida desarrollan frecuentemente un fenotipo dependiente de transfusión. Los pacientes con β -talasemia mayor tienen una anemia grave y requieren transfusiones de sangre frecuentes para vivir. Las morbilidades que se producen por la anemia incluyen ausencia de crecimiento sano, deformidades esqueléticas, hipertensión pulmonar, tromboembolismo venoso, cirrosis hepática, fallo cardíaco, úlceras en las piernas, y disfunción endocrina (Vichinsky *et al.* (2005) *Pediatrics.* 116(6):e818-25). Aunque hay muchas combinaciones de mutaciones en la globina β y modificadores de enfermedad genéticos que están asociados con el fenotipo dependiente de transfusión, la afección se refiere colectivamente en este estudio como β -talasemia dependiente de transfusión (TDT) (Galanello y Origa, *ibid*).

Las mejorías en los resultados de salud para los pacientes con TDT se han producido durante los últimos 50 años, ya que se acreditaron los beneficios de un programa de cuidados de apoyo. El programa consiste en transfusiones regulares de RBC, empezando tan pronto como se establece el diagnóstico y se desarrolla la anemia. Las transfusiones de RBC están acompañadas por una terapia regular de quelación del hierro para reducir la sobrecarga de hierro en los órganos vitales que está causada por las transfusiones. Este programa de cuidados de apoyo mejora significativamente la morbilidad de la TDT, sin embargo, incluso con este programa, el 20 % de los pacientes tratados tienen una esperanza de vida de menos de 40 años (Modell *et al.* (2008) *J Cardiovasc Magn Reason* 10:42). Además, el programa consume mucho tiempo y recursos, donde se estima que el tratamiento de un único paciente durante 50 años en 2011 cuesta 1.971.380\$ USD (Koren *et al.* (2014) *Mediterr J Hematol Infect Dis* 6(1):e2014012).

Actualmente, la única cura probada para TDT es el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT). El HSCT alogénico conlleva un riesgo sustancial de morbilidad crónica (*p. ej.*, enfermedad de injerto frente a huésped [GVHD]), así como un 10-15 % de riesgo de muerte sobre la base de la mortalidad a 5 años (Locatelli *et al.* (2013) *Blood* 122(6):1072-8; Baronciani *et al.* (2016) *Bone Marrow Transplant* 51(4):536-41). Además, los informes publicados muestran que la probabilidad de identificar a un donante alogénico no relacionado compatible está influida por la etnicidad del receptor; por ejemplo, entre los individuos de descendencia africana, se estima que la probabilidad de encontrar un donante adecuado es solo del 19 % (Gragert *et al.* (2014) *N Engl J Med.* 371(4):339-48). Por tanto, muchos, si no la mayoría, de los receptores carecerán de un donante con antígeno de leucocitos humano (HLA) compatible para el HSCT alogénico, lo que hace que este tratamiento curativo potencial no esté disponible.

Por tanto, todavía existe una necesidad de composiciones y métodos para tratar y/o prevenir la TDT.

RESUMEN

En la presente memoria se describen composiciones y métodos para tratar y/o prevenir la β -talasemia en un sujeto que lo necesita. La presente descripción proporciona métodos y composiciones para la edición genómica y/o transferencia génica. La presente descripción también proporciona métodos y composiciones para la terapia celular para el tratamiento de sujetos que carecen de una expresión suficiente de globina beta (*p. ej.*, sujetos β^0/β^0 o no β^0/β^0). La expresión aberrante de la globina beta en el sujeto puede estar causada por cualquiera mutación, incluyendo, pero no limitada a, una o más de las siguientes mutaciones: IVS-I-5; IVS-II-654. En algunas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria se usan para tratar la β -talasemia dependiente de transfusión (TDT). La descripción proporciona métodos para tratar a un sujeto con β -talasemia que comprenden administrar células que han sido modificadas usando nucleasas preparadas por ingeniería al sujeto en donde el sujeto se trata. Las células administradas al paciente pueden ser células autólogas (aisladas del paciente, modificadas genéticamente y reinfundidas entonces en el paciente) o alogénicas, por ejemplo, aisladas de pacientes sanos e infundidas en el paciente.

Los métodos para alterar la expresión de la hemoglobina, incluyendo para su uso en el tratamiento de TDT, como se proporcionan en la presente memoria, incluyen métodos que

dan lugar a un cambio desde la línea base de fracciones de hemoglobina de laboratorio clínico (hemoglobina de adulto, HbA y hemoglobina fetal, HbF) en términos tanto de cambios en gramos/dL de plasma como porcentaje de HbF de Hb total en un sujeto. En algunas realizaciones, el uso de los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria puede dar lugar a un cambio de los biomarcadores de enfermedad relacionados con la talasemia. En algunas realizaciones, los cambios en los biomarcadores de enfermedad relacionados con la talasemia pueden incluir, pero no están limitados a, cambios en el metabolismo del hierro y/o cambios en los niveles de eritropoyetina, haptoglobina y hepcidina. En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento pueden dar lugar a un cambio en los síntomas de un paciente asociados con la sobrecarga de hierro asociada con la terapia de transfusión en la línea base. Los cambios en los síntomas de la sobrecarga de hierro pueden incluir una disminución en la disfunción endocrina causada por la deposición de hierro en órganos endocrinos. La disfunción endocrina puede evaluarse por la medición de factores (niveles y/o actividad) tales como, pero no limitados a, hormonas tiroideas, IGF-1, cortisol matinal, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), HbA1C, y/o vitamina D. La determinación de todos los factores anteriores, incluyendo HbA, HbF, eritropoyetina, haptoglobina, hepcidina, hormonas tiroideas, IGF-1, cortisol, ACTH y vitamina D puede medirse por protocolos estándar de laboratorio clínico.

En algunas realizaciones, los usos y métodos de tratamiento descritos en la presente memoria darán lugar a una disminución de la necesidad de (uso de) transfusiones de RBC e infusión de otros productos sanguíneos incluyendo, pero no limitados a, plaquetas, inmunoglobulina intravenosa (IVIG), plasma y granulocitos en un sujeto con β -talasemia (por ejemplo, TDT). El cambio en el uso de RBC y otras infusiones de productos sanguíneos en un sujeto tratado con los métodos y composiciones de la invención puede evaluarse manteniendo un log de uso para el sujeto. El log puede usarse para calcular una frecuencia anualizada y volumen de células sanguíneas rojas empaquetadas (PRBC) después de la infusión con las composiciones descritas en la presente memoria, y en comparación con el uso pasado en el sujeto de PRBC y de otros productos sanguíneos antes del tratamiento.

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento como se describen en la presente memoria dan lugar a una disminución de la enfermedad hepática. La enfermedad hepática y la hepatomegalia son comorbilidades comunes de TDT debidas a una destrucción incrementada de las células sanguíneas rojas (RBC) y a eritropoyesis extramedular. La tasa

acelerada de eritropoyesis aumenta la absorción del hierro de la dieta desde el intestino, dando lugar a un estado crónico de sobrecarga de hierro análogo al observado en la hemocromatosis hereditaria. Los cambios en la deposición de hierro en el hígado pueden evaluarse por MRI donde la deposición de hierro en los hepatocitos y células Kupfer puede valorarse usando métodos estándar, tales como la técnica FERRISCAN® basada en R2 (Resonance Health) (véase, *p. ej.*, St Pierre *et al.* (2013) *Magn Reason Med* 71(6):2215-23).

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria dan lugar a una disminución de las anomalías cardíacas. Las anomalías cardíacas, incluyendo fallo cardíaco y arritmias mortales, son complicaciones principales de la TDT y son causas frecuentes de muerte. La terapia de transfusión durante toda la vida mejora la patología cardíaca; sin embargo, los pacientes con TDT desarrollan frecuentemente hemosiderosis cardíaca debida a la deposición de hierro miocárdica (He *et al.* (2008) *Magn Reason Med* 60(5):1082-1089). Los cambios en las anomalías cardíacas pueden evaluarse por MRI, ya que la deposición y la sobrecarga de hierro en el miocardio pueden observarse en la técnica de resonancia magnética estándar de T2* (T2 estrella) miocárdico.

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria dan lugar a una disminución de la osteoporosis y fracturas que son una complicación común de la TDT (Vogiatzi *et al.* (2009) *J Bone Miner Res* 24(3):543-57). Los cambios en la densidad mineral ósea, osteoporosis y riesgo de fractura como resultado de los métodos descritos en la presente memoria pueden evaluarse usando un escaneo de densitometría ósea estándar DXA (DXA, absorciometría de rayos x con energía dual, véase, *p. ej.*, Blake y Fogelman (2007) *Postgrad Med J* 83(982):509-517).

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria dan lugar a un cambio (*p. ej.*, reducción o incremento) de la eritropoyesis en la línea base en términos de morfología de y/tipo de células precursoras eritroides. La TDT da lugar a una hiperplasia eritroide profunda con un grado alto de células inmaduras y precursores eritroides con morfologías que frecuentemente son extrañas. Los métodos y composiciones de la invención pueden dar lugar a la presencia de menos células inmaduras y/o reducir el número de células con morfologías no típicas. Los cambios en la eritropoyesis pueden evaluarse por aspiración de médula ósea estándar que es un procedimiento clínico rutinario para caracterizar la hematopoyesis.

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria dan lugar a un cambio desde la línea base en el número y porcentaje de células F. Las células F son RBC que contienen cantidades mensurables de HbF. La evaluación de un cambio en las células F como resultado de los métodos de tratamiento puede medirse por métodos conocidos en la técnica (véase, *p. ej.*, Wood *et al.* (1975) *Blood* 46(5):671). En determinadas realizaciones, el número y/o porcentaje de células F se incrementa en un sujeto tratado como se describe en la presente memoria, en comparación con un sujeto no tratado.

En la presente memoria se describen composiciones que comprenden uno o más ARNm que codifican una o más ZFN que escinden una secuencia de BCL11A endógena (*p. ej.*, una secuencia potenciadora de BCL11A endógena). En determinadas realizaciones, el uno o más ARNm comprenden ARNm de SB-mRENH1 y/o ARNm de SB-mRENH2 (como se muestra en la SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16). También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más del mismo o diferentes ARNm, incluyendo composiciones que comprenden ARNm SB-mRENH1 y SB-mRENH2.

También se proporcionan células aisladas y poblaciones de células aisladas que comprenden uno o más ARNm y/o una o más composiciones farmacéuticas que comprenden estos ARNm. También se describen composiciones que comprenden células modificadas genéticamente y células que descienden de estas, incluyendo, pero no limitado a, la progenie de las células modificadas genéticamente. Las células de la progenie modificadas genéticamente pueden obtenerse por métodos *in vitro* (cultivo de las células modificadas genéticamente) y/o *in vivo* después de la administración de las células modificadas genéticamente a un sujeto. Por tanto, las células de la progenie modificadas genéticamente pueden incluir progenie completamente o parcialmente diferenciada que desciende de las células modificadas genéticamente. En determinadas realizaciones, las composiciones de células modificadas genéticamente comprenden células madre hematopoyéticas modificadas genéticamente (también referidas como células madre progenitoras hematopoyéticas (HPSC) o células madre/células precursoras hematopoyéticas (HSC/PC)) y/o células modificadas genéticamente que descienden o se producen (cultivan) a partir de estas, incluyendo células modificadas genéticamente en las que la secuencia BCL11A se escinde y se incrementan los niveles de hemoglobina (*p. ej.*, HbF y/o HbA) en las células (*p. ej.*, 3 a 4 veces o más) en comparación con células que no están modificadas genéticamente. Algunas, todas o ninguna de las células modificadas genéticamente de las

poblaciones de células y composiciones de células descritas en la presente memoria pueden comprender uno o más ARNm y/o composiciones farmacéuticas que comprenden estos ARNm. Por tanto, en la presente memoria se describen células, poblaciones de células y composiciones que comprenden estas células, células, poblaciones de células y composiciones que comprenden células modificadas genéticamente que comprenden los ARNm descritos en la presente memoria y células que descienden de estas. Las células, poblaciones de células y composiciones que comprenden estas células y poblaciones de células pueden comprender células autólogas y/o alogénicas. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden células modificadas genéticamente (*p. ej.*, células progenitoras eritroides tales como HPSC que presentan una expresión incrementada de globina en comparación con las células no modificadas) como se describe en la presente memoria.

También se proporcionan métodos para fabricar (preparar) células aisladas modificadas genéticamente (o poblaciones de células o composiciones que comprenden células modificadas genéticamente y células que descienden de estas), incluyendo métodos para preparar poblaciones de células modificadas genéticamente en las que una secuencia de BCL11A (*p. ej.*, secuencia potenciadora) se modifica genéticamente de manera que los niveles de hemoglobina (*p. ej.*, HbF y/o HbA) en las células modificadas genéticamente se incrementan en comparación con las células no modificadas (*p. ej.*, 2 o más veces). En determinadas realizaciones, los métodos comprenden administrar uno o más ARNm (o composiciones farmacéuticas que comprenden el uno o más ARNm) como se describe en la presente memoria a la célula (*p. ej.*, mediante transfección). Las células pueden ser autólogas y/o alogénicas y pueden ser HSPC. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además cultivar las células modificadas genéticamente para producir una composición que comprende una población de células modificadas genéticamente (*p. ej.*, células HPSC) y/o células modificadas genéticamente que descienden de estas (*p. ej.*, otras células progenitoras eritroides y/o células eritroides maduras tales como RBC) que presenta una producción incrementada de globina. Las composiciones pueden comprender células modificadas genéticamente que comprenden los ARNm y/o células modificadas genéticamente que descienden de dichas células que ya no comprenden los ARNm, pero mantienen la modificación genética (modificaciones específicas de BCL11A). También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden poblaciones de células modificadas genéticamente y/o células que descienden de estas.

Por tanto, en algunas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria se refieren a tratar a un sujeto con células que han sido modificadas *ex vivo*. En algunas realizaciones, las células se aíslan del sujeto, se modifican *ex vivo*, y se devuelven entonces al sujeto. En otras realizaciones, las células se aíslan de donantes sanos, se modifican *ex vivo*, y se usan entonces para tratar al sujeto. En realizaciones adicionales, las células aisladas de donantes sanos se modifican adicionalmente *ex vivo* para eliminar los auto-marcadores (*p. ej.*, complejos HLA) para evitar el rechazo de las células por el sujeto. En algunas realizaciones, las células aisladas son células madre. En realizaciones adicionales, las células madre son células madre/células progenitoras hematopoyéticas (*p. ej.*, HSC/PC CD34+). En algunas realizaciones, las HSC/PC CD34+ se movilizan en cada sujeto por tratamiento con una o más dosis del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). En algunas realizaciones, la dosis de G-CSF usada es aproximadamente 10 µg/kg/día. En algunas realizaciones, la una o más dosis de G-CSF se combinan con una o más dosis de plerixafor. En algunas realizaciones, la dosis de plerixafor usada es aproximadamente 240 µg/kg/día. En realizaciones adicionales, las células movilizadas se recogen por uno o más ciclos de aféresis.

Las HSPC CD34+ humanas movilizadas pueden recogerse por aféresis de sujetos sanos o con beta-talasemia y purificarse antes de la administración de (transfección con) uno o más ARNm (o composiciones farmacéuticas que comprenden el uno o más ARNm) como se describe en la presente memoria. En determinadas realizaciones, las HSPC purificadas se transfectan con ARNm de ZFN SB-mRENH1 y SBmRENH2 (SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16). Las HSPC CD34+ modificadas genéticamente transfectadas ("ST-400") pueden cultivarse, recogerse y/o congelarse para su uso. Después de la recogida, las composiciones que comprenden células modificadas genéticamente (al menos 50 %, preferiblemente al menos 70 % o más, incluso más preferiblemente al menos 75-80 % o más de las células se modifican genéticamente después de la administración del ARNm, preferiblemente se modifican específicamente en la secuencia potenciadora de BCL11A en comparación con otros loci genéticos) como se describe en la presente memoria ("ST-400") pueden incluir HSPC, así como células que descienden de estas, por ejemplo, HSPC diferenciadas en todos los linajes hematopoyéticos, incluyendo progenitores eritroides (CFU-E y BFU-E), progenitores de granulocitos/macrófagos (CFU-G/M/GM), y progenitores multipotenciales (CFU-GEMM). En determinadas realizaciones, algunas, ninguna o todas las células

modificadas genéticamente de la composición (población) de células comprenden uno o más de los ARNm.

En cualquiera de los métodos o usos descritos en la presente memoria, el sujeto tiene un diagnóstico genético molecular confirmado de β -talasemia; diagnóstico clínico confirmado de β -talasemia (*p. ej.*, TDT); es β^0/β^0 o no β^0/β^0 y/o tiene una edad entre 18 y 40 años de edad con un diagnóstico clínico de β beta-talasemia (*p. ej.*, TDT) con ≤ 8 eventos de transfusión de PRBC documentados por año en una base anualizada en el periodo de los dos años anteriores. En determinadas realizaciones, las HSPC CD34+ modificadas genéticamente se generan a partir de células obtenidas del sujeto (autólogas). En determinadas realizaciones, las HSPC CD34+ se movilizan en cada sujeto usando un tratamiento con G-CSF y plerixafor. Las HSPC CD34+ movilizadas se recogen de cada sujeto uno o más días (*p. ej.*, 3, 4, 5, 6, 7 o más días) después de la movilización por aféresis, por ejemplo, en 2 o más días consecutivos hasta que se recogen células suficientes. En determinadas realizaciones, se recogen al menos aproximadamente 1×10^4 a 1×10^7 (*p. ej.*, 25×10^6) HSPC CD34+/kg. Si es necesario, puede realizarse una segunda movilización y ciclo de aféresis 1, 2, 3 o más semanas después del primer ciclo. En determinadas realizaciones, una parte de las células recogidas se somete a modificación genética como se describe en la presente memoria y el resto se mantiene (*p. ej.*, crioconserva) en el evento en el que está indicado un tratamiento de rescate para el sujeto.

En algunas realizaciones, las células se retiran del sujeto (autólogas) y se tratan con nucleasas que están dirigidas a un gen implicado en la regulación de la producción de la hemoglobina fetal (HbF). En algunas realizaciones, el gen es un represor de la producción de HbF. En algunas realizaciones, el gen es el gen de BCL11A. En algunas realizaciones, las nucleasas están dirigidas y escinden la región potenciadora específica eritroide del gen de BCL11A. En algunas realizaciones, las nucleasas se administran a las células como ARNm. En algunas realizaciones, la escisión de la región potenciadora específica eritroide da lugar a una reparación tendente a error del sitio de la escisión por la maquinaria de reparación celular de manera que se disrumpe un sitio de unión para el factor de transcripción eritroide GATA1 (véase, Vierstra *et al.* (2015) *Nat Methods* 12(10):927-30; Canver *et al.* (2015) *Nature* 527(7577):192-7). En algunas realizaciones, las nucleasas están dirigidas a la región potenciadora específica eritroide del gen de BCL11A de manera que este no se expresa en células madre hematopoyéticas. Las regiones potenciadoras diana pueden estar en o fuera

de la región codificadora incluyendo, pero no limitado a, regiones +58, +55 y/o +62 en el intrón 2 del BCL11A endógeno, numerados según la distancia en quilibases desde el sitio del inicio de la transcripción de BCL11A, regiones potenciadoras que tienen una longitud aproximada de 350 (+55); 550 (+58); y 350 (+62) nucleótidos. Véase, *p. ej.*, Bauer *et al.* (2013) *Science* 343:253-257; las Patentes de EE. UU. Nos. 9.963.715; 10.072.066; y las Publicaciones de Patente de EE. UU. Nos. 2015/0132269 y 2018/0362926. En algunas realizaciones, las HSC/PC modificadas se evalúan antes de devolverlas al sujeto. En algunas realizaciones, las células modificadas se evalúan para determinar la presencia y tipo de mutaciones inducidas por las nucleasas en la región potenciadora de BCL11A. En algunas realizaciones, las mutaciones pueden ser inserciones de nucleótidos, deleciones de nucleótidos o ambas ("indels"). En algunas realizaciones, las células se evalúan para determinar la escisión fuera de la diana por las nucleasas. En algunas realizaciones, las células se evalúan para determinar las traslocaciones moleculares y/o para realizar el cariotipo de los cromosomas celulares después de la escisión por las nucleasas. En algunas realizaciones, las células se evalúan para determinar la actividad transcripcional fuera de la diana. En algunas realizaciones, las células se evalúan para determinar la carga de endotoxinas. En algunas realizaciones, las células pueden evaluarse para determinar una o más de las características anteriores.

En algunas realizaciones, las HSC/PC CD34+ modificadas se devuelven al sujeto a una dosis tal que se incrementa la producción de HbF y se disminuyen los síntomas clínicos de la β -talasemia. En algunas realizaciones, el sujeto se trata con uno o más agentes de acondicionamiento mieloablativos antes de la infusión con las HSC/PC CD34+ modificadas. En algunas realizaciones, el agente mieloablativo es busulfán. En realizaciones adicionales, el busulfán se usa con otros agentes tales como ciclofosfamida.

En algunas realizaciones, se administra una dosis de aproximadamente 3×10^6 células/kg a aproximadamente 20×10^6 células/kg (o cualquier valor intermedio) de las células modificadas genéticamente (*p. ej.*, mediante infusión intravenosa) al sujeto. En algunas realizaciones, las células se formulan en criomedios que se pueden infundir que contienen DMSO al 10 %. En algunas realizaciones, las células se formulan con aproximadamente $1,0$ - $2,0 \times 10^8$ células por bolsa a una concentración de aproximadamente 1×10^7 células/mL. En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, las dosificaciones de las células pueden determinarse como dosis de células total o como dosis de células CD34+,

que puede calcularse como sigue: dosis de CD34+ = [dosis de células total] x [% de CD34+]. Véase, *p. ej.*, la Tabla B, que muestra la dosis de células total en la columna 2 y el % de CD34+ en la columna 3. En algunas realizaciones, los sujetos que reciben las HSPC modificadas se monitorizan después de la infusión para determinar el injerto de las células modificadas y para evaluar la heterogeneidad de la población de células modificadas. En algunas realizaciones, pueden evaluarse la sangre periférica, médula ósea y/o diferentes poblaciones celulares individualmente para determinar la presencia de indels en el gen de BCL11A. En algunas realizaciones, se aísla el ADN genómico de las células aisladas de un sujeto tratado y se amplifica la región que comprenden la secuencia diana de BCL11A. En realizaciones adicionales, se determina el porcentaje de células modificadas en la población celular y se reensaya con el tiempo después de la dosificación para evaluar la estabilidad de la población celular modificada con el sujeto tratado.

En algunas realizaciones, los datos de la modificación se evalúan para crear un perfil de indel. En una realización adicional, el perfil de indel se monitoriza con el tiempo para determinar la probabilidad de que un tipo celular cualquiera particular (perfil de indel) crezca excesivamente de forma aberrante en la población.

En la presente memoria se describen composiciones y métodos para tratar a un sujeto con β -talasemia que comprenden células que han sido tratadas con dos polinucleótidos que codifican mitades compañeras (también referidas como una “ZFN emparejada” o “ZFN izquierda y derecha”) de una nucleasa con dedos de cinc. Opcionalmente, los polinucleótidos que codifican nucleasas comprenden además secuencias que codifican péptidos pequeños (incluyendo, pero no limitado a, etiquetas peptídicas y secuencias de localización nuclear), y/o comprenden mutaciones en una o más de las regiones del dominio de unión a ADN (*p. ej.*, el núcleo de una proteína con dedos de cinc) y/o una o más mutaciones en un dominio de escisión de la nucleasa *FokI* o semidominio de escisión. Los polinucleótidos pueden comprender opcionalmente una caperuza ARCA (Patente de EE. UU. No. 7.074.596). Cuando estos componentes de polinucleótido se usan individualmente o en cualquier combinación (*p. ej.*, secuencia peptídica tal como FLAG, NLS, WPRE, ARCA y/o señal poli A en cualquier combinación), los métodos y composiciones de la invención proporcionan incrementos sorprendentes e inesperados de la expresión de nucleasas artificiales con una eficiencia incrementada (*p. ej.*, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 20 o más veces de escisión en comparación con las nucleasas sin las secuencias/modificaciones descritas en la presente memoria) y/o

especificidad de direccionamiento. En determinadas realizaciones, en la presente memoria se describe una composición que comprende células modificadas genéticamente modificadas específicamente en el locus de BCL11A por el o los ARNm como se describe en la presente memoria, incluyendo en las que menos del 10 % (0 al 10 % o cualquier valor intermedio), preferiblemente menos del 5 % (0 al 5 % o cualquier valor intermedio), incluso más preferiblemente menos del 1 % de las células (0 al 1 % o cualquier valor intermedio) e incluso más preferiblemente menos del 0,5 % (0 al 1 % o cualquier valor intermedio) de las células modificadas genéticamente incluyen modificaciones genéticas hechas por el o los ARNm fuera del locus de BCL11A (pero pueden incluir modificaciones adicionales tal como inactivación de marcadores HLA). En realizaciones adicionales, los polinucleótidos que codifican la nucleasa con dedos de cinc pueden comprender una ZFN izquierda conocida como SB63014 (véase, la Patente de EE. UU. No. 10.563.184 y la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2018/0087072), codificada por un ARNm SB-mRENH1. En algunas realizaciones, la ZFN derecha es SB65722 (véase, la Patente de EE. UU. No. 10.563.184 y la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2018/0087072), codificada por un ARNm SB-mRENH2.

En la presente memoria también se describen células huésped, incluyendo células madre hematopoyéticas (HSPC tales como CD34+) aisladas, que comprenden las ZFN y/o polinucleótidos (*p. ej.*, ARNm) como se describe en la presente memoria. Las células pueden aislarse a partir de sujetos sanos o, alternativamente, son células autólogas obtenidas a partir de un sujeto con la afección que se va a tratar (*p. ej.*, TDT) y purificadas usando técnicas estándar. Las ZFN modifican genéticamente a las células mediante inserciones y/o deleciones después de la escisión. Posteriormente, las células expandidas (cultivadas) pueden no incluir ya las ZFN (o los polinucleótidos que codifican estas ZFN), pero pueden mantener las modificaciones genéticas en cultivo (*p. ej.*, inserciones y/o deleciones en BCL11a). En determinadas realizaciones, las modificaciones genéticas son inserciones y/o deleciones ("indels") hechas por NHEJ después de la escisión. Las células modificadas genéticamente como se describe en la presente memoria presentan diferentes relaciones de globina (niveles de globina α , β y γ) en comparación con las células no tratadas (no modificadas genéticamente). En determinadas realizaciones, la relación de globina γ a globina β y de globina γ a globina α se incrementa aproximadamente 2 a 5 o más veces, incluyendo 3 a 4 veces en comparación con las HSPC no tratadas (no transfectadas). Además, las células modificadas genéticamente descritas en la presente memoria se

diferencian en todos los linajes hematopoyéticos, incluyendo progenitores eritroides (CFU-E y BFU-E), progenitores de granulocitos/macrófagos (CFU-G/M/GM), y progenitores multipotenciales (CFU-GEMM) y presentan cariotipos y morfología normales, lo que es indicativo de una reconstitución de la hematopoyesis.

En determinados aspectos, se describen terapias *ex vivo* para TDT que usan las células modificadas genéticamente como se describe en la presente memoria. En determinadas realizaciones, las células modificadas genéticamente son células autólogas obtenidas del sujeto que se va a tratar, células que se modifican entonces genéticamente como se describe en la presente memoria y se administran de nuevo al mismo sujeto. Las células obtenidas del sujeto pueden movilizarse en el sujeto usando un tratamiento con G-CSF y/o plerixafor. Véase, la FIG. 5. En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, puede movilizarse cualquier cantidad de células, por ejemplo, se movilizan en el sujeto aproximadamente 5×10^5 , aproximadamente 10×10^5 , aproximadamente 15×10^5 , aproximadamente 20×10^5 , aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente 10×10^6 , aproximadamente 15×10^6 , aproximadamente 20×10^6 , aproximadamente 25×10^6 HSPC CD34+/kg para la modificación genética. Las células autólogas se modifican genéticamente como se describe en la presente memoria y se crioconservan (*p. ej.*, usando un congelador de velocidad controlada) según técnicas estándar teniendo cada parte alícuota (*p. ej.*, bolsa de infusión) un recuento celular total de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ a $2,0 \times 10^8$ células y pueden almacenarse en nitrógeno líquido en fase de vapor ($a < -150^\circ\text{C}$) en la instalación de la fabricación hasta que están listas para enviarse al centro del estudio clínico.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, el sujeto puede recibir una terapia de acondicionamiento antes de la terapia *ex vivo* con las células modificadas genéticamente, por ejemplo, mediante la administración intravenosa (IV) de busulfán usando una dosis y régimen efectivos. Según los procedimientos estándar, por ejemplo, el busulfán se dosifica a entre aproximadamente 0,5 a 5 mg/kg (o cualquier valor intermedio). En determinadas realizaciones, los sujetos recibirán un régimen mieloablativo de busulfán (aproximadamente 3,2 mg/kg/día; IV a través de un catéter venoso central) durante hasta 4 días (dosis total de aproximadamente 12,8 mg/kg antes de la infusión), por ejemplo, en los Días -6 a -3 antes de la infusión de las HSPC modificadas en el Día 0. El busulfán IV puede dosificarse una vez al día (total de 4 dosis) o cada 6 horas (total de 16 dosis) según las prácticas o directrices del centro del estudio. Después de la primera dosis, la dosis de

busulfán IV se ajustará sobre la base del muestreo farmacocinético y las prácticas del centro del estudio para tener como diana un área bajo la curva (AUC) de 4.000-5.000 mmoles*min para la dosificación diaria o una AUC de 1.000-1.250 mmoles*min para la dosificación de cada 6 horas para una AUC diana del régimen total de 16.000-20.000 mmoles*min. La diana farmacocinética del busulfán IV puede modificarse para los sujetos posteriores. Opcionalmente, se lleva a cabo la monitorización del fármaco terapéutico para determinar el aclaramiento del busulfán después de que se completen 4 días de la dosificación.

En determinados aspectos, las terapias *ex vivo* comprenden descongelar las HSPC modificadas genéticamente congeladas e infundir las células en el sujeto, preferiblemente en aproximadamente 15 a aproximadamente 45 minutos después de la descongelación. El volumen de las HSPC modificadas congeladas administrado se determina por el peso del sujeto. Se monitorizan los signos vitales (presión sanguínea, temperatura, frecuencia cardíaca, tasa respiratoria y oximetría de pulso) antes de la infusión y posteriormente. En determinadas realizaciones, los sujetos se monitorizan usando ensayos de sangre, así como análisis de los niveles de HbF (los niveles en la línea base de las fracciones de HbF (A y F en g/dL) y se determina el porcentaje de HbF sobre la base de la última valoración en o antes de la fecha de la primera administración de busulfán IV), función endocrina, y/o realización de MRI para valorar la carga de hierro. En determinadas realizaciones, las terapias *ex vivo* dan lugar a una recuperación de neutrófilos y plaquetas hasta los niveles normales en el sujeto con TDT desde aproximadamente dos a cuatro semanas de la infusión. Los sujetos también pueden recibir transfusiones de PRBC 0, 1 o más veces después de la infusión de HSPC. En determinadas realizaciones, en semanas (*p. ej.*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más) después de la infusión con las HSPC modificadas, los niveles de hemoglobina total permanecen estables o continúan elevándose en el sujeto.

Después de la infusión, las HSPC modificadas puede monitorizarse en el paciente para determinar la eficiencia del injerto y/o la modificación de la heterogeneidad. Esto puede hacerse, por ejemplo, determinando el perfil de la modificación genética ("indel"). Las muestras de células pueden purificarse a partir de la sangre periférica, aspirado de médula ósea u otras muestras de tejido (preferiblemente aproximadamente 5×10^4 a 1×10^7 células) y someterse al aislamiento del ADN genómico para la valoración. El aspirado de médula ósea u otras muestras de tejido pueden tomarse en diversos puntos de tiempo, incluyendo entre aproximadamente 6-9 meses.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos de tratamiento que reducen, retrasan, y/o eliminan los procedimientos de tratamiento adicionales en comparación con un sujeto que no ha sido tratado con los métodos y composiciones como se describe en la presente memoria, por ejemplo, en donde una cantidad efectiva de HSC/PC modificadas se administran a un sujeto que lo necesita, en donde el sujeto tiene una necesidad reducida, retrasada, y/o eliminada de procedimientos de tratamiento adicionales después del tratamiento. En algunas realizaciones, los procedimientos de tratamiento adicionales pueden incluir, pero no están limitados a, un trasplante de médula ósea, transfusiones de PRBC y/u otros componentes sanguíneos, y tratamientos relacionados con la terapia de quelación de hierro.

En algunas realizaciones, la ZFN útil en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria (*p. ej.*, una ZFN en la que los miembros de la pareja de ZFN (izquierdo y derecho) se administran por dos ARNm separados) incluyen ARNm designados SB-mRENH1 y SB-mRENH2. En algunas realizaciones, se administran las ZFN en la pareja específica de BCL11A (*p. ej.*, a la HSC/PC) mediante electroporación, por ejemplo, en donde un AAV comprende la ZFN izquierda (*p. ej.*, SB-mRENH1) y otro comprende la ZFN derecha (*p. ej.*, SB-mRENH2).

Por tanto, en la presente memoria se describen métodos para alterar la expresión de la hemoglobina para el tratamiento y/o prevención de la β -talasemia (por ejemplo, TDT). En determinadas realizaciones, se usa una pareja de ZFN que comprende una primera y segunda (izquierda y derecha) ZFN, concretamente una ZFN de 6 dedos que comprende una ZFP designada 63014 que comprende las regiones en hélice de reconocimiento como se muestra en la Tabla 1 (*p. ej.*, codificada por el ARNm SB-mRENH1) y una ZFN de 5 dedos que comprende una ZFP designada 65722 que comprende las regiones en hélice de reconocimiento como se muestra en la Tabla 1 (*p. ej.*, codificada por el ARNm SB-mRENH2) para alterar los niveles de hemoglobina en una célula aislada o célula de un sujeto, incluyendo para el tratamiento de TDT. La pareja de ZFN se une a un sitio diana de 33 pares de bases (combinado) en el potenciador específico eritroide del gen de BCL11A humano en la localización cr2:60,495,250-60,495,290 en el ensamblaje GRCh38/hg38 del genoma humano. En determinadas realizaciones, un ARNm codifica ambas ZFN de la pareja. Alternativamente, se emplean ARNm separados, cada uno de los cuales codifica una ZFN de

la pareja. En determinadas realizaciones, las secuencias de ARNm se muestran en el Ejemplo 1 (SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16).

Opcionalmente, los polinucleótidos que codifican nucleasas comprenden además secuencias que codifican péptidos pequeños (incluyendo, pero no limitado a, etiquetas peptídicas y secuencias de localización nuclear), y/o comprenden mutaciones en una o más de las regiones de dominio de unión a ADN (*p. ej.*, el núcleo de una proteína con dedos de cinc o TALE) y/o una o más mutaciones en un dominio de escisión de la nucleasa *FokI* o semidominio de escisión. Cuando estos componentes de polinucleótido se usan individualmente o en cualquier combinación (*p. ej.*, secuencia peptídica tal como FLAG, NLS, WPRE y/o señal de poli A en cualquier combinación), los métodos y composiciones de la invención proporcionan incrementos sorprendentes e inesperados en la expresión de nucleasas artificiales con una eficiencia incrementada (*p. ej.*, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 20 o más veces de escisión en comparación con nucleasas sin las secuencias/modificaciones descritas en la presente memoria) y/o especificidad de direccionamiento. Por tanto, según determinadas realizaciones, en la presente memoria se describen células (poblaciones de células y composiciones que comprenden estas células y poblaciones de células) específicamente modificadas genéticamente por el o los ARNm en el locus de BCL11A, incluyendo poblaciones de células modificadas genéticamente (y composiciones que comprenden estas células) en las que menos del 10 % (0 al 10 % de cualquier valor intermedio), preferiblemente menos del 5 % (0 al 5 % o cualquier valor intermedio), incluso más preferiblemente menos del 1 % de las células (0 al 1 % o cualquier valor intermedio) e incluso más preferiblemente menos del 0,5 % (0 al 1 % o cualquier valor intermedio) de las células modificadas genéticamente incluyen modificaciones genéticas hechas por el o los ARNm fuera del locus de BCL11A (pero pueden incluir modificaciones adicionales tales como la inactivación de marcadores HLA). En algunas realizaciones, la nucleasa está codificada por un ARNm y el ARNm comprende opcionalmente elementos para incrementar la eficiencia de la transcripción y de la traducción.

Los métodos y composiciones de la invención también pueden incluir mutaciones en uno o más aminoácidos en el dominio de unión a ADN fuera de los residuos que reconocen los nucleótidos de la secuencia diana (*p. ej.*, una o más mutaciones en el 'núcleo de ZFP' (fuera de la región en hélice de reconocimiento del ADN)) que pueden interaccionar no específicamente con fosfatos en el núcleo del ADN. Por tanto, en algunas realizaciones, los

métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen mutaciones de residuos de aminoácidos catiónicos en el núcleo de ZFP que no se requieren para la especificidad diana de nucleótidos. En algunas realizaciones, estas mutaciones en el núcleo de ZFP comprenden mutar un residuo de aminoácido catiónico a un residuo de aminoácido neutro o aniónico. En algunas realizaciones, estas mutaciones en el núcleo de ZFP comprenden mutar un residuo de aminoácido polar a un residuo de aminoácido neutro o no polar. En algunas realizaciones, las mutaciones se hacen en la posición (-5), (-9) y/o posición (-14) respecto a la hélice de unión a ADN. En algunas realizaciones, un dedo de cinc puede comprender una o más mutaciones en (-5), (-9) y/o (-14). En algunas realizaciones, uno o más dedos de cinc en una proteína con múltiples dedos de cinc pueden comprender mutaciones en (-5), (-9) y/o (-14). En algunas realizaciones, los aminoácidos en (-5), (-9) y/o (-14) (*p. ej.*, una arginina (R) o lisina (K)) se mutan a una alanina (A), leucina (L), Ser (S), Asp (N), Glu (E), Tyr (Y) y/o glutamina (Q). Véase, *p. ej.*, la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2018/0087072.

En algunos aspectos, los métodos y composiciones de la invención incluyen el uso de secuencias que codifican secuencias peptídicas exógenas fusionadas con secuencias transgénicas eucariotas. En algunas realizaciones, los péptidos exógenos se fusionan con secuencias proteicas después de la traducción, y en otras realizaciones, las secuencias que codifican los péptidos exógenos se unen en marco (3' y/o 5') a secuencias que codifican la nucleasa artificial (*p. ej.*, una proteína de fusión). En realizaciones preferidas, se usa una secuencia que codifica 3 secuencias FLAG (péptido 3x FLAG) (véase, la Patente de EE. UU. No. 6.379.903), en donde la secuencia de aminoácidos está en el extremo N DYKDHDG-DYKDHDY-DYKDDDDK (SEQ ID NO:1). La inclusión de una o más de dichas secuencias peptídicas (*p. ej.*, 3X FLAG) puede incrementar la actividad de la nucleasa (escisión) 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o más veces en comparación con nucleasas sin las secuencias peptídicas.

En algunos aspectos, el ARNm que codifica un nucleasa artificial comprende una secuencia peptídica de localización nuclear (NLS). En algunas realizaciones, la NLS comprende la secuencia PKKKRKV (SEQ ID NO:2) del gen T grande del virus SV40 (véase, Kalderon *et al.* (1984) *Nature* 311(5981):33-8). La inclusión de una o más de las secuencias NLS como se describe en la presente memoria puede incrementar la actividad de la nucleasa (escisión) 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o más veces) en comparación con nucleasas sin las secuencias peptídicas.

En algunas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria comprenden la dosificación de una composición de la invención (por ejemplo, las HSC/PC modificadas), por ejemplo, mediante un catéter venoso periférico. En algunas realizaciones, la composición se administra al sujeto lo que es seguido entonces de la administración de disolución salina normal (NS) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunas realizaciones, el sujeto recibe una dosis total de células modificadas de entre aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células/kg y aproximadamente 20×10^6 células/kg (o cualquier valor intermedio). Puede usarse cualquier dosis en el rango de aproximadamente $3,0 \times 10^6$ a aproximadamente 20×10^6 células/kg.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene una necesidad retrasada, reducida o eliminada, por ejemplo, de procedimientos terapéuticos adicionales después de recibir una dosis total de entre aproximadamente $3,0 \times 10^6$ a aproximadamente 20×10^6 células/kg.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un método para reducir, retrasar o eliminar los biomarcadores de enfermedad relacionados con la talasemia después del tratamiento con los métodos y composiciones en un sujeto con β -talasemia en comparación con el sujeto antes del tratamiento con los métodos y composiciones de la invención. La determinación de los biomarcadores relacionados con la talasemia, incluyendo HbA, HbF, eritropoyetina, haptoglobina, hepcidina, hormonas tiroideas, IGF-1, cortisol, ACTH y vitamina D puede medirse por protocolos estándar de laboratorio clínico, métodos que comprenden, por ejemplo, administrar al sujeto una cantidad efectiva de HSC/PC modificadas en donde el sujeto tiene biomarcadores de enfermedad relacionados con la talasemia reducidos, retrasados o eliminados después del tratamiento. En algunas realizaciones, los niveles de HbF se incrementan aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o más (o cualquier valor intermedio) después del tratamiento con los métodos descritos en la presente memoria.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un método para reducir, retrasar o eliminar el uso de transfusiones de PRBC e infusión de otros productos sanguíneos incluyendo, pero no limitado a, plaquetas, inmunoglobulina intravenosa (IVIG), plasma y granulocitos después del tratamiento con los métodos y composiciones en un sujeto con β -

talasemia en comparación con un sujeto que no ha sido tratado con los métodos y composiciones de la invención. En algunas realizaciones, el uso de PRBC y/u otro producto sanguíneo disminuye aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o cualquier valor intermedio en un sujeto tratado con los métodos descritos en la presente memoria en comparación con el sujeto antes de recibir el tratamiento. En algunas realizaciones, se elimina el uso de infusiones de PRBC y/o de otros productos sanguíneos.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un método para reducir, retrasar o eliminar los síntomas asociados con la sobrecarga de hierro en un sujeto con β -talasemia. En algunas realizaciones, los marcadores de la disfunción endocrina como resultado de la deposición de hierro en órganos endocrinos (por ejemplo, marcadores tiroideos, IGF-1, cortisol matinal, HbA1C y Vitamina D) se normalizan en un sujeto después del tratamiento con los métodos y composiciones de la invención en comparación con los niveles de los marcadores antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la sobrecarga de hierro en el hígado y el corazón disminuye en un sujeto después del tratamiento con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria en comparación con el sujeto antes del tratamiento. La sobrecarga de hierro puede evaluarse por procedimientos estándar de MRI. En algunas realizaciones, la sobrecarga de hierro detectada por MRI en el hígado y/o el corazón disminuye aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o cualquier valor intermedio en un sujeto tratado con los métodos descritos en la presente memoria en comparación con el sujeto antes de recibir el tratamiento.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un método para reducir, retrasar o eliminar los síntomas asociados con la osteoporosis y/o las fracturas óseas en un sujeto con β -talasemia. En algunas realizaciones, la densidad ósea se incrementa en sujetos tratados con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria en comparación con los sujetos antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la osteoporosis y las fracturas óseas se reducen o eliminan en un sujeto tratado con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria en comparación con el sujeto antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la osteoporosis y/o las fracturas óseas se mejoran aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o cualquier valor intermedio

en un sujeto tratado con los métodos descritos en la presente memoria en comparación con el sujeto antes de recibir el tratamiento.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un método para reducir, retrasar o eliminar la hiperplasia eritroide en un sujeto con TDT, el nivel de células inmaduras y precursores eritroides en la médula ósea en un sujeto después del tratamiento con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria en comparación con el sujeto antes del tratamiento.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un artículo de fabricación que comprende un envase (por ejemplo, una bolsa) que comprende composiciones que comprenden HSC/PC autólogas modificadas genéticamente como se describe en la presente memoria. El artículo de fabricación (*p. ej.*, bolsa) puede formularse para almacenamiento congelado, por ejemplo, en criomedio CryoStor[®] CS-10 (SigmaAldrich) que contiene DMSO al 10 %. Cada bolsa puede contener cualquier concentración de células. En determinadas realizaciones, cada bolsa contiene aproximadamente $1,0\text{-}2,0 \times 10^8$ células por bolsa a una concentración de aproximadamente 1×10^7 células/mL.

En un aspecto adicional, en la presente memoria se describen métodos para la monitorización del perfil de modificación (*p. ej.*, número y/o tipos de inserciones y/o deleciones generadas después de la escisión, típicamente por NHEJ de la secuencia escindida) de una población de células modificadas genéticamente como se describe en la presente memoria. La monitorización puede llevarse a cabo antes y/o después de la administración al sujeto para determinar si un tipo de modificación (clon) predomina en la población, ya que dicho *jackpotting* puede dar lugar a la proliferación no deseada de una población clonal particular. En determinadas realizaciones, la población de células modificadas genéticamente se monitoriza para detectar el tipo de modificación (inserciones y/o deleciones, también referido como “indel/perfil”) usando técnicas estándar tales como secuenciación o similares. En determinadas realizaciones, la población de células se ensaya antes de la administración para determinar una línea base del patrón de modificaciones (perfil de indel) y, posteriormente, monitorización después de la infusión para determinar que el perfil de indel de las células injertadas se está manteniendo, de manera que no hay un crecimiento excesivo aberrante de una población clonal de células. La monitorización puede llevarse a cabo con el tiempo (múltiples veces) antes y/o después de la infusión. Por tanto,

los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender además la monitorización de la población de células modificadas genéticamente antes y/o después de la infusión para determinar que el perfil de indel permanece inalterado con el tiempo.

A partir de la descripción en la presente memoria, se apreciará que la presente descripción engloba múltiples realizaciones que incluyen, pero no están limitadas a, las siguientes:

Células modificadas genéticamente que comprenden células precursoras de células sanguíneas rojas (RBC) que comprenden ARNm SB-mRENH1 y ARNm SB-mRENH2, ARNm que codifican una pareja de ZFN; y una modificación genómica realizada después de la escisión por la pareja de ZFN, en donde la modificación está en una secuencia potenciadora de BCL11A endógena, de manera que el gen de BCL11A se inactiva en la célula. También se incluyen células que descienden de estas.

Un método *ex vivo* para tratar una beta-talasemia (β -talasemia) en un sujeto que lo necesita, método que comprende: administrar una composición según cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria al sujeto de manera que se incrementa la producción de hemoglobina fetal (HbF) en el sujeto y uno o más síntomas clínicos de la β -talasemia disminuyen, mejoran, o se eliminan.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde la beta-talasemia es β -talasemia dependiente de transfusión.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde se consigue un cambio desde la línea base de las fracciones de hemoglobina de laboratorio clínico en gramos/dL de plasma y/o porcentaje de HbF de hemoglobina total (Hb) en el sujeto.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde el factor de hemoglobina es hemoglobina de adulto (HbA) y/o hemoglobina fetal (HbF).

Un método *ex vivo* de según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde el sujeto es β^0/β^0 o β^0/β^+ .

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde se alteran los niveles de biomarcadores de enfermedad relacionados con la talasemia después del tratamiento.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde los biomarcadores son cambios en el metabolismo del hierro; y/o cambios en los niveles de eritropoyetina, haptoglobina y/o hepcidina.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde se mejoran o eliminan los síntomas clínicos asociados con la sobrecarga de hierro o asociados con la terapia de transfusión en la línea base.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde se ensaya una disminución en la disfunción endocrina en el sujeto determinando los niveles y/o actividad de las hormonas tiroideas, IGF-1, cortisol matinal, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), HbA1C, y/o niveles de vitamina D.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde la necesidad de transfusiones de RBC e infusión de transfusión de plaquetas, transfusión de inmunoglobulina intravenosa (IVIG), transfusión de plasma y/o transfusión de granulocitos en el sujeto se reduce(n) o elimina(n).

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde el síntoma clínico reducido o eliminado en el sujeto es enfermedad hepática.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde los síntomas clínicos reducidos o eliminados en el sujeto son anomalías cardíacas.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde los síntomas clínicos reducidos o eliminados en el sujeto es/son osteoporosis y/o fracturas.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde cambia la eritropoyesis en la línea base en el sujeto después de la administración de la composición.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde la hiperplasia se reduce o elimina en el sujeto después de la administración de la composición.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde el número de células inmaduras y/o con morfologías no típicas se reduce(n) en el sujeto.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde el número y porcentaje de células F en el sujeto se modifica después de la administración de la composición.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde las células modificadas genéticamente son autólogas o alogénicas.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde las células modificadas genéticamente en BCL11A comprenden además uno o más modificaciones genéticas adicionales.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde las células modificadas genéticamente son células alogénicas y la una o más modificaciones genéticas adicionales comprenden la inactivación de uno o más auto-marcadores o antígenos.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde las células modificadas genéticamente son células madre hematopoyéticas aisladas del sujeto.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde las células madre hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas o precursoras CD34+ (HSC/PC) y las HSC/PC CD34+ se movilizan en

cada sujeto por tratamiento con una o más dosis de G-CSF y/o una o más dosis de plerixafor antes del aislamiento.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde al menos 25×10^6 HSPC CD34+/kg se movilizan en el sujeto y las células movilizadas se recogen por uno o más ciclos de aféresis.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, que comprende, además, antes de la administración de la composición que comprende las células modificadas genéticamente al sujeto y evaluar las células de la composición para determinar inserciones y/o deleciones en BCL11A.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, que comprende, además, administrar uno o más agentes de acondicionamiento mieloablativos una o más veces al sujeto antes de la administración de la composición que comprende las células modificadas genéticamente.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde el agente mieloablativo comprende busulfán y además en donde: la administración intravenosa (IV) del busulfán es entre 0,5 a 5 mg/kg una o más veces; la administración IV del busulfán es 3,2 mg/kg/día; IV a través de un catéter venoso central durante 4 días para una dosis total de 12,8 mg/kg antes de la infusión en los Días -6 a -3 antes de la infusión de la composición que comprende las células modificadas genéticamente en el Día 0; o la administración IV del busulfán es una vez al día o cada 6 horas.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde la dosis de células modificadas genéticamente administrada al sujeto es entre 3×10^6 células/kg y 20×10^6 células/kg.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde las células modificadas genéticamente administradas al sujeto se formulan con aproximadamente $1,0\text{-}2,0 \times 10^8$ células por bolsa a una concentración de aproximadamente 1×10^7 células/mL.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde las células modificadas genéticamente se crioconservan antes de la administración y se administran al sujeto en aproximadamente 15 minutos después de la descongelación.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, que comprende, además, la monitorización de los signos vitales del sujeto antes de, durante y/o después de la administración de las células modificadas genéticamente.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, que comprende, además, valorar los niveles de hemoglobina, neutrófilos y/o plaquetas en el sujeto antes de la administración de las células modificadas genéticamente para determinar los niveles de hemoglobina en la línea base en el sujeto.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde los niveles de hemoglobina, neutrófilos y/o plaquetas en el sujeto después de la administración de las células modificadas genéticamente se incrementan o permanecen estables en comparación con los niveles en la línea base durante semanas o meses después de la administración.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde el sujeto recibe una o más transfusiones de células sanguíneas rojas empaquetadas (PRBC) antes de y/o después de la administración de las células modificadas genéticamente.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde se reduce o elimina la necesidad de terapias adicionales tales como un trasplante de médula ósea, componente sanguíneo y/o terapia de quelación de hierro, transfusiones de PRBC en el sujeto.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde se reduce o elimina la necesidad de terapias adicionales en los 1-20 días después de la administración de las células modificadas genéticamente.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde el sujeto se monitoriza con el tiempo después de la administración para determinar el perfil de indel de las células aisladas de las muestras de sangre periférica, aspirados de médula ósea u otras fuentes de tejido en comparación con el perfil de indel de las células infundidas para monitorizar la estabilidad del injerto en el sujeto.

Un método *ex vivo* según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde el perfil de indel de las células se monitoriza antes de la administración al sujeto.

Un artículo de fabricación que comprende un envase que comprende una composición según la reivindicación 2 formulada en criomedio CryoStor® CS-10.

El artículo de fabricación según cualquiera de las realizaciones precedentes descritas en la presente memoria, en donde cada bolsa contiene aproximadamente $1,0-2,0 \times 10^8$ células por bolsa a una concentración de aproximadamente 1×10^7 células/mL.

Estos y otros aspectos serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica a la luz de la descripción como un todo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** es una ilustración (adaptada de Hardison y Blobel (2013) *Science* 342(6155):206-7) de los efectos de niveles bajos, elevados y altos de hemoglobina fetal en sujetos que comprenden mutaciones en la hemoglobina de adulto (por ejemplo, enfermedad de células falciformes o β -talasemia). Más a la izquierda se muestra ("hemoglobina fetal baja:") un sujeto con una mutación en la hemoglobina de adulto y ESE BCL11A de tipo salvaje, en este caso, el sujeto tiene niveles normales (bajos) de hemoglobina fetal, lo que da lugar a síntomas de la enfermedad en el sujeto. En el medio ("hemoglobina fetal elevada"), el sujeto tiene la mutación en la hemoglobina de adulto, pero también tiene mutaciones en su gen de BCL11A, de manera que la expresión de BCL11A está disminuida, pero no eliminada, lo que da lugar a niveles elevados de globina fetal. El sujeto experimenta alguna mejoría en la enfermedad debido a que la globina fetal "reemplaza" parte del funcionamiento de la globina adulta. Más a la derecha ("hemoglobina fetal alta"), el sujeto tiene la mutación en la globina de adulto, pero tiene una delección en el potenciador de BCL11A, de manera que el sujeto

presenta una expresión completa de la globina fetal. Este sujeto experimentará una mejoría incluso mayor de los síntomas gracias a la inactivación completa de BCL11A.

La **FIG. 2** representa los niveles fetales (también referido como globina gamma o globina γ) en HSC/PC CD34+ recogidas de voluntarios sanos (PB-MR-003 y PB-MR-004) y modificadas por SB-mRENH1 y SB-mRENH2. Las relaciones de globina γ (suma de los picos de la globina $A\gamma$ y la globina $G\gamma$) con respecto a la globina α y globina γ respecto a la globina semejante a β (suma de los picos de la globina $A\gamma$, $G\gamma$, β y δ) como se determina por análisis de UPLC de muestras de proteínas desde el Día 21 de la diferenciación eritroide de las HSPC modificadas se representan en las condiciones indicadas. 48 horas después de la electroporación, las células se recogieron y se congelaron. Las células se descongelaron y se usaron para estudiar la eritropoyesis y la producción de globina *in vitro*. Como se muestra, la relación de globina γ a globina β y de globina γ a globina α se incrementó aproximadamente 3 a 4 veces en la progenie eritroide de las HSC/PC tratadas en comparación con las células no transfectadas (los datos de proteínas también fueron apoyados por la medición de los niveles de ARNm de la globina γ). En cada grupo, la barra de la izquierda representa la relación de globina γ /globina α y la barra de la derecha representa la relación de globina γ /globina semejante a β total.

La **FIG. 3A a FIG. 3C** representan gráficos que muestran la frecuencia y curso temporal de las roturas de cadena doble en HSPC modificadas. La FIG. 3A muestra un curso temporal del número de focos 53BP1/célula durante 7 días después de la transfección ("dpt") (Media $\pm$ SD de focos 53BP1+/célula). La FIG. 3B y FIG. 3C muestran el porcentaje de células totales con diversos números (1 a 5+) de focos 53BP1/célula en el Día 1 (FIG. 3B) y Día 7 (FIG. 3C) después de la transfección. * $P < 0,05$ frente al control.

La **FIG. 4** es una ilustración de los conjuntos de sondas usados para detectar translocaciones cromosómicas. El panel superior representa segmentos cromosómicos que engloban el potenciador de BCL11A en el sitio diana (sólido) y un sitio no diana (con trama). El panel inferior esboza reactivos de control positivo (gBlock) para la detección de los productos correspondientes de la translocación. También se muestran las localizaciones aproximadas del cebador y sonda usados en el ensayo TaqMan. El segmento cuadrículado en cada gBlock es una secuencia única insertada en cada reactivo control para distinguirlo de un producto de translocación verdadero y permitir la monitorización de una potencial

contaminación cruzada. Los gBlock del Producto 1 se ensayaron en la región de BCL11A del fragmento. Los gBlock del Producto 2 se ensayaron en la región fuera de la diana del fragmento.

La **FIG. 5** es un esquema que representa un protocolo de tratamiento usando HSPC modificadas genéticamente (también referidas como “ST-400”). “G-CSF” se refiere al factor estimulante las colonias de granulocitos “HSPC” se refiere a células progenitoras madre hematopoyéticas; “IV” se refiere a intravenoso; “RBC” se refiere a células sanguíneas rojas; y “ZFN” se refiere a nucleasa con dedos de cinc.

La **FIG. 6A y FIG. 6B** son gráficos que representan la hemoglobina total y hemoglobina fetal en un paciente tratado con HSPC modificadas (“ST-400”) como se describe en la presente memoria (véase, *p. ej.*, la FIG. 5). La FIG. 6A muestra los niveles de hemoglobina F (% de hemoglobina) en el día indicado del estudio. La FIG. 6B muestra los niveles de hemoglobina (g/dL) en el día indicado del estudio. Las flechas muestran cuándo recibió el paciente una transfusión de PRBC. Las HSPC modificadas se administraron en el día 0. Los datos demuestran que el paciente tuvo un incremento de hemoglobina fetal hasta cerca del 31 % de la hemoglobina total 50 días después de la infusión. Los datos también demuestran que, aunque el paciente recibió típicamente PRBC cada dos semanas durante los dos años anteriores al tratamiento, el paciente no requirió ninguna PRBC entre el día 10 y el día 50 después de la infusión de ST-400.

La **FIG. 7A a FIG. 7C** representa las 10 indels más frecuentes (inserciones y/o deleciones) detectadas por secuenciación de última generación de células sanguíneas nucleadas (aspirados de médula ósea, leucocitos circulantes, o células mononucleares de sangre periférica, según disponibilidad) se muestran por paciente en cada punto de tiempo. La FIG. 7A muestra el Paciente 1; la FIG. 7B muestra el Paciente 2; la FIG. 7C muestra el Paciente 3. No se han observado una dominancia emergente preocupante para clonalidad hematopoyética con el tiempo. Convención de denominación de indel: “I” se refiere a inserción; “D” se refiere a deleción; el primer número se refiere al inicio del indel desde el par de bases de referencia (“*” se refiere a nucleótidos que flanquean el indel y podrían alinearse en cualquier lado del indel); y el número que sigue al guion se refiere al número de pares de bases insertadas o delecionadas. Como se indica, los datos del día 56 no están disponibles para el Paciente 2 (FIG. 7B).

La **FIG. 8** representa los niveles de HbF en los pacientes 1, 2 y 3 a los tiempos indicados después del tratamiento con ST-400. El genotipo causal de la beta talasemia para cada paciente también se muestra en cada gráfico.

DESCRIPCIÓN DETALADA

En la presente memoria se describen composiciones y métodos para ingeniería genómica para la modulación de la expresión de BCL11A, globina gamma, y combinaciones de BCL11A y globina gamma y para el tratamiento, prevención, o tratamiento y prevención de hemoglobinopatías. En particular, mediante el direccionamiento con nucleasas que comprenden las ZFP que tienen las regiones en hélice de reconocimiento como se muestra en una única fila de la Tabla 1, se consigue eficientemente la disrupción de un potenciador de BCL11A en HSC/PC y da lugar a un cambio en la expresión relativa de globina gamma durante la posterior eritropoyesis. Esta modulación de la expresión de BCL11A y globina gamma es particularmente útil para el tratamiento de hemoglobinopatías (*p. ej.*, beta talasemias tales como TDT, enfermedad de células falciformes) en donde hay una expresión insuficiente de globina beta o expresión de una forma mutada de globina beta. Usando los métodos y composiciones descritas en la presente memoria, las complicaciones y secuelas relacionadas con la enfermedad causadas por la globina beta aberrante pueden superarse por la alteración de la expresión de la globina gamma en las células precursoras de eritrocitos. En particular, las composiciones y métodos descritos en la presente memoria superan los problemas asociados con el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT). Estos problemas incluyen la limitación por la disponibilidad de donantes y los riesgos del fracaso del injerto y la enfermedad de injerto frente a huésped después del trasplante alogénico.

La edición génica de alta precisión de la región de unión a GATA en el potenciador específico eritroide de BCL11A intrónico en células madre o progenitoras hematopoyéticas como se describe en la presente memoria da lugar a una expresión persistentemente alta de hemoglobina fetal (HbF) sin afectar adversamente la hematopoyesis multilinaje normal. Como tales, las células modificadas genéticamente pueden usarse para el tratamiento *ex vivo* de hemoglobinopatías tales como TDT. La hemoglobina fetal (HbF) es la hemoglobina principal presente durante la gestación hasta el nacimiento. La HbF se genera combinando el producto proteico de uno de dos genes de globina semejante a β , globina G γ y globina A γ ,

conocidas colectivamente como globina γ , con la proteína globina α como tetrámeros ($\alpha_2\gamma_2$). Los niveles de HbF disminuyen progresivamente después del nacimiento al disminuir la producción de la proteína globina γ , y en alrededor de 6-12 meses de edad se reemplaza en gran medida por hemoglobina de adulto, que consiste en un tetrámero de proteínas globina β y globina α ($\alpha_2\beta_2$). De manera concomitante con esta disminución de los niveles de HbF, los síntomas de TDT se vuelven frecuentemente clínicamente evidentes en los niños. La HbF juega normalmente solo un papel menor en la fisiología de los adultos normales. Sin embargo, los estudios publicados han demostrado que los incrementos congénitos, adquiridos, e inducidos por fármacos en HbF están asociados con una morbilidad reducida y resultados clínicos mejorados en pacientes con TDT. Por ejemplo, los estudios genéticos grandes no sesgados han identificado asociaciones entre la gravedad de la enfermedad TDT y los loci de rasgo cuantitativo tales como BCL11A que está asociado con niveles incrementados de HbF (Thein *et al.* (2009) *Hum Mol Genet* 18(R2):R216-23), en donde el nivel de HbF frecuentemente es proporcional al grado de atenuación de la sintomatología de TDT (Musallam *et al.* (2012) *Blood* 119(2):364-7). Adicionalmente, hay informes de casos de fracaso de HSCT alogénicas en pacientes con TDT con rechazo del injerto que daba lugar casualmente a niveles altos persistentes de HbF, después de lo cual se reportó que los pacientes eran independientes de transfusión (Ferster *et al.* (1995) *Br. J Haematol* 90(4):804-8; Paciaroni y Lucarelli (2012) *Blood* 119(4):1091-2). La producción de HbF se incrementa con hidroxiurea (Walker *et al.* (2011) *Blood* 118(20):5664-70). Sin embargo, la hidroxiurea solo ha sido variablemente efectiva en la β -talasemia, con una mayor eficacia en β -talasemia intermedia que en TDT (Charache *et al.* (1995) *N Engl J Med* 332(20):1317-22; Ansari *et al.* (2011) *J Pediatr Hematol Oncol* 33(5):339-43; Singer *et al.* (2008) *Am J Hematol* 83(11): 842-5). Además, los efectos de la hidroxiurea son paliativos, y su uso requiere la monitorización regular para detectar citopenias y otras toxicidades.

BCL11A es un factor de transcripción que juega muchos papeles en el desarrollo y la hematopoyesis. La asociación a nivel de todo el genoma y los estudios de seguimiento funcional en modelos de células y animales han mostrado que BCL11A es un silenciador importante de la expresión de HbF. En un estudio seminal, la disrupción de BCL11A por la inactivación condicional específica eritroide en un modelo de ratón humanizado transgénico de enfermedad de células falciformes (SCD) dio lugar al fracaso del cambio de hemoglobina, mantenimiento de altos niveles de HbF, y mejorías significativas en las características hematológicas y patológicas asociadas con SCD (Xu *et al.* (2011) *Science* 334(6058):993-6).

Por tanto, la inhibición de BCL11A parece ser una estrategia potencialmente efectiva para tratar los trastornos de globina β tales como TDT y SCD en los seres humanos. Sin embargo, la toma como diana del gen de BCL11A para enfoques terapéuticos presenta desafíos debido al papel crucial de BCL11A en el desarrollo y la hematopoyesis (Brendel *et al.* (2016) *J Clin Invest* 126(10:3868-3878). Una estrategia alternativa está dirigida a un elemento potenciador específico eritroide (ESE) que está localizado en el segundo intrón del BCL11A y que se requiere para la expresión de BCL11A en las células eritroides, pero no en otros linajes. Se encontró que el elemento potenciador contenía una variación genética común asociada con mayores niveles de HbF (Bauer *et al.* (2013) *Science* 342(6155):253-7). Se plantea, por lo tanto, la hipótesis de que la modificación de este potenciador específico eritroide del gen de BCL11A podría reforzar los niveles endógenos de HbF en las células eritroides sin efectos perjudiciales sobre la función global de BCL11A (Hardison y Blobel (2013) *Science* 342(6155):206-7).

La seguridad de un sujeto después del tratamiento con HSPC modificadas es una preocupación primordial. Por tanto, en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, las HSPC modificadas pueden monitorizarse después de la infusión para valorar si las células modificadas se mantienen en el sujeto con el tiempo. Además, la NHEJ después de la escisión con nucleasas da lugar a una población de células que incluye una variedad de diferentes inserciones y/o deleciones, también referido como el perfil de indel. Las inserciones y/o deleciones (indels) pueden tener cualquier longitud y estar en cualquier combinación de inserciones y deleciones, incluyendo, pero no limitado a, nucleótidos de 0 a 10 kb delecionados; nucleótidos de 0 a 10 kb insertados; nucleótidos de 0 a 10 kb delecionados con nucleótidos de 1 a 10 kb insertados; y/o nucleótidos de 1 a 10 kb delecionados con nucleótidos de 0 a 10 kb insertados. Los perfiles de indel pueden variar ampliamente entre pacientes. Por ejemplo, como se muestra en la FIG. 7A a FIG. 7C para los pacientes 1, 2 y 3, los perfiles de indels para las 10 indels más comunes se muestran para cada paciente, donde “I” se refiere a inserción; “D” se refiere a deleción; el primer número se refiere al inicio del indel desde el par de bases de referencia (“*” se refiere a nucleótidos que flanquean el indel y podrían alinearse en cualquier lado del indel); y el número que sigue al guion se refiere al número de pares de bases insertadas o delecionadas. Como se muestra, los indels más comunes variaron de 1 a 28 nucleótidos y empezaron entre aproximadamente 50 y 70 (en cualquier lado) del par de bases de referencia. Además, en todos los pacientes, “todos los demás indels” consistieron en más del

40 % de los indels evaluados. Adicionalmente, como se muestra, el perfil de indels puede cambiar con el tiempo.

En la presente memoria también se describen métodos para la monitorización de las HSPC modificadas genéticamente para determinar su perfil de indel. En determinadas realizaciones, un perfil de indel de las células modificadas genéticamente *ex vivo* se determina antes de la infusión y se monitoriza con el tiempo después de la administración al sujeto. Dicha monitorización asegura que el patrón de distribución de los indels en las células injertadas se está manteniendo, y que no hay un crecimiento excesivo aberrante de una población clonal de células, un fenómeno también conocido como *jackpotting*, en el que una población clonal crece más rápido que el resto (véase, *p. ej.*, Heddle (1999) *Mutagenesis* 14(3):257-260), lo que podría dar lugar a un crecimiento excesivo no deseado de un tipo de célula derivada de esa HSPC modificada con respecto a la homeostasis celular normal de las HSPC en el cuerpo. La monitorización del perfil de indel puede llevarse a cabo usando cualesquiera técnicas estándar, por ejemplo, por secuenciación u otro método.

Por tanto, en la presente memoria se proporcionan células modificadas genéticamente (*p. ej.*, célula precursora de células sanguíneas rojas (RBC) tal como una célula madre hematopoyética CD34+ o célula precursora eritroide) que comprenden (i) ARNm SB-mRENH1 y ARNm SB-mRENH2 (como se muestra en la SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16), ARNm que codifican una pareja de ZFN; y (ii) una modificación genómica hecha después de la escisión por la pareja de ZFN, en donde la modificación está en una secuencia potenciadora de BCL11A endógena, de manera que el gen de BCL11A se inactiva en la célula. También se proporcionan poblaciones de células que comprenden estas células modificadas genéticamente; células modificadas genéticamente que descienden de estas; poblaciones de células que comprenden las células modificadas genéticamente y células que descienden de estas; y composiciones que comprenden las células modificadas genéticamente y/o células que descienden de estas. Las células, poblaciones de células, y composiciones descritas en la presente memoria pueden ser células autólogas (del sujeto) y/o alogénicas. Además, las células modificadas genéticamente pueden incluir una o más modificaciones genéticas adicionales, incluyendo, pero no limitadas a, células en las que uno o más auto-marcadores o antígenos se inactivan (*knocked-out*).

También se proporcionan terapias celulares *ex vivo* usando estas poblaciones de células y/o

composiciones, por ejemplo, métodos *ex vivo* para tratar a un sujeto con beta-talasemia (β -talasemia) mediante la administración de una composición que comprende células modificadas genéticamente (y/o células que descienden de estas) como se describe en la presente memoria al sujeto de manera que se incrementa la producción de hemoglobina fetal (HbF) en el sujeto (*p. ej.*, β^0/β^0 o β^0/β^+) y uno o más síntomas clínicos de la β -talasemia (*p. ej.*, β -talasemia dependiente de transfusión) se disminuyen, mejoran o eliminan. En determinadas realizaciones, se consigue un cambio desde la línea base de fracciones de hemoglobina de laboratorio clínico (hemoglobina de adulto o fetal) en gramos/dL de plasma y/o porcentaje de HbF de hemoglobina total (Hb) en el sujeto. En otras realizaciones, se alteran los niveles de biomarcadores de enfermedad relacionados con la talasemia (*p. ej.*, cambios en el metabolismo del hierro; y/o cambios en los niveles de eritropoyetina, haptoglobina y/o hepcidina) después del tratamiento (administración de las células modificadas genéticamente). Los síntomas clínicos que se pueden disminuir, mejorar o eliminar incluyen, pero no están limitados a: síntomas clínicos asociados con la sobrecarga de hierro o asociados con la terapia de transfusión en la línea base (*p. ej.*, una disminución en la disfunción endocrina en el sujeto ensayada determinando los niveles y/o actividad de las hormonas tiroideas, IGF-1, cortisol matinal, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), HbA1C, y/o niveles de vitamina D); la necesidad de transfusiones de RBC e infusión de transfusión de plaquetas, transfusión de inmunoglobulina intravenosa (IVIG), transfusión de plasma, y/o transfusión de granulocitos; enfermedad hepática; anomalías cardíacas; osteoporosis; y/o fracturas. Los métodos *ex vivo* como se describe en la presente memoria también pueden dar lugar a un cambio en la eritropoyesis en la línea base en el sujeto después de la administración de la composición, incluyendo, pero no limitado a, reducción o eliminación de hiperplasia; reducción del número de células inmaduras y/o con morfologías no típicas; y/o un cambio (modificación) en el número y porcentaje de células F en el sujeto.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, las células modificadas genéticamente son células madre hematopoyéticas (*p. ej.*, HSC/PC CD34+) aisladas del sujeto, opcionalmente en los que las HSC/PC CD34+ se movilizan (*p. ej.*, al menos 25×10^6 HSPC CD34+/kg) en cada sujeto por tratamiento con una o más dosis de G-CSF y/o una o más dosis de plerixafor antes del aislamiento y las células movilizadas se recogen por uno o más ciclos de aféresis. Además, la composición que comprende las células modificadas genéticamente puede evaluarse para determinar inserciones y/o deleciones en BCL11A (modificaciones en la diana) y/u otra región distinta de BCL11A (modificaciones fuera de la

diana). Antes de la administración de la composición que comprende las células modificadas genéticamente, el sujeto puede tratarse con (administrarle) uno o más agentes de acondicionamiento mieloablativos una o más veces, por ejemplo, busulfán administrado: intravenosamente (IV) a entre 0,5 a 5 mg/kg una o más veces; IV a 3,2 mg/kg/día; IV mediante un catéter venoso central durante 4 días para una dosis total de 12,8 mg/kg antes de la infusión en los Días -6 a -3 antes de la infusión de la composición que comprende las células modificadas genéticamente en el Día 0; o IV una vez al día o cada 6 horas. Puede usarse cualquier dosis de las células modificadas genéticamente, por ejemplo, entre 3×10^6 células/kg y 20×10^6 células/kg (*p. ej.*, donde las células se formulan con aproximadamente $1,0$ - $2,0 \times 10^8$ células por bolsa a una concentración de aproximadamente 1×10^7 células/mL). Las células modificadas genéticamente pueden crioconservarse antes de la administración y puede ser en cualquier momento después de la descongelación, incluyendo, pero no limitado a, en aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 minutos después de la descongelación. Los métodos pueden comprender además la monitorización de los signos vitales del sujeto antes de, durante y/o después de la administración de las células modificadas genéticamente; y/o la valoración de los niveles de hemoglobina, neutrófilos y/o plaquetas en el sujeto antes de la administración de las células modificadas genéticamente para determinar los niveles de hemoglobina en la línea base en el sujeto. En determinadas realizaciones, los niveles de hemoglobina, neutrófilos y/o plaquetas en el sujeto después de la administración de las células modificadas genéticamente se incrementan o permanecen estables en comparación con los niveles en la línea base durante semanas o meses después de la administración. Opcionalmente, el sujeto puede recibir una o más transfusiones de PRBC antes de y/o después de la administración de las células modificadas genéticamente. En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, después de la administración de la composición al sujeto, la necesidad de terapias adicionales tales como un trasplante de médula ósea, componente sanguíneo, quelación de hierro, y/o terapia de transfusiones de PRBC en el sujeto se reduce o elimina, por ejemplo, en aproximadamente 1 a 30 o más días, incluyendo 1-20 días. Las células y el sujeto también pueden monitorizarse antes y/o después de la administración, por ejemplo, para determinar el perfil de indel de las células aisladas de muestras de sangre periférica, aspirados de médula ósea, u otras fuentes de tejidos en comparación con el perfil de indel de las células infundidas, con el fin de monitorizar la estabilidad del injerto en el sujeto.

GENERAL

La práctica de los métodos, así como la preparación y uso de las composiciones descritas en la presente memoria, emplean, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, bioquímica, estructura y análisis de la cromatina, química computacional, cultivo celular, , ADN recombinante y campos relacionados, como están en el alcance de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 y Tercera edición, 2001; Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; la serie METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Tercera edición, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman y A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; y METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

DEFINICIONES

Los términos "ácido nucleico," "polinucleótido," y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, en conformación lineal o circular, y en forma bien mono o bicatenaria. Para los propósitos de la presente descripción, estos términos no deben considerarse como limitantes con respecto a la longitud de un polímero. Los términos pueden englobar análogos conocidos de nucleótidos naturales, así como nucleótidos que están modificados en los restos de la base, azúcar y/o fosfato (*p. ej.*, núcleos fósforotioato). En general, un análogo de un nucleótido particular tiene la misma especificidad de emparejamiento de bases; *es decir*, un análogo de A se emparejará por bases con T.

Los términos "polipéptido," "péptido" y "proteína" se usan indistintamente para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. El término también se aplica a polímeros de aminoácidos en los que uno o más aminoácidos son análogos químicos o derivados modificados de los aminoácidos naturales correspondientes.

“Unión” se refiere a una interacción no covalente, específica de secuencia, entre macromoléculas (*p. ej.*, entre una proteína y un ácido nucleico). No es necesario que todos los componentes de una interacción de unión sean específicos de secuencia (*p. ej.*, contactos con residuos de fosfato en un núcleo de ADN), siempre que la interacción como un todo sea específica de secuencia. Dichas interacciones se caracterizan generalmente por una constante de disociación (K_d) de 10^{-6} M^{-1} o menor. “Afinidad” se refiere a la fuerza de la unión: estando correlacionada una afinidad de unión incrementada con una menor K_d .

Una “proteína de unión” es una proteína que es capaz de unirse no covalentemente a otra molécula. Una proteína de unión puede unirse, por ejemplo, a una molécula de ADN (una proteína de unión a ADN), a una molécula de ARN (una proteína de unión a ARN) y/o a una molécula de proteína (una proteína de unión a proteína). En el caso de una proteína de unión a proteína, puede unirse a sí misma (para formar homodímeros, homotrímeros, *etc.*) y/o puede unirse a una o más moléculas de una proteína o proteínas diferentes. Una proteína de unión puede tener más de un tipo de actividad de unión. Por ejemplo, las proteínas con dedos de cinc tienen actividad de unión a ADN, unión a ARN y unión a proteína.

Una “proteína de unión a ADN con dedos de cinc” (o dominio de unión) es una proteína, o un dominio en una proteína mayor, que se une a ADN de una manera específica de secuencia a través de uno o más dedos de cinc, que son regiones con una secuencia de aminoácidos en el dominio de unión cuya estructura se estabiliza a través de la coordinación de un ion de cinc. El término proteína de unión a ADN con dedos de cinc se abrevia frecuentemente como proteína con dedos de cinc o ZFP. El término “nucleasa con dedos de cinc” incluye una ZFN, así como una pareja de ZFN (los miembros de la pareja se refieren como “izquierdo y derecho” o “primero y segundo” o “pareja”) que se dimerizan para escindir el gen diana.

Un “dominio de unión a ADN TALE” o “TALE” es un polipéptido que comprende uno o más dominios/unidades repetidas TALE. Los dominios repetidos están implicados en la unión del TALE a su secuencia de ADN diana cognada. Una única “unidad repetida” (también referida como una “repetición”) tiene una longitud típicamente de 33-35 aminoácidos y presenta al menos alguna homología de secuencia con otras secuencias repetidas TALE en una proteína TALE natural. Véanse, *p. ej.*, las Patentes de EE. UU. Nos. 8.586.526 y 9.458.205. El término “TALEN” incluye un TALEN, así como una pareja de TALEN (los miembros de la pareja se refieren como “izquierdo y derecho” o “primero y segundo” o “pareja”) que se

dimerizan para escindir el gen diana. Los dominios de unión con dedos de cinc y TALE pueden “prepararse por ingeniería” para unirse a una secuencia de nucleótidos predeterminada, por ejemplo, mediante ingeniería (alteración de uno o más aminoácidos) de la región en hélice de reconocimiento de una proteína natural con dedos de cinc o TALE. Por lo tanto, las proteínas de unión a ADN preparadas por ingeniería (dedos de cinc o TALE) son proteínas que no son naturales. Los ejemplos no limitativos de métodos para preparar por ingeniería proteínas de unión a ADN son diseño y selección. Una proteína de unión a ADN diseñada es una proteína que no ocurre en la naturaleza cuyo diseño/composición se produce principalmente por criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computerizados para procesar la información en una base de datos que almacena la información de diseños y datos de unión de ZFP y/o TALE existentes. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Nos. 8.568.526; 6.140.081; 6.453.242; y 6.534.261; véanse también las Publicaciones de Patente Internacional Nos. WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536; y WO 03/016496.

Una proteína con dedos de cinc o TALE “seleccionada” es una proteína que no se encuentra en la naturaleza cuya producción se produce principalmente a partir de un proceso empírico tal como exposición en fagos, trampa de interacción o selección de híbridos. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. Nos. 8.586.526; 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.200.759; y las Publicaciones de Patente Internacional Nos. WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197 y WO 02/099084.

“Recombinación” se refiere a un proceso de intercambio de información genética entre dos polinucleótidos. Para los propósitos de esta descripción, “recombinación homóloga (HR)” se refiere a la forma especializada de dicho intercambio que tiene lugar, por ejemplo, durante la reparación de roturas de cadena doble en células mediante mecanismos de reparación dirigidos por homología. Este proceso requiere homología de secuencias de nucleótidos, usa una molécula “donante” para la reparación con molde de una molécula “diana” (es decir, la que experimenta la rotura de cadena doble), y se conoce de manera diversa como “conversión génica sin entrecruzamiento” o “conversión génica de extensión corta,” porque da lugar a la transferencia de información genética del donante a la diana. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría particular, dicha transferencia puede implicar la corrección no concordante de ADN heterodúplex que se forma entre la diana con rotura y el donante, y/o

“hibridación de cadenas dependiente de síntesis,” en la que el donante se usa para resintetizar la información genética que formará parte de la diana, y/o procesos relacionados. Dicha HR especializada da lugar frecuentemente a una alteración de la secuencia de la molécula diana de manera que parte o toda la secuencia del polinucleótido donante se incorpora en el polinucleótido diana.

En los métodos de la descripción, una o más nucleasas dirigidas como se describe en la presente memoria crean una rotura de cadena doble en la secuencia diana (*p. ej.*, cromatina celular) en un sitio predeterminado, y un polinucleótido “donante”, que tiene homología con la secuencia de nucleótidos en la región de la rotura, puede introducirse en la célula. Se ha mostrado que la presencia de la rotura de cadena doble facilita la integración de la secuencia donante. La secuencia donante puede estar integrada físicamente o, alternativamente, el polinucleótido donante se usa como un molde para reparar la rotura mediante recombinación homóloga, dando lugar a la introducción de toda o parte de la secuencia de nucleótidos como en el donante en la cromatina celular. Por tanto, una primera secuencia en la cromatina celular puede alterarse y, en determinadas realizaciones, puede convertirse en una secuencia presente en un polinucleótido donante. Por tanto, puede entenderse que el uso de los términos “reemplazar” o “reemplazo” representa el reemplazo de una secuencia de nucleótidos por otra, (*es decir*, el reemplazo de una secuencia en el sentido informacional), y no requiere necesariamente el reemplazo físico o químico de un polinucleótido por otro.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, pueden usarse parejas adicionales de proteínas con dedos de cinc o TALEN para la escisión de cadena doble adicional de sitios diana adicionales en la célula.

En determinadas realizaciones de los métodos para la recombinación y/o reemplazo y/o alteración dirigidos de una secuencia en una región de interés en la cromatina celular, se altera una secuencia cromosómica por recombinación homóloga con una secuencia de nucleótidos “donante” exógena. Dicha recombinación homóloga se estimula por la presencia de una rotura de cadena doble en la cromatina celular, si están presentes secuencias homólogas a la región de la rotura.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, la primera secuencia de nucleótidos (la “secuencia donante”) puede contener secuencias que son homólogas, pero

no idénticas, a secuencias genómicas en la región de interés, estimulando de esta manera la recombinación homóloga para insertar una secuencia no idéntica en la región de interés. Por tanto, en determinadas realizaciones, partes de la secuencia donante que son homólogas a secuencias en la región de interés presentan entre aproximadamente un 80 a un 99 % (o cualquier número entero intermedio) de identidad de secuencia con la secuencia genómica que se reemplaza. En otras realizaciones, la homología entre las secuencias donante y genómica es mayor del 99 %, por ejemplo, si solo 1 nucleótido es diferente entre las secuencias donante y genómica de más de 100 pares de bases contiguos. En determinados casos, una parte no homóloga de la secuencia donante puede contener secuencias que no están presentes en la región de interés, de manera que se introducen nuevas secuencias en la región de interés. En estos casos, la secuencia no homóloga está flanqueada generalmente por secuencias de 50-1.000 pares de bases (o cualquier valor entero intermedio) o cualquier número de pares de bases mayor de 1.000, que son homólogas o idénticas a las secuencias en la región de interés. En otras realizaciones, la secuencia donante no es homóloga a la primera secuencia y se inserta en el genoma mediante mecanismos de recombinación no homóloga.

Cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede usarse para la inactivación parcial o completa de una o más secuencias diana en una célula mediante la integración dirigida de la secuencia donante que disrumpe la expresión del o de los genes de interés. También se proporcionan líneas celulares con genes parcialmente o completamente inactivados.

Además, los métodos de integración dirigida como se describe en la presente memoria también pueden usarse para integrar una o más secuencias exógenas. La secuencia de ácido nucleico exógena puede comprender, por ejemplo, uno o más genes o moléculas de ADNc, o cualquier tipo de secuencia codificadora o no codificadora, así como uno o más elementos de control (*p. ej.*, promotores). Además, la secuencia de ácido nucleico exógena puede producir una o más moléculas de ARN (*p. ej.*, ARN en horquilla pequeños (ARNsh), ARN inhibidores (ARNi), microARN (miARN), etc.).

“Escisión” se refiere a la rotura del núcleo covalente de una molécula de ADN. La escisión puede iniciarse por una variedad de métodos incluyendo, pero no limitado a, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Son posibles tanto la escisión de cadena

única como la escisión de cadena doble, y la escisión de cadena doble puede ocurrir como resultado de dos eventos distintos de escisión de cadena única. La escisión del ADN puede dar lugar a la producción bien de extremos romos o de extremos escalonados. En determinadas realizaciones, se usan polipéptidos de fusión para la escisión dirigida de ADN de cadena doble.

Un “semidominio de escisión” es una secuencia de polipéptido que, conjuntamente con un segundo polipéptido (bien idéntico o diferente), forma un complejo que tiene actividad de escisión (preferiblemente, actividad de escisión de cadena doble). Los términos “primer y segundos semidominios de escisión,” “semidominios de escisión + y –” y “semidominios de escisión derecho e izquierdo” se usan indistintamente para hacer referencia a parejas de semidominios de escisión que dimerizan.

Un “semidominio de escisión preparado por ingeniería” es un semidominio de escisión que ha sido modificado de manera que forma heterodímeros obligados con otro semidominio de escisión (*p. ej.*, otro semidominio de escisión preparado por ingeniería). Véanse, las Patentes de EE. UU. Nos. 7.888.121; 7.914.796; 8.034.598; y 8.823.618, incorporadas en la presente memoria por referencia en su totalidad.

El término “secuencia” se refiere a una secuencia de nucleótidos de cualquier longitud, que puede ser ADN o ARN; puede ser lineal, circular o ramificada y puede ser bien monocatenaria o bicatenaria. El término “secuencia donante” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se inserta en un genoma. Una secuencia donante puede tener cualquier longitud, por ejemplo, entre 2 y 10.000 nucleótidos de longitud (o cualquier valor entero intermedio o superior), preferiblemente entre aproximadamente 100 y 1.000 nucleótidos de longitud (o cualquier número entero intermedio), más preferiblemente entre aproximadamente 200 y 500 nucleótidos de longitud.

Un “gen asociado a enfermedad” es uno que es defectuoso de alguna manera en una enfermedad monogénica. Los ejemplos no limitativos de enfermedades monogénicas incluyen inmunodeficiencia combinada grave, fibrosis quística, enfermedades de almacenamiento lisosomal (*p. ej.*, de Gaucher, de Hurler, de Hunter, de Fabry, Neimann-Pick, de Tay-Sach, etc.), anemia de células falciformes, y talasemia.

La “barrera hematoencefálica” es una barrera con una permeabilidad altamente selectiva que separa la sangre circulante del cerebro en el sistema nervioso central. La barrera hematoencefálica está formada por células endoteliales del cerebro que están conectadas por uniones firmes en los vasos del SNC que restringen el paso de solutos de la sangre. Durante mucho tiempo, se ha pensado que la barrera hematoencefálica previene la captación de moléculas terapéuticas grandes y previene la captación de la mayor parte de las moléculas terapéuticas pequeñas (Pardridge (2005) *NeuroRx* 2(1): 3-14).

La “cromatina” es la estructura de nucleoproteínas que comprende el genoma celular. La cromatina celular comprende ácido nucleico, principalmente ADN, y proteínas, incluyendo histonas y proteínas cromosómicas que no son histonas. La mayoría de la cromatina celular eucariota existe en la forma de nucleosomas, en donde un núcleo de nucleosoma comprende aproximadamente 150 pares de bases de ADN asociados con un octámero que comprende dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4; y el ADN conector (con una longitud variable dependiendo del organismo) se extiende entre los núcleos de nucleosomas. Una molécula de histona H1 está asociada generalmente con el ADN conector. Para los propósitos de la presente descripción, el término “cromatina” se pretende que englobe todos los tipos de nucleoproteína celular, tanto procariota como eucariota. La cromatina celular incluye tanto cromatina cromosómica como episomal.

Un “cromosoma” es un complejo de cromatina que comprende todo o una parte del genoma de una célula. El genoma de una célula se caracteriza frecuentemente por su cariotipo, que es la colección de todos los cromosomas que comprenden el genoma de la célula. El genoma de una célula puede comprender uno o más cromosomas.

Un “episoma” es un ácido nucleico replicante, complejo de nucleoproteínas u otra estructura que comprende un ácido nucleico que no es parte del cariotipo cromosómico de una célula. Los ejemplos de episomas incluyen plásmidos y determinados genomas virales.

Un “sitio diana” o “secuencia diana” es una secuencia de ácido nucleico que define una parte de un ácido nucleico al que se unirá una molécula de unión, siempre que existan las condiciones suficientes para la unión.

Una molécula “exógena” es una molécula que normalmente no está presente en una célula, pero que puede introducirse en una célula por uno o más métodos genéticos, bioquímicos u

otros. La “presencia normal en la célula” se determina con respecto al estadio de desarrollo particular y las condiciones ambientales de la célula. Por tanto, por ejemplo, una molécula que está presente solo durante el desarrollo embrionario del músculo es una molécula exógena con respecto a una célula de músculo de adulto. De manera similar, una molécula inducida por un choque térmico es una molécula exógena con respecto a una célula no expuesta a un choque térmico. Una molécula exógena puede comprender, por ejemplo, una versión funcional de una molécula endógena con mal funcionamiento o una versión con mal funcionamiento de una molécula endógena con funcionamiento normal.

Una molécula exógena puede ser, entre otras cosas, una molécula pequeña, tal como se genera por un proceso químico combinatorio, o una macromolécula tal como una proteína, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, glicoproteína, lipoproteína, polisacárido, cualquier derivado modificado de las moléculas anteriores, o cualquier complejo que comprende una o más de las moléculas anteriores. Los ácidos nucleicos que incluyen ADN y ARN, pueden ser mono o bicatenarios; pueden ser lineales, ramificados o circulares; y pueden tener cualquier longitud. Los ácidos nucleicos incluyen a aquellos capaces de formar dúplex, así como ácidos nucleicos que forman tríplex. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Nos. 5.176.996 y 5.422.251. Las proteínas incluyen, pero no están limitadas a, proteínas de unión a ADN, factores de transcripción, factores de remodelación de la cromatina, proteínas de unión a ADN metilado, polimerasas, metilasas, desmetilasas, acetilasas, desacetilasas, quinasas, fosfatasas, integrasas, recombinasas, ligasas, topoisomerasas, girasas y helicasas.

Una molécula exógena puede ser el mismo tipo de molécula que una molécula endógena, *p. ej.*, una proteína o ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, un ácido nucleico exógeno puede comprender un genoma viral infeccioso, un plásmido o episoma introducido en una célula, o un cromosoma que no está presente normalmente en la célula. Los métodos para la introducción de moléculas exógenas en células son conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, transferencia mediada por lípidos (*es decir*, liposomas, incluyendo lípidos neutros y catiónicos), electroporación, inyección directa, fusión celular, bombardeo de partículas, coprecipitación con fosfato de calcio, transferencia mediada por DEAE-dextrano y transferencia mediada por un vector viral. Una molécula exógena también puede ser el mismo tipo de molécula que una molécula endógena, pero derivada de una especie diferente de la célula de la que deriva. Por ejemplo, una secuencia

de ácido nucleico humano puede introducirse en una línea celular derivada originalmente de un ratón o hámster.

Por el contrario, una molécula “endógena” es una que está presente normalmente en una célula particular en un estadio de desarrollo particular en condiciones ambientales particulares. Por ejemplo, un ácido nucleico endógeno puede comprender un cromosoma, el genoma de una mitocondria, cloroplasto u otro orgánulo, o un ácido nucleico episomal natural. Las moléculas endógenas adicionales pueden incluir proteínas, por ejemplo, factores de transcripción y enzimas.

Una molécula “de fusión” es una molécula en la que dos o más moléculas de subunidades están unidas, preferiblemente covalentemente. Las moléculas de subunidades pueden ser el mismo tipo químico de molécula, o pueden ser diferentes tipos químicos de moléculas. Los ejemplos de moléculas de fusión incluyen, pero no están limitados a, proteínas de fusión (por ejemplo, una fusión entre una proteína de dominio de unión a ADN y un dominio de escisión), fusiones entre un dominio de unión a ADN de polinucleótido (*p. ej.*, ARNsg) asociado operativamente con un dominio de escisión, y ácidos nucleicos de fusión (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión).

La expresión de una proteína de fusión en una célula puede producirse por la administración de la proteína de fusión a la célula o por la administración de un polinucleótido que codifica la proteína de fusión a una célula, en donde el polinucleótido se transcribe, y el transcrito se traduce, para generar la proteína de fusión. El corte y empalme en trans, la escisión de polipéptidos y la ligación de polipéptidos también pueden estar implicados en la expresión de una proteína en una célula. Los métodos para la administración de polinucleótidos y polipéptidos a células se presentan en otro lugar de esta descripción.

Un “gen,” para los propósitos de la presente descripción, incluye una región de ADN que codifica un producto génico (*véase infra*), así como todas las regiones de ADN que regulan la producción del producto génico, ya sean o no dichas secuencias reguladoras adyacentes a secuencias codificadoras y/o transcritas. Por consiguiente, un gen incluye, pero no está necesariamente limitado a, secuencias promotoras, terminadores, secuencias que regulan la traducción tales como sitios de unión a ribosomas y sitios de entrada a ribosomas internos, potenciadores, silenciadores, aislantes, elementos de límite, orígenes de replicación, sitios de unión a la matriz y regiones de control de locus.

“Expresión génica” se refiere a la conversión de la información, contenida en un gen, en un producto génico. Un producto génico puede ser el producto transcripcional directo de un gen (*p. ej.*, ARNm, ARNt, ARNr, ARN antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína producida por la traducción de un ARNm. Los productos génicos también incluyen ARN que están modificados, por procesos tales como formación de caperuza, poliadenilación, metilación, y edición, y proteínas modificadas, por ejemplo, por metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, miristilación, y glicosilación.

La “modulación” de la expresión génica se refiere a un cambio en la actividad de un gen. La modulación de la expresión puede incluir, pero no está limitada a, la activación génica y la represión génica. La edición genómica (*p. ej.*, escisión, alteración, inactivación, mutación aleatoria) puede usarse para modular la expresión. La inactivación génica se refiere a cualquier reducción en la expresión génica en comparación con una célula que no incluye una ZFP o TALEN como se describe en la presente memoria. Por tanto, la inactivación génica puede ser parcial o completa.

Una “región de interés” es cualquier región de cromatina celular, tal como, por ejemplo, un gen o una secuencia no codificadora en o adyacente a un gen, en la que es deseable unir una molécula exógena. La unión puede ser para los propósitos de la escisión dirigida de ADN y/o recombinación dirigida. Una región de interés puede estar presente en un cromosoma, un episoma, un genoma de orgánulo (*p. ej.*, mitocondrial, de cloroplasto), o un genoma viral infeccioso, por ejemplo. Una región de interés puede estar en la región codificadora de un gen, en las regiones no codificadoras transcritas tales como, por ejemplo, secuencias líder, secuencias remolques o intrones, o en regiones no transcritas, bien en 5’ o en 3’ de la región codificadora. Una región de interés puede ser tan pequeña como una única pareja de nucleótidos o hasta 2.000 parejas de nucleótidos de longitud, o cualquier valor entero de parejas de nucleótidos.

Las células “eucariotas” incluyen, pero no están limitadas a, células fúngicas (tales como de levaduras), células de plantas, células animales, células de mamíferos y células humanas (*p. ej.*, células madre, o células precursoras). El término “células madre” o “células precursoras” se refiere a células madre pluripotentes y multipotentes, incluyendo, pero no limitado a,

células madre hematopoyéticas, que también se refieren como células madre progenitoras hematopoyéticas (HPSC) o células madre/células precursoras hematopoyéticas (HSC/PC).

Las “Células Sanguíneas Rojas” (RBC) o eritrocitos son células diferenciadas terminalmente derivadas de células madre hematopoyéticas. Carecen de una nucleasa y de la mayor parte de los orgánulos celulares. Las RBC contienen hemoglobina para transportar oxígeno desde los pulmones a los tejidos periféricos. De hecho, el 33 % de una RBC individual es hemoglobina. También transportan el CO₂ producido por las células durante el metabolismo fuera de los tejidos y de nuevo a los pulmones para su liberación durante la exhalación. Las RBC se producen en la médula ósea en respuesta a hipoxia de la sangre que está mediada por la liberación de eritropoyetina (EPO) por el riñón. La EPO causa un incremento en el número de proeritroblastos y acorta el tiempo requerido para la maduración completa de las RBC. Después de aproximadamente 120 días, como las RBC no contienen un núcleo u otras capacidades regenerativas, las células se eliminan de la circulación bien por las actividades fagocíticas de los macrófagos en el hígado, bazo y nodos linfáticos (~90 %) o por hemólisis en el plasma (~10 %). Después de ser engullidas por los macrófagos, los componentes químicos de las RBC se degradan en las vacuolas de los macrófagos debido a la acción de enzimas lisosomales.

Los “tejidos secretores” son aquellos tejidos en un animal que secretan productos fuera de la célula individual en un lumen de algún tipo que deriva típicamente del epitelio. Los ejemplos de tejidos secretores que están localizados en el tracto gastrointestinal incluyen las células que revisten el intestino, el páncreas, y la vesícula biliar. Otros tejidos secretores incluyen el hígado, los tejidos asociados con el ojo y las membranas mucosas, tales como las glándulas salivares, glándulas mamarias, la glándula de la próstata, la glándula pituitaria y otros miembros del sistema endocrino. Adicionalmente, los tejidos secretores incluyen células individuales de un tipo de tejido que son capaces de secreción.

Los términos “unión operativa” y “unido operativamente” (o “unidos operativamente”) se usan indistintamente con referencia a una yuxtaposición de dos o más componentes (tales como elementos de secuencia), en los que los componentes se disponen de manera que ambos componentes funcionan normalmente y permiten la posibilidad de que al menos uno de los componentes pueda mediar una función que se ejerce en al menos uno de los otros componentes. Como ilustración, una secuencia reguladora de la transcripción, tal como un

promotor, está unida operativamente a una secuencia codificadora si la secuencia reguladora de la transcripción controla el nivel de transcripción de la secuencia codificadora en respuesta a la presencia o ausencia de uno o más factores reguladores de la transcripción. Una secuencia reguladora de la transcripción está generalmente unida operativamente en cis con una secuencia codificadora, pero no es necesario que esté directamente adyacente a esta. Por ejemplo, un potenciador es una secuencia reguladora de la transcripción que está unida operativamente a una secuencia codificadora, aunque no son contiguas.

Con respecto a los polipéptidos de fusión, el término “unido operativamente” puede referirse al hecho de que cada uno de los componentes realiza la misma función en unión con el otro componente como sería si no estuvieran así unidos. Por ejemplo, con respecto a un polipéptido de fusión en el que un dominio de unión a ADN ZFP o TALE se fusiona con un dominio de activación, el dominio de unión a ADN ZFP o TALE y el dominio de activación están en unión operativa si, en el polipéptido de fusión, la parte del dominio de unión a ADN ZFP o TALE es capaz de unirse a su sitio diana y/o su sitio de unión, mientras que el dominio de activación es capaz de regular al alza la expresión génica. Cuando un polipéptido de fusión en el que un dominio de unión a ADN ZFP o TALE se fusiona con un dominio de escisión, el dominio de unión a ADN ZFP o TALE y el dominio de escisión están en unión operativa si, en el polipéptido de fusión, la parte del dominio de unión a ADN ZFP o TALE es capaz de unirse a su sitio diana y/o su sitio de unión, mientras que el dominio de escisión es capaz de escindir el ADN cerca del sitio diana.

Una proteína, polipéptido o ácido nucleico “funcional” incluye cualquier proteína, polipéptido o ácido nucleico que proporciona la misma función que la proteína, polipéptido o ácido nucleico de tipo salvaje. Un “fragmento funcional” de una proteína, polipéptido o ácido nucleico es una proteína, polipéptido o ácido nucleico cuya secuencia no es idéntica a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa, pero que retiene la misma función que la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa. Un fragmento funcional puede poseer más, menos, o el mismo número de residuos que la molécula nativa correspondiente, y/o puede contener una o más sustituciones de aminoácidos o nucleótidos. Los métodos para determinar la función de un ácido nucleico (p. ej., función codificadora, capacidad de hibridar con otro ácido nucleico) son muy conocidos en la técnica. De manera similar, los métodos para determinar la función de proteínas son muy conocidos. Por

ejemplo, la función de unión a ADN de un polipéptido puede determinarse, por ejemplo, por unión a filtro, desplazamiento en la movilidad electroforética, o ensayos de inmunoprecipitación. La escisión del ADN puede ensayarse por electroforesis en gel. Véase, Ausubel et al., supra. La capacidad de una proteína para interactuar con otra proteína puede determinarse, por ejemplo, por coimmunoprecipitación, ensayos de dos híbridos o complementación, tanto genéticos como bioquímicos. Véase, por ejemplo, Fields et al. (1989) *Nature* 340:245-246; Patente de EE. UU. No. 5.585.245 y Publicación de Patente Internacional No. WO 98/44350.

Un “vector” es capaz de transferir secuencias génicas a las células diana. Típicamente, “construcción de vector,” “vector de expresión,” y “vector de transferencia génica,” significan cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir secuencias génicas a las células diana. Por tanto, el término incluye vehículos de clonación, y de expresión, así como vectores de integración.

Un “gen informador” o “secuencia informadora” se refiere a cualquier secuencia que produce un producto de proteína que se mide fácilmente, preferiblemente, aunque no necesariamente, en un ensayo rutinario. Los genes informadores adecuados incluyen, pero no están limitados a, secuencias que codifican proteínas que median la resistencia a antibióticos (p. ej., resistencia a ampicilina, resistencia a neomicina, resistencia a G418, resistencia a puomicina), secuencias que codifican proteínas coloreadas o fluorescentes o luminiscentes (p. ej., proteína fluorescente verde, proteína fluorescente verde potenciada, proteína fluorescente roja, luciferasa), y proteínas que median un crecimiento celular aumentado y/o la amplificación génica (p. ej., dihidrofolato reductasa). Las etiquetas de epítipo incluyen, por ejemplo, una o más copias de FLAG, His, myc, Tap, HA o cualquier secuencia de aminoácidos detectable. Las “etiquetas de expresión” incluyen secuencias que codifican informadores que pueden estar unidas operativamente a una secuencia génica deseada, con el fin de monitorizar la expresión del gen de interés.

Los términos “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente y se refieren a mamíferos tales como sujetos humanos y primates no humanos, así como a animales experimentales tales como conejos, perros, gatos, ratas, ratones, y otros animales. Por consiguiente, el término “sujeto” o “paciente” tal y como se usa en la presente memoria significa cualquier sujeto mamífero o paciente al que pueden administrarse las células alteradas de la invención y/o

proteínas producidas por las células alteradas de la invención. Los sujetos de la presente invención incluyen aquellos que tiene el trastorno β -talasemia.

Generalmente, el sujeto o sujeto es elegible para el tratamiento de la β -talasemia. Para los propósitos de la presente memoria, dicho sujeto elegible o sujeto es uno que está experimentando, ha experimentado, o es probable que experimente, uno o más signos, síntomas u otros indicadores de la β -talasemia; ha sido diagnosticado con β -talasemia, ya sea, por ejemplo, recién diagnosticado, y/o está en riesgo de desarrollar β -talasemia. Uno que padece o está en riesgo de padecer β -talasemia puede identificarse opcionalmente como uno que ha sido cribado para detectar niveles anormalmente bajos de hemoglobina en su sangre o plasma.

Tal y como se usa en la presente memoria, “tratamiento” o “tratar” es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados incluyendo resultados clínicos. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: disminución de uno o más síntomas que se producen por la enfermedad, disminución del grado de la enfermedad, estabilización de la enfermedad (p. ej., prevención o retraso del empeoramiento de la enfermedad), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora del estado de la enfermedad, disminución de la dosis de una o más de otras medicaciones requeridas para tratar la enfermedad, y/o incremento de la calidad de vida.

Tal y como se usa en la presente memoria, “retrasar” o “ralentizar” la progresión de la β -talasemia significa prevenir, diferir, dificultar, ralentizar, retardar, estabilizar, y/o posponer el desarrollo de la enfermedad. Este retraso puede tener cualquier duración de tiempo, dependiendo del historial de la enfermedad y/o del individuo que se está tratando.

Tal y como se usa en la presente memoria, “en el momento del inicio del tratamiento” se refiere al periodo de tiempo en o antes de la primera exposición a una composición terapéutica para la β -talasemia tal como las composiciones de la invención. En algunas realizaciones, “en el momento del inicio del tratamiento” es aproximadamente cualquiera de un año, nueve meses, seis meses, tres meses, dos meses, o un mes antes de un fármaco para la β -talasemia. En algunas realizaciones, “en el momento del inicio del tratamiento” es inmediatamente antes o coincidente con la primera exposición a una composición terapéutica para la β -talasemia.

Tal y como se usa en la presente memoria, “sobre la base de” incluye (1) valorar, determinar, o medir las características del sujeto como se describe en la presente memoria (y preferiblemente seleccionar a un sujeto adecuado para recibir el tratamiento; y (2) administrar el o los tratamientos como se describe en la presente memoria.

Un “síntoma” de β -talasemia es cualquier fenómeno o salida de lo normal en estructura, función, o sensación, experimentada por el sujeto e indicativo de β -talasemia.

Los sujetos con “ β -talasemia dependiente de transfusión” (TDT) requieren infusiones regulares (transfusiones) de PRBC y otros productos sanguíneos para mantener los niveles de hemoglobina >9 a 10 g/dL. La TDT es un tipo grave, progresivo de β -talasemia caracterizado por anemia grave, dependencia de transfusiones toda la vida, sobrecarga de hierro inevitable, comorbilidades graves, y duración más corta de la vida en comparación con la población general. Los pacientes con TDT requieren cuidado de apoyo toda la vida con transfusiones regulares de sangre—típicamente proporcionadas cada 2 a 5 semanas—para mitigar la anemia y permitir la supervivencia. Los niveles terapéuticos, incluyendo los niveles que reducen o eliminar la necesidad de transfusiones de sangre pueden estar por encima de $2-10$ o más g/dL (incluyendo $2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o más g/dL), opcionalmente al menos aproximadamente 5 a 7 o más g/dL para la independencia de las transfusiones.

Las transfusiones crónicas dan lugar a una sobrecarga de hierro inevitable que puede dar lugar a un daño significativo en los órganos vitales. Por lo tanto, los pacientes con TDT necesitan una monitorización continua y rigurosa de la carga de hierro y deben tomar regularmente medicaciones para eliminar el hierro en exceso, un proceso denominado quelación de hierro.

El término “cirugía paliativa” se refiere a procedimientos quirúrgicos que pueden realizarse en un sujeto para aliviar los síntomas que pueden estar asociados con una enfermedad.

El término “agente inmunosupresor” tal y como se usa en la presente memoria para la terapia adyuvante, se refiere a sustancias que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmune del mamífero que se está tratando en la presente memoria. Esto incluiría sustancias que suprimen la producción de citoquinas, regulan a la baja o suprimen la expresión de auto-antígenos, o enmascaran los antígenos MHC. Los ejemplos de dichos agentes incluyen pirimidinas sustituidas en con 2-amino-6-arilo (véase, la Patente de EE. UU. No. 4.665.077);

fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDUA); ganciclovir, tacrolimus, glucocorticoides tales como cortisol o aldosterona, agentes antiinflamatorios tales como un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de 5-lipooxigenasa, o un antagonista del receptor de leucotrienos; antagonistas de purina tales como azatioprina o micofenolato mofetil (MMF); agentes alquilantes tales como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (que enmascara los antígenos MHC, como se describe en la Patente de EE. UU. No. 4.120.649); anticuerpos antiidiotípicos para antígenos MHC y fragmentos de MHC; ciclosporina A; esteroides tales como corticosteroides o glucocorticosteroides o análogos de glucocorticoides, p. ej., prednisona, metilprednisolona, y dexametasona; inhibidores de la dihidrofolato reductasa tales como metotrexato (oral o subcutáneo); hidroxicloroquina; sulfasalazina; leflunomida; antagonistas de citoquinas o receptor de citoquinas incluyendo anticuerpos anti-interferón alfa, beta, o gamma, anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral alfa (infliximab o adalimumab), inmunoadhesina anti-TNF-alfa (etanercept), anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral beta, anticuerpos anti-interleuquina-2 y anticuerpos anti-receptor de IL-2; anticuerpos anti-LFA-1, incluyendo anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18; anticuerpos anti-L3T4; globulina anti-linfocitos heteróloga; anticuerpos frente a T generales, preferiblemente anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (Publicación de Patente Internacional No. WO 90/08187 publicada el 26/7/90); estreptoquinasa; TGF-beta; estreptodornasa; ARN o ADN del huésped; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; rapamicina; receptor de células T (Cohen et al., Patente de EE. UU. No. 5.114.721); fragmentos del receptor de células T (Offner et al. (1991) Science 251:430-432; Publicación de Patente Internacional No. WO 90/11294; Janeway (1989) Nature 341:482; y Publicación de Patente Internacional No. WO 91/01133); y anticuerpos del receptor de células T tales como T10B9.

“Corticosteroide” se refiere a una cualquiera de diversas sustancias sintéticas o naturales con la estructura química general de los esteroides que mimetizan o aumentan los efectos de los corticosteroides naturales. Los ejemplos de corticosteroides sintéticos incluyen prednisona, prednisolona (incluyendo metilprednisolona), dexametasona, glucocorticoide y betametasona.

La “quelación de hierro” es un tipo de terapia que elimina el hierro en exceso del cuerpo. Cada unidad de sangre proporcionada en una transfusión comprende aproximadamente 250 miligramos de hierro, y el cuerpo no puede excretarlo excepto en pequeñas cantidades (~1

mg) que se pierden en la piel y sudoración. El hierro en exceso queda atrapado en los tejidos de los órganos vitales, tales como la pituitaria anterior, corazón, hígado, páncreas y articulaciones. Cuando el hierro alcanza niveles tóxicos, el daño puede dar lugar a enfermedades tales como diabetes, cirrosis, osteoartritis, ataque al corazón, y desequilibrios hormonales. A partir de estos desequilibrios hormonales, se pueden producir hipotiroidismo, hipogonadismo, infertilidad, impotencia y esterilidad. Si no se aborda, el hierro en exceso puede dar lugar a un fallo orgánico completo y a la muerte. La reducción del hierro se consigue con la terapia de quelación, que es la eliminación de hierro farmacológicamente con un agente quelante de hierro tal como desferrioxamina, (nombre comercial Desferal o Jadenu®) o deferasirox, nombre comercial Exjade®.

Un “prospecto” se usa para hacer referencia a instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros productos terapéuticos que deben combinarse con el producto envasado, y/o alertas acerca del uso de dichos productos terapéuticos, etc.

Una “etiqueta” se usa en la presente memoria para hacer referencia a la información incluida habitualmente con los envases comerciales de las formulaciones farmacéuticas incluyendo contenedores tales como viales y prospectos, así como otros tipos de envase.

Debe entenderse que una, alguna, o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en la presente memoria pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para un experto en la técnica.

NUCLEASAS

Los métodos descritos en la presente memoria pueden hacer uso de una o más nucleasas para la inactivación dirigida del potenciador eritroide de BCL11A. Los ejemplos no limitativos de nucleasas incluyen ZFN, TALEN, endonucleasas de direccionamiento, CRISPR/Cas y/o ARN guía Ttago, que son útiles para la escisión *in vivo* de una molécula donante que porta un transgén y nucleasas para la escisión del genoma de una célula de manera que el transgén se integra en el genoma de una manera dirigida. Véanse, *p. ej.*, las Patentes de EE. UU. Nos. 10.435.677; 10.072.066; 9.957.501; 9.963.715; 9.650.648; y las Publicaciones de

Patente de EE. UU. Nos. 2019/0177709; 2018/0111975; y 2015/0132269. En determinadas realizaciones, una o más de las nucleasas son naturales. En otras realizaciones, una o más de las nucleasas no son naturales, es decir, se preparan por ingeniería en la molécula de unión a ADN (también referida como un dominio de unión a ADN) y/o dominio de escisión. Por ejemplo, el dominio de unión a ADN de una nucleasa natural puede alterarse para que se una a un sitio diana seleccionado (p. ej., una ZFP, TALE y/o ARNsg de CRISPR/Cas que se prepara por ingeniería para que se una a un sitio diana seleccionado). En otras realizaciones, la nucleasa comprende dominios de unión a ADN y de escisión heterólogos (p. ej., nucleasas con dedos de cinc; proteínas de unión a ADN con dominio efector TAL; dominios de unión a ADN de meganucleasa con dominios de escisión heterólogos). En otras realizaciones, la nucleasa comprende un sistema tal como el CRISPR/Cas del sistema Ttgo.

A. DOMINIOS DE UNIÓN A ADN

En determinadas realizaciones, la composición y métodos descritos en la presente memoria emplean un dominio de unión a ADN de meganucleasa (endonucleasa de direccionamiento) para la unión a la molécula donante y/o unión a la región de interés en el genoma de la célula. Las meganucleasas naturales reconocen sitios de escisión de 15-40 pares de bases y se agrupan comúnmente en cuatro familias: la familia LAGLIDADG (SEQ ID NO: 17), la familia GIY-YIG, la familia de la caja His-Cyst y la familia HNH. Las endonucleasas de direccionamiento ejemplares incluyen I-SceI, I-CeuI, PI-PsPI, PI-Sce, I-SceIV, I-Csml, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII y I-TevIII. Sus secuencias de reconocimiento son conocidas, Véase, también la Patente de EE. UU. No. 5.420.032; Patente de EE. UU. No. 6.833.252; Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon et al. (1989) *Gene* 82:115-118; Perler et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 y el catálogo de New England Biolabs.

En determinadas realizaciones, los métodos y composiciones descritas en la presente memoria hacen uso de una nucleasa que comprende una endonucleasa de direccionamiento (meganucleasa) preparada por ingeniería (no natural). Las secuencias de reconocimiento de las endonucleasas de direccionamiento y meganucleasas tales como I-SceI, I-CeuI, PI-PsPI,

PI-Sce, I-SceIV, I-Csml, I-PanI, I-Scell, I-Ppol, I-Scelll, I-Crel, I-TevI, I-TevII y I-TevIII se conocen. Véase, también la Patente de EE. UU. No. 5.420.032; Patente de EE. UU. No. 6.833.252; Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon et al. (1989) *Gene* 82:115-118; Perler et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 y el catálogo de New England Biolabs. Además, la especificidad de unión a ADN de las endonucleasas de direccionamiento y meganucleasas puede modificarse por ingeniería para que se unan a sitios diana no naturales. Véase, por ejemplo, Chevalier et al. (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth et al. (2006) *Nature* 441:656-659; Paques et al. (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; Publicación de Patente de EE. UU. No. 2007/0117128. Los dominios de unión a ADN de las endonucleasas de direccionamiento y meganucleasas pueden alterarse en el contexto de la nucleasa como un todo (es decir, de manera que la nucleasa incluya el dominio de escisión cognado) o pueden fusionarse a un dominio de escisión heterólogo.

En otras realizaciones, el dominio de unión a ADN de una o más de las nucleasas usadas en los métodos y composiciones descritas en la presente memoria comprende un dominio de unión a ADN de efector TAL natural o preparado por ingeniería (no natural). Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. No. 8.586,526, incorporada por referencia en su totalidad en la presente memoria. Se sabe que las bacterias patógenas de las plantas del género *Xanthomonas* causan muchas enfermedades en plantas de cultivo importantes. La patogenicidad de *Xanthomonas* depende de un sistema de secreción de tipo III (T3S) conservado que inyecta más de 25 proteínas efectoras diferentes en la célula de la planta. Entre estas proteínas inyectadas están efectores semejantes a activador de la transcripción (TAL) que mimetizan los activadores transcripcionales de la planta y manipulan el transcriptoma de la planta (véase, Kay et al. (2007) *Science* 318:648-651). Estas proteínas contienen un dominio de unión a ADN y un dominio de activación de la transcripción. Uno de los efectores TAL mejor caracterizados es AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (véase, Bonas et al. (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136 y la Publicación de Patente Internacional No. WO 2010/079430). Los efectores TAL contienen un dominio centralizado de repeticiones en tándem, conteniendo cada repetición aproximadamente 34 aminoácidos, que son clave para la especificidad de unión a ADN de estas proteínas. Además, contienen una secuencia de localización nuclear y un dominio de activación transcripcional ácido (para una revisión véase Schornack et al. (2006) *J Plant Physiol* 163(3): 256-272). Además, en las bacterias

fitopatógenas *Ralstonia solanacearum* se ha encontrado que dos genes, designados brg11 y hpx17, son homólogos a la familia AvrBs3 de *Xanthomonas* en la cepa de *R. solanacearum* biovar 1 GMI1000 y en la cepa de biovar 4 RS1000 (Véase, Heuer et al. (2007) *Appl and Envir Micro* 73(13):4379-4384). Estos genes son un 98,9 % idénticos en secuencia de nucleótidos entre sí, pero se diferencian por una delección de 1.575 pb en el dominio de repetición de hpx17. Sin embargo, ambos productos génicos tienen menos del 40 % de identidad de secuencia con las proteínas de la familia AvrBs3 de *Xanthomonas*. Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. No. 8.586.526, incorporada por referencia en su totalidad en la presente memoria.

La especificidad de estos efectores TAL depende de las secuencias encontradas en las repeticiones en tándem. La secuencia repetida comprende aproximadamente 102 pb y las repeticiones son típicamente un 91-100 % homólogas entre sí (Bonas et al., *ibid*). El polimorfismo de las repeticiones está localizado habitualmente en las posiciones 12 y 13 y parece que hay una correspondencia uno a uno entre la identidad de los dirresiduos hipervariables (RVD) en las posiciones 12 y 13 con la identidad de los nucleótidos contiguos en la secuencia diana del efector TAL (véase, Moscou y Bogdanove (2009) *Science* 326:1501 y Boch et al. (2009) *Science* 326:1509-1512). Experimentalmente, se ha determinado el código natural para el reconocimiento del ADN de estos efectores TAL, de manera que una secuencia HD en las posiciones 12 y 13 da lugar a una unión a una citosina (C), NG se une a T, NI a A, C, G o T, NN se une a A o G, e ING se une a T. Estas repeticiones de unión a ADN se han ensamblado en proteínas con nuevas combinaciones y número de repeticiones, para preparar factores de transcripción artificiales que son capaces de interaccionar con nuevas secuencias y activar la expresión de un gen informador no endógeno en las células de las plantas (Boch et al., *ibid*). Las proteínas TAL preparadas por ingeniería se han unido a un semidominio de escisión de FokI para rendir una fusión de nucleasa dominio de efector TAL (TALEN) que presenta actividad en un ensayo informador de levadura (diana basada en plásmido). Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. No. 8.586.526; Christian et al. (2010) *Genetics* epub 10.1534/genetics.110.120717).

En determinadas realizaciones, el dominio de unión a ADN de una o más de las nucleasas usadas para la escisión in vivo y/o escisión dirigida del genoma de una célula comprende una proteína con dedos de cinc. Preferiblemente, la proteína con dedos de cinc no es natural, ya que está preparada por ingeniería para unirse a un sitio diana elegido. Véase, por

ejemplo, Véase, por ejemplo, Beerli et al. (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo et al. (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan et al. (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal et al. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo et al. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416; Patentes de EE. UU. Nos. 6.453.242; 6.534.261; 6.599.692; 6.503.717; 6.689.558; 7.030.215; 6.794.136; 7.067.317; 7.262.054; 7.070.934; 7.361.635; 7.253.273; y Publicaciones de Patente de EE. UU. Nos. 2005/0064474; 2007/0218528; y 2005/0267061, todas incorporadas en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Un dominio de unión con dedos de cinc preparado por ingeniería puede tener una nueva especificidad de unión, en comparación con una proteína con dedos de cinc natural. Los métodos de ingeniería incluyen, pero no están limitados a, diseño racional y diversos tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, el uso de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos en triplete (o cuadruplete) y secuencias de aminoácidos de dedos de cinc individuales, en las que cada secuencia de nucleótidos en triplete o cuadruplete está asociada con una o más secuencias de aminoácidos de dedos de cinc que se unen a la secuencia de triplete o cuadruplete particular. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. en copropiedad Nos. 6.453.242 y 6.534,261, incorporadas por referencia en la presente memoria en su totalidad.

Los métodos de selección ejemplares, incluyendo exposición en fagos y sistemas de dos híbridos, se describen en las Patentes de EE. UU. Nos. 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.410.248; 6.140.466; 6.200.759; y 6.242.568; así como en las Publicaciones de Patente Internacional Nos. WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; y WO 01/88197. Además, el aumento de la especificidad de unión para los dominios de unión con dedos de cinc se ha descrito, por ejemplo, en la Publicación de Patente Internacional en copropiedad No. WO 02/077227.

Además, como se describe en estas y otras referencias, los dominios con dedos de cinc y/o las proteínas con múltiples dedos con dedos de cinc pueden unirse entre sí usando cualesquiera secuencias conectoras adecuadas, incluyendo, por ejemplo, conectores con una longitud de 5 o más aminoácidos. Véanse, también, las Patentes de EE. UU. Nos. 8.772.453; 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para secuencias conectoras ejemplares. Las proteínas descritas en la presente memoria pueden incluir cualquier combinación de conectores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína.

La selección de sitios diana; ZFP y métodos para el diseño y construcción de proteínas de fusión (y polinucleótidos que codifican las mismas) son conocidos para los expertos en la técnica y se describen con detalle en las Patentes de EE. UU. Nos. 6.140.081; 5.789.538; 6.453.242; 6.534.261; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; y 6.200.759; Publicaciones de Patente Internacional Nos. WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536; y WO 03/016496.

Además, como se describe en estas y otras referencias, los dominios con dedos de cinc y/o las proteínas con múltiples dedos con dedos de cinc pueden unirse entre sí usando cualesquiera secuencias conectoras adecuadas, incluyendo, por ejemplo, conectores con una longitud de 5 o más aminoácidos. Véanse, también, las Patentes de EE. UU. Nos. 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para secuencias conectoras ejemplares con una longitud de 6 o más aminoácidos. Las proteínas descritas en la presente memoria pueden incluir cualquier combinación de conectores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína.

La nucleasa con dedos de cinc puede comprender una pareja de ZFN (que comprende ZFN izquierda y derecha) en la que cada pareja de ZFN comprende una nucleasa (dominio de escisión) y una ZFP dirigida a BCL11A. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. Nos. 9.963.715; 9.650.648; Publicaciones de Patente de EE. UU. Nos. 2015/0132269 y 2018/0111975. En determinadas realizaciones, la pareja de ZFN de los ARNm modifica específicamente BCL11A (p. ej., la región potenciadora +58) en comparación con cualquier otro loci (fuera de la diana) y/o en comparación con otras nucleasas dirigidas a BCL11A (p. ej., ZFN sin modificaciones en el núcleo, modificaciones que se describen en la Patente de EE. UU. No. 10.563.184). Por tanto, las células producidas usando los ARNm descritos en la presente memoria se modifican específicamente en el locus de BCL11A, incluyendo en el que menos del 10 % (0 al 10 % de cualquier valor intermedio), preferiblemente menos del 5 % (0 al 5 % o cualquier valor intermedio), incluso más preferiblemente menos del 1 % de las células (0 al 1 % o cualquier valor intermedio) e incluso más preferiblemente menos del 0,5 % (0 al 1 % o cualquier valor intermedio) de las células modificadas genéticamente incluyen modificaciones genéticas hechas por el o los ARNm fuera del locus de BCL11A. Véase, p.

ej., la Patente de EE. UU. No. 10.563.184. Estas células pueden incluir modificaciones adicionales, por ejemplo, inactivación de los genes HLA.

En determinadas realizaciones, el dominio de unión a ADN de la nucleasa es parte de un sistema de nucleasa CRISPR/Cas, incluyendo, por ejemplo, un único ARN guía (ARNsg). Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. No. 8.697.359 y la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2015/0056705. El locus CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas regularmente), que codifica componentes de ARN del sistema, y el locus Cas (asociado a CRISPR), que codifica proteínas (Jansen et al. (2002) *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575; Makarova et al. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:482-496; Makarova et al. (2006) *Biol. Direct* 1:7; Haft et al. (2005) *PLoS Comput. Biol.* 1:e60) constituyen las secuencias génicas del sistema de nucleasa CRISPR/Cas. Los loci CRISPR en los huéspedes microbianos contienen una combinación de genes asociados a CRISPR (Cas), así como elementos de ARN no codificadores capaces de programar la especificidad de la escisión de ácidos nucleicos mediada por CRISPR.

El CRISPR de Tipo II es uno de los sistemas mejor caracterizados y lleva a cabo la rotura de cadena doble dirigida de ADN en cuatro etapas secuenciales. En primer lugar, dos ARN no codificadores, la matriz de pre-crARN y tracrARN, se transcriben a partir del locus CRISPR. En segundo lugar, el tracrARN hibrida con las regiones repetidas del pre-crARN y media el procesamiento del pre-crARN en crARNA maduros que contienen secuencias espaciadoras individuales. En tercer lugar, el complejo de crARN maduro:tracrARN dirige a Cas9 al ADN diana a través de emparejamiento de bases de Watson-Crick entre el espaciador en el crARN y el protoespaciador en el ADN diana cerca del resto adyacente al protoespaciador (PAM), un requerimiento adicional para el reconocimiento de la diana. Finalmente, Cas9 media la escisión del ADN diana para crear una rotura de cadena doble en el protoespaciador. La actividad del sistema CRISPR/Cas comprende tres etapas: (i) inserción de secuencias de ADN ajeno en la matriz CRISPR para prevenir ataques futuros, en un proceso denominado 'adaptación', (ii) expresión de las proteínas relevantes, así como expresión y procesamiento de la matriz, seguido de (iii) interferencia mediada por ARN con el ácido nucleico ajeno. Por tanto, en la célula bacteriana, varias de las denominadas proteínas 'Cas' están implicadas en la función natural del sistema CRISPR/Cas y cumplen papeles en funciones tales como la inserción del ADN ajeno etc.

En algunas realizaciones, se usa el sistema CRISPR-Cpf1. El sistema CRISPR-Cpf1, identificado en *Francisella* spp., es un sistema CRISPR-Cas de clase 2 que media la interferencia robusta de ADN en las células humanas. Aunque está conservado funcionalmente, Cpf1 y Cas9 se diferencian en muchos aspectos incluyendo en sus ARN guías y especificidad de sustrato (véase, Fagerlund et al. (2015) *Genom Bio* 16:251). Una diferencia principal entre las proteínas Cas9 y Cpf1 es que Cpf1 no utiliza tracrARN, y por tanto solo requiere un crARN. Los crARN de FnCpf1 tienen una longitud de 42–44 nucleótidos (repetición de 19 nucleótidos y espaciador de 23–25 nucleótidos) y contienen un único tallo-bucle, que tolera cambios de secuencia que retienen la estructura secundaria. Además, los crARN de Cpf1 son significativamente más cortos que los ARNs de ~100-nucleótidos preparados por ingeniería requeridos por Cas9, y los requerimientos de PAM para FnCpf1 son 5'-TTN-3' y 5'-CTA-3' en la cadena desplazada. Aunque tanto Cas9 como Cpf1 hacen roturas de cadena doble en el ADN diana, Cas9 usa sus dominios semejantes a RuvC y HNH para hacer cortes de extremos romos en la secuencia semilla del ARN guía, mientras que Cpf1 usa un dominio semejante a RuvC para producir cortes escalonados fuera de la semilla. Como Cpf1 hace cortes escalonados lejos de la región semilla crítica, la NHEJ no disrumpirá el sitio diana, asegurando por lo tanto que Cpf1 puede continuar cortando el mismo sitio hasta que haya tenido lugar el evento de recombinación HDR deseado. Por tanto, en los métodos y composiciones descritas en la presente memoria, se entiende que el término “Cas” incluye ambas proteínas, Cas9 y Cpf1. Por tanto, tal y como se usa en la presente memoria, un “sistema CRISPR/Cas” se refiere a ambos sistemas CRISPR/Cas y/o CRISPR/Cpf1, incluyendo tanto sistemas de nucleasa, nickasa y/o factor de transcripción.

En algunas realizaciones, pueden usarse otras proteínas Cas. Algunas proteínas Cas ejemplares incluyen Cas9, Cpf1 (también conocida como Cas12a), C2c1, C2c2 (también conocida como Cas13a), C2c3, Cas1, Cas2, Cas4, CasX y CasY; e incluyen variantes de las mismas preparadas por ingeniería y naturales (Burstein et al. (2017) *Nature* 542:237-241) por ejemplo HF1/spCas9 (Kleinstiver et al. (2016) *Nature* 529: 490-495; Cebrian-Serrano y Davies (2017) *Mamm Genome* (2017) 28(7):247-261); sistemas Cas9 divididos (Zetsche et al. (2015) *Nat Biotechnol* 33(2):139-142), Cas9 con corte y empalme en trans basado en un sistema de inteína-exteína (Truong et al. (2015) *Nucl Acid Res* 43(13):6450-8); mini-SaCas9 (Ma et al. (2018) *ACS Synth Biol* 7(4):978-985). Por tanto, en los métodos y composiciones descritas en la presente memoria, se entiende que el término “Cas” incluye todas las proteínas variantes Cas, tanto naturales como preparadas por ingeniería.

En determinadas realizaciones, la proteína Cas puede ser un “derivado funcional” de una proteína Cas natural. Un “derivado funcional” de un polipéptido de secuencia nativa es un compuesto que tiene una propiedad biológica cualitativa en común con un polipéptido de secuencia nativa. Los “derivados funcionales” incluyen, pero no están limitados a, fragmentos de una secuencia nativa y derivados de un polipéptido de secuencia nativa y sus fragmentos, siempre que tengan una actividad biológica en común con un polipéptido de secuencia nativa correspondiente. Una actividad biológica contemplada en la presente memoria es la capacidad del derivado funcional de hidrolizar un sustrato de ADN en fragmentos. El término “derivado” engloba tanto variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido, modificaciones covalentes, y fusiones de los mismos. Los derivados adecuados de un polipéptido Cas o un fragmento del mismo incluyen, pero no están limitados a, mutantes, fusiones, modificaciones covalentes de la proteína Cas o un fragmento de la misma. La proteína Cas, que incluye la proteína Cas o un fragmento de la misma, así como los derivados de la proteína Cas o un fragmento de los mismos, pueden obtenerse de una célula o sintetizarse químicamente o por una combinación de estos dos procedimientos. La célula puede ser una célula que produce naturalmente la proteína Cas, o una célula que produce naturalmente la proteína Cas y está modificada por ingeniería genética para producir la proteína Cas endógena a un nivel de expresión mayor o para producir una proteína Cas a partir de un ácido nucleico introducido exógenamente, ácido nucleico que codifica una Cas que es la misma o diferente de la Cas endógena. En algunos casos, la célula no produce naturalmente la proteína Cas y está modificada por ingeniería genética para producir una proteína Cas. Los ejemplos no limitativos adicionales de nucleasas guiadas por ARN que pueden usarse además de y/o en lugar de las proteínas Cas incluyen proteínas CRISPR de Clase 2 tales como Cpf1. Véase, p. ej., Zetsche et al. (2015) *Cell* 163:1-13.

En algunas realizaciones, el dominio de unión a ADN es parte de un sistema TtAgo (véase, Swarts et al. (2014) *Nature* 507(7491):258-261; Swarts et al. (2012) *PLoS One* 7(4):e35888 y Sheng et al. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(2):652-657). En eucariotas, el silenciamiento génico está mediado por la familia de proteínas Argonauta (Ago). En este paradigma, Ago se une a ARN pequeños (19-31 nucleótidos). Este complejo de silenciamiento proteína-ARN reconoce ARN dianas mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick entre el ARN pequeño y la diana y escinde endonucleolíticamente el ARN diana (Vogel (2014) *Science* 344:972-973). Por el contrario, las proteínas Ago procariotas se

unen a fragmentos de ADN monocatenarios pequeños y funcionan de la misma manera para detectar y eliminar el ADN extraño (frecuentemente viral) (Yuan et al. (2005) Mol. Cell 19:405; Olovnikov et al. (2013) Mol. Cell 51:594; Swarts et al., *ibid*). Las proteínas Ago procariotas ejemplares incluyen las de *Aquifex aeolicus*, *Rhodobacter sphaeroides*, y *Thermus thermophilus*.

Una de las proteínas Ago procariotas mejor caracterizadas es la de *T. thermophilus* (TtAgo; Swarts et al., *ibid*). TtAgo se asocia con fragmentos de ADN monocatenarios bien de 15 nucleótidos o 13-25 nucleótidos con grupos fosfato en 5'. Este "ADN guía" unido por TtAgo sirve para dirigir el complejo proteína-ADN para unirse a una secuencia de ADN complementaria por Watson-Crick en una molécula de ADN que es una tercera parte. Una vez que la información de la secuencia en estos ADN guía ha permitido la identificación del ADN diana, el complejo TtAgo-ADN guía escinde el ADN diana. Dicho mecanismo también está apoyado por la estructura del complejo TtAgo-ADN guía mientras está unido a su ADN diana (Sheng et al., *ibid*). Ago de *Rhodobacter sphaeroides* (RsAgo) tiene propiedades similares (Olovnikov et al., *ibid*).

Los ADN guía exógenos con una secuencia de ADN arbitraria pueden cargarse en la proteína TtAgo (Swarts et al., *ibid*). Como la especificidad de la escisión de TtAgo está dirigida por el ADN guía, un complejo TtAgo-ADN formado con un ADN guía exógeno, especificado por el investigador, dirigirá, por lo tanto, la escisión de ADN diana por TtAgo a un ADN diana complementario especificado por el investigador. De esta manera, se puede crear una rotura de cadena doble dirigida en el ADN. El uso del sistema TtAgo-ADN guía (o sistemas ortólogos Ago-ADN guía de otros organismos) permite la escisión dirigida de ADN genómico en las células. Dicha escisión puede ser bien mono o bicatenaria. Para la escisión de ADN genómico de mamíferos, sería preferible usar una versión de TtAgo optimizada por codones para la expresión en células de mamíferos. Además, podría ser preferible tratar las células con un complejo TtAgo-ADN formado *in vitro* donde la proteína TtAgo se fusiona con un péptido que penetra en la célula. Además, podría ser preferible usar una versión de la proteína TtAgo que ha sido alterada mediante mutagénesis para tener una actividad mejorada a 37 grados Celsius. La escisión de ADN mediada por TtAgo-ARN podría usarse para afectar una panoplia de resultados, incluyendo la inactivación génica, adición de genes dirigida, corrección génica, delección génica dirigida usando técnicas estándar en la técnica para la explotación de roturas en el ADN.

Por tanto, la nucleasa comprende un dominio de unión a ADN que se une específicamente a un sitio diana en cualquier gen en el que se desea insertar un donante (transgén).

En determinadas realizaciones los dominios de unión a ADN se unen a albúmina, p. ej., dominios de unión a ADN de las ZFP designadas SBS-47171 y SBS-47898. Véase, p. ej., la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2015/0159172.

B. DOMINIOS DE ESCISIÓN

Cualquier dominio de escisión adecuado puede asociarse con (p. ej., unirse operativamente a) un dominio de unión a ADN para formar una nucleasa. Por ejemplo, los dominios de unión a ADN de ZFP se han fusionado con dominios de nucleasa para crear ZFN – una entidad funcional que es capaz de reconocer su ácido nucleico diana pretendido a través de su dominio de unión a ADN preparado por ingeniería (ZFP) y causar que el ADN se corte cerca del sitio de unión de ZFP a través de la actividad nucleasa. Véase, p. ej., Kim et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(3):1156-1160. Más recientemente, se han usado ZFN para la modificación genómica en una variedad de organismos. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de EE. UU. Nos. 2003/0232410; 2005/0208489; 2005/0026157; 2005/0064474; 2006/0188987; 2006/0063231; y la Publicación de Patente Internacional No. WO 07/014275. Asimismo, los dominios de unión a ADN de TALE se han fusionado a dominios de nucleasa para crear TALEN. Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. No. 8.586.526. También se han descrito sistemas de nucleasa CRISPR/Cas que comprenden únicos ARN guía (ARNsg) que se unen a ADN y se asocian con dominios de escisión (p. ej., dominios Cas) para inducir una escisión dirigida. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. Nos. 8.697.359 y 8.932.814 y la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2015/0056705.

Como se ha indicado anteriormente, el dominio de escisión puede ser heterólogo respecto al dominio de unión a ADN, por ejemplo, un dominio de unión a ADN con dedos de cinc y un dominio de escisión de una nucleasa o un dominio de unión a ADN de TALEN y un dominio de escisión de una nucleasa; un dominio de unión a ADN de ARNsg y un dominio de escisión de una nucleasa (CRISPR/Cas); y/o dominio de unión a ADN de meganucleasa y dominio de escisión de una nucleasa diferente. Los dominios de escisión heterólogos pueden obtenerse de cualquier endonucleasa o exonucleasa. Las endonucleasas ejemplares de las que se puede derivar un dominio de escisión incluyen, pero no están limitadas a, endonucleasas de restricción y endonucleasas de direccionamiento. Véase, por ejemplo, el

Catálogo 2002-2003, New England Biolabs, Beverly, MA; y Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388. Las enzimas adicionales que pueden escindir ADN son conocidas (p. ej., Nucleasa S1; nucleasa de frijol mungo; ADNasa I pancreática; nucleasa micrococal; endonucleasa HO de levadura; véase también, Linn et al. (eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Una o más de estas enzimas (o fragmentos funcionales de las mismas) puede usarse como una fuente de dominios de escisión y semidominios de escisión.

De manera similar, un semidominio de escisión puede derivar de cualquier nucleasa o parte de la misma, como se ha mostrado anteriormente, que requiere la dimerización para la actividad de escisión. En general, se requieren dos proteínas de fusión para la escisión, si las proteínas de fusión comprenden semidominios de escisión. Alternativamente, puede usarse una única proteína que comprende dos semidominios de escisión. Los dos semidominios de escisión pueden derivar de la misma endonucleasa (o fragmentos funcionales de la misma), o cada semidominio de escisión puede derivar de una endonucleasa diferente (o fragmentos funcionales de la misma). Además, los sitios diana para las dos proteínas de fusión están dispuestos preferiblemente, uno con respecto al otro, de manera que la unión de las dos proteínas de fusión a sus sitios diana respectivos pone los semidominios de escisión en una orientación espacial uno respecto al otro que permite que los semidominios de escisión formen un dominio de escisión funcional, p. ej., por dimerización. Por tanto, en determinadas realizaciones, los bordes cercanos de los sitios diana están separados por 5-8 nucleótidos o por 15-18 nucleótidos. Sin embargo, cualquier número entero de nucleótidos o pares de nucleótidos puede interponerse entre dos sitios diana (p. ej., de 2 a 50 pares de nucleótidos o más). En general, el sitio de la escisión se encuentra entre los sitios diana.

Las endonucleasas de restricción (enzimas de restricción) están presentes en muchas especies y son capaces de unirse a ADN de manera específica de secuencia (en un sitio de reconocimiento), y escindir el ADN en o cerca del sitio de la unión. Determinadas enzimas de restricción (p. ej., del Tipo IIS) escinden el ADN en sitios alejados del sitio de reconocimiento y tienen dominios de unión y de escisión separables. Por ejemplo, la enzima de Tipo IIS FokI cataliza la escisión de cadena doble del ADN, a 9 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en una cadena y 13 nucleótidos desde su sitio de reconocimiento en la otra. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Nos. 5.356.802; 5.436.150 y 5.487.994; así como Li et al.

(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887; Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982. Por tanto, en una realización, las proteínas de fusión comprenden el dominio de escisión (o semidominio de escisión) de al menos una enzima de restricción de Tipo IIS y uno o más dominios de unión con dedos de cinc, que pueden estar o no preparados por ingeniería.

Una enzima de restricción de Tipo IIS ejemplar, cuyo dominio de escisión es separable del dominio de unión, es FokI. Esta enzima particular es activa como un dímero. Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10.570-10.575. Por consiguiente, para los propósitos de la presente descripción, la parte de la enzima FokI usada en las proteínas de fusión descritas se considera un semidominio de escisión. Por tanto, para la escisión de cadena doble y/o reemplazo dirigido de secuencias celulares usando fusiones dedos de cinc-FokI, pueden usarse dos proteínas de fusión, comprendiendo cada una un semidominio de escisión de FokI, para reconstituir un dominio de escisión catalíticamente activo. Alternativamente, también puede usarse una única molécula de polipéptido que contiene un dominio de unión con dedos de cinc y dos semidominios de escisión de FokI. Los parámetros para la escisión dirigida y la alteración de secuencia dirigida usando fusiones dedos de cinc-FokI se proporcionan en otro lugar de esta descripción.

Un dominio de escisión o semidominio de escisión puede ser cualquier parte de una proteína que retiene la actividad de escisión, o que retiene la capacidad de multimerizar (p. ej., dimerizar) para formar un dominio de escisión funcional.

Las enzimas de restricción de Tipo IIS ejemplares se describen en la Patente de EE. UU. No. 7.888.121, incorporada en la presente memoria en su totalidad. Las enzimas de restricción adicionales también contienen dominios de unión y de escisión separables, y estas se contemplan por la presente descripción. Véase, por ejemplo, Roberts et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420.

En determinadas realizaciones, el dominio de escisión comprende uno o más semidominios de escisión preparados por ingeniería (también referidos como mutantes de dominio de dimerización) que minimizan o previenen la homodimerización, como se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. Nos. 8.772.453; 8.623.618; 8.409.861; 8.034.598; 7.914.796; y 7.888.121, cuyas descripciones se incorporan por referencia en su totalidad en

la presente memoria. Los residuos de aminoácidos en las posiciones 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537, y 538 de FokI son todos dianas para influir en la dimerización de los semidominios de escisión de FokI.

Los semidominios de escisión de FokI preparados por ingeniería ejemplares que forman heterodímeros obligados incluyen una pareja en la que un primer semidominio de escisión incluye mutaciones en los residuos de aminoácidos en las posiciones 490 y 538 de FokI y un segundo semidominio de escisión incluye mutaciones en los residuos de aminoácidos 486 y 499.

Por tanto, en una realización, una mutación en 490 reemplaza Glu (E) por Lys (K); la mutación en 538 reemplaza Iso (I) por Lys (K); la mutación en 486 reemplaza Gln (Q) por Glu (E); y la mutación en la posición 499 reemplaza Iso (I) por Lys (K). Específicamente, los semidominios de escisión preparados por ingeniería descritos en la presente memoria se prepararon mutando las posiciones 490 (E→K) y 538 (I→K) en un semidominio de escisión para producir un semidominio de escisión preparado por ingeniería designado “E490K:I538K” y mutando las posiciones 486 (Q→E) y 499 (I→L) en otro semidominio de escisión para producir un semidominio de escisión preparado por ingeniería designado “Q486E:I499L”. Los semidominios de escisión preparados por ingeniería descritos en la presente memoria son mutantes de heterodímero obligados en los que la escisión aberrante se minimiza o suprime. Patentes de EE. UU. Nos. 7.914.796 y 8.034.598, cuyas descripciones se incorporan por referencia en su totalidad. En determinadas realizaciones, el semidominio de escisión preparado por ingeniería comprende mutaciones en las posiciones 486, 499 y 496 (numeradas en relación con la *FokI* de tipo salvaje), por ejemplo, mutaciones que reemplazan el residuo de Gln (Q) de tipo salvaje en la posición 486 por un residuo de Glu (E), el residuo de Iso (I) de tipo salvaje en la posición 499 por un residuo de Leu (L) y el residuo de Asn (N) de tipo salvaje en la posición 496 por un residuo de Asp (D) o Glu (E) (también referido como dominios “ELD” y “ELE”, respectivamente). En otras realizaciones, el semidominio de escisión preparado por ingeniería comprende mutaciones en las posiciones 490, 538 y 537 (numeradas en relación con la *FokI* de tipo salvaje), por ejemplo, mutaciones que reemplazan el residuo de Glu (E) de tipo salvaje en la posición 490 por un residuo de Lys (K), el residuo de Iso (I) de tipo salvaje en la posición 538 por un residuo de Lys (K), y el residuo de His (H) de tipo salvaje en la posición 537 por un residuo de Lys (K) o un residuo de Arg (R) (también referido como dominios “KKK” y “KKR”, respectivamente). En otras

realizaciones, el semidominio de escisión preparado por ingeniería comprende mutaciones en las posiciones 490 y 537 (numeradas en relación con la *FokI* de tipo salvaje), por ejemplo, mutaciones que reemplazan el residuo de Glu (E) de tipo salvaje en la posición 490 por un residuo de Lys (K) y el residuo de His (H) de tipo salvaje en la posición 537 por un residuo de Lys (K) o un residuo de Arg (R) (también referido como dominios “KIK” y “KIR”, respectivamente). Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. No. 8.772.453. En otras realizaciones, el semidominio de escisión preparado por ingeniería comprende la “Sharkey” y/o “mutaciones Sharkey” (véase, Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 400(1):96-107).

Los semidominios de escisión preparados por ingeniería descritos en la presente memoria pueden prepararse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio de semidominios de escisión de tipo salvaje (*FokI*) como se describe en las Patentes de EE. UU. Nos. 7.888.121; 7.914.796; 8.034.598; y 8.623.618.

Alternativamente, pueden ensamblarse nucleasas in vivo en el sitio diana del ácido nucleico usando la denominada tecnología “enzima fragmentada” (véase, p. ej., la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2009/0068164). Los componentes de dichas enzimas fragmentadas pueden expresarse bien en construcciones de expresión separadas, o pueden unirse en un marco de lectura abierto en el que los componentes individuales están separados, por ejemplo, por un péptido de auto-escisión 2A o secuencia IRES. Los componentes pueden ser dominios de unión con dedos de cinc individuales o dominios de un dominio de unión a ácido nucleico de una meganucleasa.

Las nucleasas pueden cribarse para determinar su actividad antes de su uso, por ejemplo, en un sistema cromosómico basado en levaduras como se describe en la Patente de EE. UU. No. 8.563.314. La expresión de la nucleasa puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o un promotor inducible, por ejemplo, el promotor de la galactoquinasa que se activa (desreprime) en presencia de rafinosa y/o galactosa y se reprime en presencia de glucosa.

El sistema CRISPR/Cas relacionado con Cas9 comprende dos componentes de ARN no codificadores: tracrARN y una matriz de pre-crARN que contienen secuencias guía de nucleasa (espaciadores) interespaciadas por repeticiones directas idénticas (DR). Para usar un sistema CRISPR/Cas para conseguir ingeniería genómica, ambas funciones de estos ARN deben estar presentes (véase, Cong et al. (2013) *Scienceexpress* 1/10.1126/science

1231143). En algunas realizaciones, el tracrARN y pre-crARNA se suministran mediante construcciones de expresión separadas o como ARN separados. En otras realizaciones, se construye un ARN quimérico donde un crARN maduro preparado por ingeniería (que confiere especificidad de diana) se fusiona con un tracrARN (que suministra la interacción con Cas9) para crear un híbrido cr-ARN-tracrARN quimérico (también denominado un único ARN guía). (véase, Jinek et al. (2012) *Science* 337:816-821, Jinek et al. (2013) *eLife* 2:e00471 y Cong, *ibid*).

La o las nucleasas como se describe en la presente memoria pueden hacer uno o más cortes de cadena doble y/o cadena sencilla en el sitio diana. En determinadas realizaciones, la nucleasa comprende un dominio de escisión catalíticamente inactivo (p. ej., proteína FokI y/o Cas). Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. Nos. 9.200.266; 8.703.489 y Guillinger et al. (2014) *Nature Biotech.* 32(6):577-582. El dominio de escisión catalíticamente inactivo puede actuar, en combinación con un dominio catalíticamente activo, como una nickasa para hacer un corte de cadena sencilla. Por lo tanto, pueden usarse dos nickasas en combinación para hacer un corte de cadena doble en una región específica. En la técnica también se conocen nickasas adicionales, por ejemplo, McCaffery et al. (2016) *Nucleic Acids Res.* 44(2):e11. doi: 10.1093/nar/gkv878. Epub 19 de oct de 2015.

Por tanto, puede usarse cualquier nucleasa que comprenda un dominio de unión a ADN y dominio de escisión. En determinadas realizaciones, la nucleasa comprende una ZFN compuesta por primera y segunda (también referidas como ZFN izquierda y derecha), por ejemplo, una ZFN que comprende una primera ZFN que comprende una ZFP designada SBS-63014 y un dominio de escisión y una segunda ZFN que comprende una ZFP designada SBS-65722 y un dominio de escisión. En determinadas realizaciones, las ZFN izquierda y derecha (primera y segunda) de la ZFN son portadas por el mismo vector y en otras realizaciones, los componentes emparejados de la ZFN son portados por vectores diferentes, por ejemplo, dos vectores de ARNm como se muestra en el Ejemplo 1, uno designado ARNm SB-mRENH1 (un ARNm que codifica la ZFN que comprende la ZFP designada 63014) y el otro designado ARNm SB-mRENH2 (un ARNm que codifica la ZFN que comprende la ZFP designada 65722).

SITIOS DIANA

Como se ha descrito con detalle anteriormente, los dominios de ADN pueden prepararse por ingeniería para unirse a cualquier secuencia de elección en un locus, por ejemplo, un gen de albúmina u otro seguro. Un dominio de unión a ADN preparado por ingeniería puede tener una nueva especificidad de unión, en comparación con un dominio de unión a ADN natural. Los métodos de ingeniería incluyen, pero no están limitados a, diseño racional y diversos tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, el uso de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos en triplete (o cuádruplete) y secuencias de aminoácidos individuales (*p. ej.*, dedos de cinc), en las que cada secuencia de nucleótidos en triplete o cuádruplete está asociada con una o más secuencias de aminoácidos de dominio de unión a ADN que se unen a la secuencia en triplete o cuádruplete particular. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. en copropiedad Nos. 6.453.242 y 6.534.261, incorporadas por referencia en la presente memoria en su totalidad. También puede realizarse el diseño racional de los dominios efectores de TAL. Véase, *p. ej.*, la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2011/0301073.

Los métodos de selección ejemplares aplicables a dominios de unión a ADN, incluyendo exposición en fagos y sistemas de dos híbridos, se describen en las Patentes de EE. UU. Nos. 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.410.248; 6.140.466; 6.200.759; y 6.242.568; así como en las Publicaciones de Patente Internacional Nos. WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; y WO 01/88197 y GB 2.338.237.

La selección de sitios diana; nucleasas y métodos para el diseño y construcción de proteínas de fusión (y polinucleótidos que codifican las mismas) son conocidos para los expertos en la técnica y se describen con detalle en las Publicaciones de Patente de EE. UU. Nos. 2005/0064474 y 2006/0188987, incorporadas por referencia en su totalidad en la presente memoria.

Además, como se describe en estas y otras referencias, los dominios de unión a ADN (*p. ej.*, proteínas con múltiples dedos con dedos de cinc) pueden unirse entre sí usando cualesquiera secuencias conectoras adecuadas, incluyendo, por ejemplo, conectores de 5 o más aminoácidos. Véanse, *p. ej.*, las Patentes de EE. UU. Nos. 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para secuencias conectoras ejemplares de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en la presente memoria pueden incluir cualquier combinación de

conectores adecuados entre los dominios de unión a ADN individuales de la proteína. Véase, *también*, la Patente de EE. UU. No. 8.586.526.

En determinadas realizaciones, el o los sitios diana para el o los dominios de unión a ADN están en un gen de BCL11A. Véanse, *p. ej.*, las Patentes de EE. UU. Nos. 10.563.184; 9.963.715; 9.650.648; Publicaciones de Patente de EE. UU. Nos. 2015/0132269; 2018/0111975; y 2019/0177709.

COMPOSICIONES/SISTEMAS DE LA INVENCION

En la presente memoria se describen HSC/PC autólogas modificadas que se administran al sujeto para llevar a cabo los métodos según determinadas realizaciones. Dos ARNm que codifican los compañeros de ZFN derecho e izquierdo se administran a las HSC/PC recogidas que están dirigidas a la secuencia potenciadora eritroide de BCL11a. En determinadas realizaciones, los ARNm incluyen SB-mRENH1 y SB-mRENH2. En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, las HSC/PC CD34+ se recogen (*p. ej.*, aféresis) después de la movilización en el sujeto por tratamiento del sujeto con una o más dosis de G-CSF y/o una o más dosis de plerixafor antes del aislamiento y las células movilizadas. En determinadas realizaciones, se recogen al menos aproximadamente 25×10^6 HSPC CD34+/kg en total o por ciclo de aféresis y pueden cultivarse durante cualquier periodo de tiempo. Las células modificadas genéticamente resultantes pueden cultivarse y los descendientes de las mismas incluirán la modificación genética específica de BCL11A (*p. ej.*, menos del 1 % de las células tienen modificaciones fuera de la diana (no BCL11A)), pero no necesariamente el o los ARNm.

Las células que comprenden la inactivación de BCL11A se infunden entonces en los sujetos. Pueden hacerse modificaciones adicionales, por ejemplo, inactivación de genes HLA, en las células modificadas genéticamente específicas para BCL11A.

CÉLULAS

En la presente memoria también se proporcionan células modificadas genéticamente, por ejemplo, HSC/PC que comprenden una inactivación dirigida del potenciador eritroide de BCL11A. La inactivación se crea por tratamiento de las HSC/PC recogidas con ARNm que codifican los compañeros de ZFN derecho e izquierdo que, cuando se traducen, darán lugar a una ZFN activa. La ZFN escinde el potenciador eritroide de BCL11A de manera que se

produce una rotura de cadena doble en el ADN. La maquinaria celular repara la rotura de cadena doble usando unión de extremos no homóloga tendente a error (NHEJ) que da lugar a la inserción y delección de nucleótidos (indels) alrededor del sitio de escisión.

Pueden usarse tanto HSC/PC autólogas (*p. ej.*, derivadas del sujeto) como alogénicas (derivadas de un donante sano) en la realización del método.

Las células como se describen en la presente memoria son útiles en terapia celular para tratar y/o prevenir la enfermedad de la β -talasemia en un sujeto con el trastorno. En el caso de células madre modificadas, después de la infusión en el sujeto, también ocurre la diferenciación in vivo de estos precursores en células que expresan la proteína funcional (del donante insertado).

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden las células como se describen en la presente memoria. Además, las células pueden crioconservarse antes de la administración a un sujeto.

Las poblaciones de células (y composiciones) descritas en la presente memoria comprenden células modificadas genéticamente específicamente en el locus de BCL11A, incluyendo poblaciones de células modificadas genéticamente en las que menos del 10 % (0 al 10 % de cualquier valor intermedio), preferiblemente menos del 5 % (0 al 5 % o cualquier valor intermedio), incluso más preferiblemente menos del 1 % de las células (0 al 1 % o cualquier valor intermedio) e incluso más preferiblemente menos del 0,5 % (0 al 1 % o cualquier valor intermedio) de las células incluyen modificaciones genéticas fuera del locus de BCL11A (pero pueden incluir modificaciones adicionales tales como la inactivación de marcadores HLA).

ADMINISTRACIÓN

La administración *ex vivo* de nucleasas, polinucleótidos que codifican estas nucleasas, polinucleótidos donantes y composiciones que comprenden las proteínas y/o polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden administrarse a las HSC/PC recogidas por cualquier medio adecuado.

Los métodos para administrar nucleasas como se describen en la presente memoria se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. Nos. 6.453.242; 6.503.717; 6.534.261;

6.599.692; 6.607.882; 6.689.558; 6.824.978; 6.933.113; 6.979.539; 7.013.219; y 7.163.824, cuyas descripciones se incorporan por referencia en la presente memoria en su totalidad.

Las nucleasas y/o construcciones donantes como se describen en la presente memoria también pueden administrarse usando vectores que contienen secuencias que codifican una o más de la o las proteínas con dedos de cinc, dominio efector TAL y/o Cas. Pueden usarse cualesquiera sistemas de vectores incluyendo, pero no limitados a, vectores plasmídicos, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores de adenovirus, vectores de poxvirus; vectores de herpesvirus y vectores de virus adeno-asociados, etc. Véanse, también, las Patentes de EE. UU. Nos. 6.534.261; 6.607.882; 6.824.978; 6.933.113; 6.979.539; 7.013.219; y 7.163.824, incorporadas por referencia en la presente memoria en su totalidad.

Pueden usarse métodos convencionales de transferencia génica basados en virus y no basados en virus para introducir ácidos nucleicos que codifican nucleasas y construcciones donantes en células (p. ej., células de mamíferos) y tejidos diana. Los sistemas de administración de vectores no virales incluyen plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo, y ácido nucleico en complejo con un vehículo de administración tal como un liposoma o poloxámero. Los sistemas de administración de vectores virales incluyen virus con ADN y ARN, que tienen genomas bien episomales o integrados después de la administración a la célula. Para una revisión de los procedimientos de terapia génica, véase, Anderson (1992) *Science* 256:808-813; Nabel y Felgner (1993) *TIBTECH* 11:211-217; Mitani y Caskey (1993) *TIBTECH* 11:162-166; Dillon (1993) *TIBTECH* 11:167-175; Miller (1992) *Nature* 357:455-460; Van Brunt (1988) *Biotechnology* 6(10):1149-1154; Vigne (1995) *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36; Kremer y Perricaudet (1995) *British Medical Bulletin* 51(1):31-44; Haddada et al., en *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler y Böhm (eds.) (1995); y Yu et al. (1994) *Gene Therapy* 1:13-26.

Los métodos de administración no viral de ácidos nucleicos incluyen electroporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, polimerización o conjugados de lípido:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, y captación de ADN aumentada por agentes. También puede usarse la sonoporación usando, p. ej., el sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) para la administración de ácidos nucleicos.

Los sistemas de administración de ácidos nucleicos adicionales ejemplares incluyen los proporcionados por Amaxa Biosystems (Colonia, Alemania), Maxcyte, Inc. (Rockville,

Maryland), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) y Copernicus Therapeutics Inc, (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. No. 6.008.336). La lipofección se describe, *p. ej.*, en las Patentes de EE. UU. Nos. 5.049.386; 4.946.787; y 4.897.355) y los reactivos de lipofección se venden comercialmente (*p. ej.*, Transfectam™ y Lipofectin™). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para la lipofección de polinucleótidos eficiente de reconocimiento de receptor incluyen los de Felgner, Publicaciones de Patente Internacional Nos. WO 91/17424, WO 91/16024.

La preparación de los complejos lípido:ácido nucleico, incluyendo liposomas dirigidos tales como complejos de inmunolípidos, es muy conocida para un experto en la técnica (véase, *p. ej.*, Crystal (1995) *Science* 270:404-410; Blaese et al. (1995) *Cancer Gene Ther.* 2:291-297; Behr et al. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:382-389; Remy et al. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:647-654; Gao et al. (1995) *Gene Therapy* 2:710-722; Ahmad et al. (1992) *Cancer Res.* 52:4817-4820; Patentes de EE. UU. Nos. 4.186.183; 4.217.344; 4.235.871; 4.261.975; 4.485.054; 4.501.728; 4.774.085; 4.837.028; y 4.946.787).

Los métodos adicionales para la administración incluyen el uso de empaquetamiento de ácidos nucleicos para administrarse en vehículos de administración EnGeneIC (EDV). Estos EDV se administran específicamente a tejidos diana usando anticuerpos biespecíficos donde un brazo del anticuerpo tiene especificidad para el tejido diana y el otro tiene especificidad para el EDV. El anticuerpo lleva a los EDV a la superficie de la célula diana y entonces el EDV se lleva al interior de la célula por endocitosis. Una vez en la célula, los contenidos se liberan (véase, MacDiarmid et al. (2009) *Nature Biotechnology* 27(7):643).

El uso de sistemas basados en virus con ARN o ADN para la administración de ácidos nucleicos que codifican ZFP preparadas por ingeniería se aprovecha de los procesos altamente evolucionados para el direccionamiento de un virus a células específicas en el cuerpo y del transporte de la carga viral al núcleo. Pueden usarse vectores virales para tratar células *in vitro* y las células modificadas se administran a sujetos (*ex vivo*). Los sistemas convencionales basados en virus para la administración de ZFP incluyen, pero no están limitados a, vectores retrovirales, de lentivirus, adenovirales, de virus adeno-asociados, de vaccinia y de herpes simplex para la transferencia génica. La integración en el genoma del huésped es posible con los métodos de transferencia génica de los retrovirus, lentivirus, y virus adeno-asociados, dando lugar frecuentemente a la expresión a largo plazo del transgén

insertado. Adicionalmente, se han medido altas eficiencias de transducción en muchos tipos diferentes de células y tejidos diana.

Los vectores de virus adeno-asociados recombinantes (rAAV) son un sistema de administración génica alternativo prometedor basado en el virus parvovirus adeno-asociado de tipo 2 defectuoso y no patógeno. Todos los vectores derivan de un plásmido que retiene solo las repeticiones terminales invertidas de AAV de 145 pb flanqueando el casete de expresión del transgén. La transferencia génica eficiente y la administración estable del transgén debida a la integración en los genomas de la célula transducida son características clave para este sistema de vector. (Wagner et al. (1998) *Lancet* 351(9117):1702-3; Kearns et al. (1996) *Gene Ther.* 9:748-55). También pueden usarse otros serotipos de AAV, incluyendo, como ejemplo no limitativo, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV 8.2, AAV9 y AAV rh10 y AAV pseudotipados tales como AAV2/8, AAV2/5 y AAV2/6 según la presente invención. En algunas realizaciones, se usan los serotipos de AAV que son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica.

Los vectores adenovirales (Ad) recombinantes con replicación defectuosa pueden producirse a una alta titulación e infectar fácilmente varios tipos celulares diferentes. La mayor parte de los vectores de adenovirus se preparan por ingeniería de manera que un transgén reemplaza los genes E1a, E1b, y/o E3 del Ad; posteriormente, el vector con replicación defectuosa se propaga en células 293 humanas que suministran la función génica delecionada en trans. Los vectores Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos in vivo, incluyendo células que no se dividen, diferenciadas tales como las encontradas en el hígado, riñón y músculo. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad de transporte. Un ejemplo del uso de un vector Ad en un ensayo clínico implicó terapia de polinucleótidos para la inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Stermán et al. (1998) *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9). Los ejemplos adicionales del uso de vectores de adenovirus para la transferencia génica en ensayos clínicos incluyen Rosenecker et al. (1996) *Infection* 24(1):5-10; Stermán et al. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9(7):1083-1089; Welsh et al. (1995) *Hum. Gene Ther.* 2:205-18; Alvarez et al. (1997) *Hum. Gene Ther.* 5:597-613; Topf et al. (1998) *Gene Ther.* 5:507-513; Stermán et al. (1998) *Hum. Gene Ther.* 7:1083-1089.

Las células con capacidad de empaquetamiento se usan para formar partículas de virus que son capaces de infectar una célula huésped. Dichas células incluyen células 293, que

empaquetan adenovirus, y células $\psi 2$ o células PA317, que empaquetan retrovirus. Los vectores virales usados en terapia génica se generan habitualmente por una línea celular productora que empaqueta un vector de ácido nucleico en una partícula viral. Los vectores contienen típicamente las secuencias virales mínimas requeridas para el empaquetamiento e integración posterior en un huésped (si es aplicable), reemplazándose otras secuencias virales por un casete de expresión que codifica la proteína que se va a expresar. Las funciones virales ausentes son suministradas en trans por la línea celular de empaquetamiento. Por ejemplo, los vectores AAV usados en terapia génica solo poseen típicamente secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del genoma de AAV que se requieren para el empaquetamiento e integración en el genoma del huésped. El ADN viral se empaqueta en una línea celular, que contiene un plásmido auxiliar que codifica los otros genes de AAV, concretamente rep y cap, pero que carece de secuencias ITR. La línea celular también se infecta con adenovirus como un auxiliar. El virus auxiliar estimula la replicación del vector AAV y la expresión de los genes de AAV a partir del plásmido auxiliar. El plásmido auxiliar no se empaqueta en cantidades significativas debido a la ausencia de secuencias ITR. La contaminación con adenovirus puede reducirse, p. ej., por tratamiento con calor al que el adenovirus es más sensible que el AAV.

Las composiciones que comprenden células modificadas genéticamente como se describe en la presente memoria pueden administrarse a un sujeto de cualquier manera adecuada, incluyendo por infusión. Antes de la administración de la composición que comprende las células modificadas genéticamente, el sujeto puede tratarse con (administrarle) uno o más agentes de acondicionamiento mieloablativos una o más veces, por ejemplo, busulfán administrado: intravenosamente (IV) a entre aproximadamente 0,5 a 5 mg/kg una o más veces; IV a aproximadamente 3,2 mg/kg/día; IV mediante un catéter venoso central durante 4 días para una dosis total de aproximadamente 12,8 mg/kg antes de la infusión en los Días -6 a -3 antes de la infusión de la composición que comprende las células modificadas genéticamente en el Día 0; o IV una vez al día o cada 6 horas.

Puede usarse cualquier dosis de células modificadas genéticamente, por ejemplo, entre aproximadamente 3×10^6 células/kg y aproximadamente 20×10^6 células/kg (p. ej., donde las células se formulan con aproximadamente $1,0\text{--}2,0 \times 10^8$ células por bolsa a una concentración de aproximadamente 1×10^7 células/mL).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se está administrando, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas disponible, como se describe más adelante (véase, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., 1989).

Las formulaciones para las administraciones tanto ex vivo como in vivo incluyen suspensiones en líquido o líquidos emulsionados. Los ingredientes activos se mezclan frecuentemente con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, agentes estabilizantes u otros reactivos que aumentan la efectividad de la composición farmacéutica.

APLICACIONES

Los métodos de esta invención contemplan el tratamiento y/o prevención de la β -talasemia. El tratamiento puede comprender la inactivación de la secuencia potenciadora de BCL11A en una célula para bloquear la expresión de la proteína BCL11A. Se sabe que la proteína BCL11a reprime la expresión de la globina fetal, de manera que la inactivación de BCL11A dará lugar a una ausencia de represión del gen de HbF. Los métodos y composiciones de la invención también pueden usarse en cualquier circunstancia en donde se desea inactivar el potenciador eritroide de BCL11A en una célula madre hematopoyética de manera que las células maduras (p. ej., RBC) derivadas de estas células contienen la inactivación terapéutica. Estas células madre pueden diferenciarse in vitro o in vivo y pueden derivar de un tipo de célula donante universal que puede usarse para todos los sujetos. Adicionalmente, las células pueden contener una proteína transmembrana para transportar las células en el cuerpo. El tratamiento también puede comprender el uso de las células del sujeto que contienen el transgén terapéutico donde las células se desarrollan ex vivo y después se reintroducen en el sujeto. Por ejemplo, pueden insertarse HSC/PC que contienen una inactivación del potenciador eritroide de BCL11A en un sujeto mediante un trasplante autólogo de médula ósea.

Por tanto, esta tecnología puede usarse en una afección donde un sujeto tiene una mutación en su gen de globina B o una deficiencia en su expresión. Los defectos genéticos en las secuencias que codifican las cadenas de hemoglobina pueden ser responsables de un grupo de enfermedades conocido como hemoglobinopatías que incluyen anemia de células falciformes y las beta talasemias. En la talasemia menor, solo uno de los alelos de la globina β porta una mutación. Los individuos padecerán de anemia microcítica, y la detección implica habitualmente un volumen corpuscular medio más bajo de lo normal ($<80\text{fL}$). Los alelos de los sujetos con talasemia menor son β^+/β o β^0/β (donde ' β^+ ' se refiere a alelos que permiten que se produzca alguna cantidad de formación de la cadena β , ' β ' se refiere alelos de globina β de tipo salvaje, y ' β^0 ' se refiere a mutaciones en la globina β asociadas con una ausencia completa de expresión de globina beta). Los sujetos con talasemia intermedia pueden llevar frecuentemente una vida normal, pero pueden necesitar transfusiones ocasionales, especialmente en momentos de enfermedad o embarazo, dependiendo de la gravedad de su anemia. Los alelos de estos pacientes pueden ser β^+/β^+ o β^0/β^+ . La talasemia mayor ocurre cuando ambos alelos tienen mutaciones de talasemia (β^0/β^0). Esto es anemia gravemente microcítica e hipocrómica. Si no se trata, causa anemia, esplenomegalia y varias deformidades óseas y progresa a muerte antes de los 20 años. El tratamiento consiste en transfusión de sangre periódica; esplenectomía para esplenomegalia y quelación de la sobrecarga de hierro causada por las transfusiones. También se están usando los trasplantes de médula ósea para el tratamiento de personas con talasemias graves si puede identificarse un donante apropiado, pero este procedimiento puede tener riesgos significativos. En la mayoría de los pacientes con hemoglobinopatías, los genes que codifican la globina gamma siguen presentes, pero la expresión es relativamente baja debido a que se produce la represión de genes normales cerca del parto.

En algunas aplicaciones, en la presente memoria se proporciona un método para mejorar o mantener (ralentizar la disminución) de biomarcadores de enfermedad relacionados con la talasemia en un sujeto humano que tiene β -talasemia (p. ej., β -talasemia mayor (TDT) o β -talasemia menor) en comparación con un sujeto que no ha sido tratado con los métodos y composiciones de la invención. En otras aplicaciones, en la presente memoria se proporciona un método para disminuir la necesidad (nivel o frecuencia de la dosis) de infusión de PRBC u otros productos sanguíneos en un sujeto con β talasemia en comparación con el sujeto antes del tratamiento con los métodos y composiciones de la invención. En otro aspecto más, en la presente memoria se proporciona un método para

reducir la sobrecarga de hierro en un paciente con β -talasemia que se produce a partir de las infusiones crónicas de productos sanguíneos.

Por tanto, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar una beta-talasemia (p. ej., TDT) en un sujeto que lo necesita mediante la administración (p. ej., por infusión) al sujeto de una célula modificada genéticamente, en la que se inactiva BCL11A en la célula de manera que se incrementa la producción de HbF en el sujeto y se disminuyen uno o más síntomas clínicos de la β -talasemia. Los sujetos con TDT que se tratan pueden presentar uno o más de los siguientes: (1) un cambio desde la línea base de fracciones de hemoglobina de laboratorio clínico (hemoglobina de adulto, HbA y hemoglobina fetal, HbF) en gramos/dL de plasma y/o porcentaje de HbF de Hb total; (2) alteración (p. ej., en o cerca de los niveles normales) de biomarcadores de enfermedad relacionados con la talasemia tales como biomarcadores del metabolismo del hierro; y/o niveles de eritropoyetina, haptoglobina y/o hepcidina; (3) reducción o eliminación de síntomas en el sujeto asociados con la sobrecarga de hierro asociada con la terapia de transfusión en la línea base, opcionalmente en donde se ensaya una disminución en la disfunción endocrina midiendo el nivel y/o actividad de las hormonas tiroideas, IGF-1, cortisol matinal, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), HbA1C, vitamina D, HbA, HbF, eritropoyetina, haptoglobina, hepcidina, hormonas tiroideas, IGF-1, cortisol, ACTH y/o vitamina D en el sujeto; (4) reducción o eliminación de la necesidad de infusiones de productos sanguíneos, incluyendo transfusiones de PRBC, infusiones de plaquetas, IVIG, transfusión de plasma y/o transfusión de granulocitos; (5) reducción o eliminación de enfermedad hepática; (6) reducción o eliminación de anomalías cardíacas; (7) reducción y/o eliminación de osteoporosis y/o fracturas óseas y/o un cambio desde la línea base en la densidad mineral ósea; (8) reducción o eliminación de morfologías atípicas (p. ej., hiperplasia) y/o el número de células eritroides inmaduras; y/o (9) un cambio desde la línea base (niveles de pretratamiento) en el número y porcentaje de células F.

La Escala de Rendimiento de Karnofsky es una herramienta simple, ampliamente aceptada para evaluar el deterioro funcional en los pacientes. Cada sujeto se evaluará y puntuará en la visita especificada usando los Criterios de Clasificación de Definiciones de la Escala del Estado de Rendimiento de Karnofsky. Los sujetos con una puntuación en la Escala de Rendimiento de Karnofsky ≤ 60 en la visita de cribado no son elegibles para participar en este estudio. Se evaluará el cambio desde la línea base.

Las células modificadas genéticamente pueden ser células madre (p. ej., HSC/PC CD34+, ST-400) y pueden ser autólogas o alogénicas (p. ej., aisladas de donantes sanos) y las células alogénicas pueden modificarse adicionalmente (p. ej., además de la inactivación de BCL11A), por ejemplo, para eliminar uno o más auto-antígenos (p. ej., complejos HLA) para formar las células alogénicas. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. Nos. 8.945.868; 10.072.062; Publicación de Patente de EE. UU. No. 2018/0362926. Las células autólogas pueden movilizarse en el sujeto antes de la modificación *ex vivo* tratando al sujeto con una o más dosis de G-CSF y/o una o más dosis de plerixafor y las células movilizadas se recogen por uno o más ciclos de aféresis. Opcionalmente, al menos aproximadamente 25×10^6 HSPC CD34+/kg se movilizan en el sujeto. Las células pueden modificarse genéticamente para inactivar BCL11A usando una o más nucleasas, por ejemplo, en donde las nucleasas se introducen en la célula como ARNm como se describe en la presente memoria (SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16). Después de la modificación genética *ex vivo*, las células pueden evaluarse para determinar las inserciones y/o deleciones en BCL11A.

El sujeto que se va a tratar también puede pretratarse con uno o más agentes mieloablativos antes de la administración de las células modificadas genéticamente (p. ej., 10 a 1 día antes del tratamiento), por ejemplo, mediante la administración intravenosa (IV) de busulfán a entre aproximadamente 0,5 a 5 mg/kg (o cualquier valor intermedio) una o más veces; la administración IV de busulfán es aproximadamente 3,2 mg/kg/día; IV mediante un catéter venoso central durante 4 días para una dosis total de aproximadamente 12,8 mg/kg antes de la infusión en los Días -6 a -3 antes de la infusión de las HSPC modificadas en el Día 0; o la administración IV de busulfán es una vez al día (p. ej., 4 dosis) o cada 6 horas (total de 16 dosis). Puede usarse cualquier dosis de células modificadas genéticamente, incluyendo, pero no limitado a, entre aproximadamente 3×10^6 células/kg y aproximadamente 20×10^6 células/kg opcionalmente en donde las células se formulan en criomedios que se pueden infundir que contienen DMSO al 10 %. Las células pueden formularse en cualquier contenedor o envase adecuado, por ejemplo, en una bolsa de infusión (p. ej., que comprende aproximadamente $1,0\text{-}2,0 \times 10^8$ células por bolsa a una concentración de aproximadamente 1×10^7 células/mL).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “aproximadamente” o “alrededor de”, como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En determinadas realizaciones, el término se refiere a un rango de

valores que se encuentra en un 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o menos en cualquier dirección (mayor de o menor de) del valor de referencia indicado a no ser que se afirme otra cosa o que sea evidente otra cosa a partir del contexto.

Los siguientes Ejemplos se refieren a realizaciones ejemplares de la presente descripción en las que la nucleasa comprende una nucleasa con dedos de cinc (ZFN) o TALEN. Se apreciará que esto es solo para propósitos de ejemplificación y que pueden usarse otras nucleasas o sistemas de nucleasas, por ejemplo, endonucleasas de direccionamiento (meganucleasas) con dominios de unión a ADN preparados por ingeniería y/o fusiones de dominios de unión a ADN de endonucleasas de direccionamiento (meganucleasas) naturales preparados por ingeniería y dominios de escisión heterólogos y/o un sistema CRISPR/Cas que comprende un único ARNm guía preparado por ingeniería.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: DISEÑO DE ZFN

La pareja de ZFN está compuesta por una ZFN de 6 dedos (codificada por ARNm SB-mRENH1) y una ZFN de 5 dedos (codificada por ARNm SB-mRENH2) que se une a un sitio diana de 33 pares de bases (combinado) en el potenciador específico eritroide del gen de BCL11A humano en la localización cr2:60,495,250-60,495,290 en el ensamblaje GRCh38/hg38 del genoma humano. La preparación de la ZFN y los polinucleótidos que las codifican es como sigue: Los ARNm SB-mRENH1 y SB-mRENH2 se producen *in vitro* por métodos conocidos en la técnica. Los ARNm comprenden secuencias que codifican los compañeros de ZFN, y también comprenden características tales como secuencias y péptidos de localización nuclear. La Tabla 1 muestra las hélices asociadas con cada compañero de ZFN (véase, la Patente de EE. UU. No. 10.563.184; Publicación de Patente de EE. UU. No. 2018/0087072):

Tabla 1: diseño de ZFN

SBS # (sitio diana, 5'-3')	Diseño [Secuencia de la Hélice, SEQ ID]						Conector
	[Mutaciones en el núcleo del dedo]						Mutantes de Fok
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
63014 aaAGCAACtG TTAGCTTGC ACtagacta (SEQ ID NO:3)	DQSNL RA(SE Q ID NO:5)	RNFSLT M(SEQ ID NO:6)	STGNLT N (SEQ ID NO:7)	TSGSLT R(SEQ ID NO:8)	DQSNLR A(SEQ ID NO:5)	AQCCLF H(SEQ ID NO:9)	L7c5
	Qm5	ninguna	Qm5	ninguna	Qm5	ninguna	ELD
65722 caCAGGCTC CAGGAAGGg tttggcctct (SEQ ID NO:4)	RNDHR TT (SEQ ID NO:10)	QKAHLI R(SEQ ID NO:11)	QKGTLG E (SEQ ID NO:12)	RGRDLS R (SEQ ID NO:13)	RRDNLH S (SEQ ID NO:14)	N/A	L0
	Qm5	Qm5	ninguna	Qm5	ninguna	N/A	KKR K525S

La secuencia de nucleótidos completa para el ARNm SB-mRENH1 (1725 nucleótidos) se muestra a continuación:

acacgggaucucagaagcccuuccagugucgaucugcaugcagaacucagucgcggccgcgaccugucccgccac
 auccgcacccacaccggcgagaagccuuuugccugugacauuuguggaggaaauuugcccgcgcgacaaccugca
 cucccauaccaagauacaccugcggggaucccagcuggugaagagcgagcuggaggagaagaaguccgagcugcgg
 cacaagcugaaguacgugccccacgaguacaucgagcugaucgagaucgccagggaacagcaccaggaccgcauccu
 ggagaugaaggugaugggaguucuucaugaagguguacggcuacaggggaaagcaccuggggcggaagcagaaagcc
 ugacggcgccaucuaucagugggcagccccaucgauuacggcgugaucguggacacaaaggccuacagcggcggc
 uacaucugccuauccggccaggccgacgagaugcagagauacgugaaggagaaccagacccggaauaagcacauc
 accccaacgagugguggaagguguacccuagcagcgugaccgaguucaaguuccugugagcggccacuucag
 cggcaacuacaaggcccgacgugaccaggcugaaccgcaaaaccaacugcaauuggcgccgugcugagcggaggag
 cugcugaucggcgggcgagaugaucaaaagccggcaccugacacuggaggaggugcgcgcaaguucaacaacggcg
 agaucaacuucugauaacucgagucuagaagcucgcuuucugcuguccaauuucuaauuaagguuccuuuguucc
 cuaaguccaacuacuaaacugggggauauuaugaaggggccuugagcaucuggauucugccuaauaaaaaacauuu
 auuuuauugcugcgcuagaagcucgcuuucugcuguccaauuucuaauuaagguuccuuuguuccuaagucca
 acuacuaaacugggggauauuaugaaggggccuugagcaucuggauucugccuaauaaaaaacauuuuuuuuauu
 gcugcgggacauucuaauuaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
 aaaaaacuag (SEQ ID NO:16).

EJEMPLO 2: DESARROLLO DEL MÉTODO DE MODIFICACIÓN CELULAR

Estudios *in vitro*: se recogieron HSPC CD34+ humanas movilizadas por aféresis de sujetos sanos y se purificaron. Las HSPC purificadas se transfectaron con ARNm de ZFN SB-mRENH1 y SBmRENH2. Las HSPC CD34+ no transfectadas de los mismos sujetos sirvieron como controles. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las HSPC CD34+ transfectadas (“ST-400”) se recogieron y se congelaron para su uso en estudios *in vitro*.

Para analizar los efectos de la edición génica mediada por ZFN del potenciador específico eritroide humano del gen de BCL11A, las células modificadas de lo anterior se pusieron en un modelo de eritropoyesis *in vitro* conocido como “diferenciación de cRBC combinadas” (Giarratana et al. (2011) Blood 118(19):5071), que conlleva el cultivo durante 21 días en un cultivo líquido de 3 etapas con citoquinas pro-eritroides. La modificación del gen del potenciador de BCL11A se midió en ST-400 por secuenciación profunda MiSeq en muestras de ADN recogidas 2 días después de la transfección, al comienzo de la diferenciación *in vitro* y en el Día 14 de la diferenciación *in vitro*, antes de la enucleación de una fracción grande de las células eritroides. La modificación del locus del potenciador de BCL11A en las células

transfectadas incluyó aproximadamente 75 % indels, en el rango esperado durante la producción de material clínico. Los niveles de modificación génica fueron $\leq 0,2$ % en las HSPC control no transfectadas.

El crecimiento celular (expansión) se monitorizó durante el curso de la diferenciación eritroide. La enucleación, una medida de la maduración eritroide, se determinó en el Día 21. La expansión de las HSPC transfectadas varió de aproximadamente 2.500 a 9.000 veces y fue aproximadamente 2 veces menor que en las HSPC no transfectadas, lo que refleja el impacto del procedimiento de transfección en el crecimiento celular temprano. El porcentaje de células enucleadas no se diferenció entre las células transfectadas y no transfectadas (que varió de aproximadamente 59-62 % en ambos casos).

La UPLC en fase inversa de muestras de proteínas aisladas en el Día 21 (el punto final de la diferenciación eritroide) se usó para medir los niveles de globina α , β , y γ en la progenie eritroide de las HSPC transfectadas.

Como se muestra en la FIG. 2, la relación de globina γ a globina β y de globina γ a globina α se incrementó aproximadamente 3 a 4 veces en la progenie eritroide de ST-400 en comparación con las HSPC no transfectadas. Este descubrimiento demuestra un resultado de que la modificación génica dirigida da lugar a una elevación de la proteína globina γ , que debería incrementar los niveles de HbF en las células eritroides de pacientes con TDT. Los incrementos observados en los niveles de globina γ son similares a los publicados para otros métodos dirigidos a BCL11A (Wilber et al. (2011) Blood 117(10):2817-26) y a los detectados en pacientes con haploinsuficiencia de BCL11A (Basak et al. (2015) J Clin Invest 125(6):2363-8; Funnell et al. (2015) Blood 126(1):89-93).

Para la valoración del potencial funcional de las HSPC modificadas (evaluado como proliferación y diferenciación en linajes hematopoyéticos), se usó el número y morfología de las colonias formadas por un número fijado de células de entrada en el ensayo CFU. Las HSPC CD34+ no transfectadas derivadas de los mismos sujetos se usaron como controles negativos. El ensayo CFU se realizó usando procedimientos estándar. Brevemente, se sembraron en placas cultivos en triplicado de 100 o 300 células cada uno en placas de 6 pocillos, y se incubaron durante 14 días, punto de tiempo en el cual los cultivos se puntuaron para el recuento de colonias y el tipo de colonia. Las viabilidades posteriores a la descongelación fueron equivalentes (aproximadamente 72 % al 83 % en HSPC

transfectadas; aproximadamente 96 % en HSPC no transfectadas). El porcentaje de eficiencia en la siembra en placas de las HSPC transfectadas varió del 15,7 % al 45,7 %, en comparación con el 37,3 % al 75,0 % con HSPC no transfectadas. La eficiencia en la siembra en placas de ST-400 se encuentra en los rangos reportados en otros estudios con células con modificación génica (Dever et al. (2016) Nature 539(7629):384-389; Wu et al. (2001) Gene Ther 8(5):384-90) y la menor eficiencia en comparación con las HSPC no transfectadas se debe probablemente al impacto de la electroporación y de la modificación génica.

Como se muestra en la Tabla 2, las HSPC modificadas se diferenciaron en todos los linajes hematopoyéticos, incluyendo progenitores eritroides (CFU-E y BFU-E), progenitores de granulocitos/macrófagos (CFU-G/M/GM), y progenitores multipotenciales (CFU-GEMM). Los porcentajes de CFU-E derivados de las HSPC modificadas fueron similares a los de las HSPC no transfectadas, y los porcentajes de CFU-G/M/GM y CFU-GEMM solo fueron mínimamente diferentes. Por tanto, la transfección y la modificación genética con ARNm de ZFN SB-mRENH1 y SB-mRENH2 tiene un efecto mínimo o ninguno en el potencial de diferenciación de las HSPC modificadas.

Tabla 2: Diferenciación Hematopoyética de HSPC CD34+

No. de Lote	Condición de electroporación	Células/pocillo	CFU Promedio			CFU Total Promedio
			E	G/M/GM	GEMM	
PB-MR-003	mRENH1/mRENH2	100	16,3	17,7	0,0	34,0
	no transfectadas	100	25,3	45,3	4,3	75,0
PB-MR-004	mRENH1/mRENH2	100	10,0	35,7	0,0	45,7
	no transfectadas	100	10,7	45,0	1,0	56,7
PB-MR-006	mRENH1/mRENH2	300	17,7	29,3	0,6	47,7
	no transfectadas	100	20,7	32,0	1,0	53,7

PB-CH-002	mRENH1/mRENH2	300	12,7	38,3	0,0	51,0
	no transfectadas	100	9,0	27,0	1,3	37,3
PB-CH-003	mRENH1/mRENH2	300	17,3	28,7	1,0	47,0
	no transfectadas	100	19,7	40,3	0,6	60,7

Formación de Colonias en Agar Blando por Fibroblastos Transfectados con ST-400: Para la valoración del potencial de transformación/tumorigénico, se valoró el crecimiento independiente de anclaje de fibroblastos WI-38 humanos transfectados con ARNm de ZFN SB-mRENH1 y SB-mRENH2 en un ensayo de transformación en agar blando. Los niveles de modificación génica se midieron a ~73 % indels en las células WI-38 modificadas genéticamente en comparación con ~0,3 % en las células WI-38 no transfectadas. No se observó crecimiento independiente de anclaje de las células WI-38 transfectadas y no transfectadas en ningún punto de tiempo. Los resultados muestran que la transfección con los ARNm de ZFN SB-mRENH1 y SB-mRENH2, y la disrupción mediada por ZFN resultante en el potenciador específico eritroide del gen *BCL11A* en las células WI-38, no estimuló la tumorigenicidad.

Cariotipado de las HSPC CD34+ modificadas: Se llevó a cabo un análisis del cariotipo con las HSPC modificadas. Las ZFN se diseñaron para inducir DSB en el genoma en un locus diana especificado. Dado su mecanismo de acción, es posible que la actividad fuera de la diana de las ZFN pudiera dar lugar a cambios genéticos no planeados. El examen visual de cromosomas esparcidos de células individuales (cariotipado) puede proporcionar una visión global de la integridad genética, y detectar anomalías genéticas, incluyendo cambios cromosómicos estructurales o numéricos a gran escala que podrían no detectarse con otros ensayos más dirigidos.

Para evaluar las morfologías cromosómicas macroscópicas, las HSPC modificadas derivadas de 3 sujetos sanos se sometieron a análisis de cariotipo. Las HSPC CD34+ no transfectadas del mismo sujeto sirvieron como control. La secuenciación profunda MiSeq mostró que la modificación génica en el potenciador específico eritroide del gen de *BCL11A*

era de 77 % a 79 % indels en las HSPC transfectadas, en comparación con <0,1 % indels en las HSPC no transfectadas. El análisis de cariotipo mostró que todas las células tenían origen humano, y que ninguna tenía anomalías cromosómicas macroscópicas. Los análisis citogenéticos de las HSPC modificadas no mostraron anomalías cromosómicas estructurales o numéricas macroscópicas relacionadas con el tratamiento.

Roturas de cadena doble en las HSPC modificadas: las HSPC modificadas se ensayaron en el ensayo de proteína 1 de unión a p53 (53BP1) para evaluar la duración y especificidad de la actividad de las ZFN durante 7 días por inmunohistoquímica. Los niveles de modificación génica se valoraron en los Días 1 y 2 después de la transfección. 53BP1 se reclutó en los sitios de DSB en 24 horas después de que aparecieran y está implicada en la reparación de DSB mediante NHEJ, la ruta principal para reparar las DSB inducidas por ZFN. Los sitios de la reparación se visualizan como focos intensamente teñidos y distintos en el núcleo de las células fijadas usando microscopía de inmunofluorescencia con anticuerpos frente a 53BP1. La valoración de las DSB usando este método proporciona una medida temporal no sesgada de la acción neta de las ZFN (tanto en como fuera de la diana). Se valoraron las DSB en las HSPC modificadas, y los resultados indican que los niveles de modificación génica permanecieron altos al disminuir los niveles de inmunotinción de 53BP1, lo que demostraba que la caída de la señal de 53BP1 no se debió a la pérdida de células transfectadas con el tiempo (FIG. 3A a FIG. 3C). Los mayores niveles de focos de 53BP1/célula se encontraron 1-2 días después de la transfección. Además, aproximadamente el 50 % de las células mostró 1 foco de 53BP1/célula (1 DSB/célula) 1 día después de la transfección y aproximadamente el 8 % de las células 7 días después de la transfección (similar a los niveles de fondo observados con las células no transfectadas). La modificación génica en la diana potenciador de BCL11A fue del 73,5 % y 78,5 % en los Días 1 y 2 después de la transfección.

Ensayo de translocación en HSPC modificadas. Se llevó a cabo un ensayo de translocación molecular con las HSPC modificadas para evaluar los eventos de translocación potenciales. Se cuantificó la frecuencia de los eventos de translocación que ocurren entre el locus en la diana (potenciador de BCL11A) y todos los sitios conocidos de escisión fuera de la diana (19 identificados previamente). Se identificaron doce de estos mediante una secuenciación profunda estándar, basada en MiSeq, de sitios fuera de la diana candidatos, y rindieron niveles de indel en el rango del ~0,01 % al ~0,1 %. Los siete sitios remanentes se identificaron mediante una valoración más intensiva de un panel de locus más pequeño

mediante sobremuestreo con la plataforma de secuenciación ultra-profunda NextSeq, y rindieron tasas de indel en el rango menor del $\sim 0,001$ % al $\sim 0,01$ %. Este es un enfoque altamente sensible y permite la detección de eventos de translocación a frecuencias que se aproximan a uno en 105 genomas investigados; se usó para investigar la presencia y nivel de translocaciones recíprocas entre la diana de escisión pretendida en el potenciador eritroide de BCL11A y cada sitio fuera de la diana identificado previamente.

Por tanto, la pareja de ZFN ST-400 es altamente específica para el potenciador específico eritroide del gen de BCL11A y solo tiene una cantidad mínima de actividad fuera de la diana detectable. En particular, la secuenciación profunda del ADN MiSeq mostró niveles muy bajos de escisión fuera de la diana del 0,15 % o menos y el análisis por NextSeq reveló niveles extremadamente bajos de escisión fuera de la diana de menos del 0,01 %. En comparación, los niveles de indel en el potenciador específico eritroide del gen de BCL11A diana variaron de aproximadamente el 79 al 86 %. Este análisis de todo el genoma indica que los niveles de indel en el locus en la diana de BCL11A superaron los niveles de modificación en todos los sitios fuera de la diana identificados combinados por un factor superior a 300. Además, el análisis de bioinformática conjuntamente con una revisión de la bibliografía de loci fuera de la diana identificados no mostró ninguna evidencia de modificaciones en las regiones codificadoras de genes implicados en funciones hematopoyéticas críticas y los eventos fuera de la diana no dieron lugar a modificaciones que se sabe que están asociadas con malignidades hematopoyéticas en los seres humanos.

Efectos Transcripcionales Fuera de la Diana por la Pareja de ZFN ST-400 en la Progenie Eritroide: Para valorar la actividad transcripcional fuera de la diana de la pareja de ZFN optimizada ST-400, se analizó el perfil de expresión de 11 genes que flanquean el gen de BCL11A usando secuenciación profunda MiSeq. Se recogió el ARN de las HSPC CD34+ transfectadas en el Día 14, momento en el cual los niveles de modificación génica en el potenciador específico eritroide del gen de BCL11A se cuantificaron como >50 % en comparación con el control. Los niveles de ARNm de globina γ en las HSPC CD34+ transfectadas se incrementaron aproximadamente 2 veces (normalizados respecto al ARN 18s), lo que refleja una expresión disminuida de BCL11A que se produce por la eliminación en la diana del sitio de unión a GATA1 en el potenciador específico eritroide del gen de BCL11A. Por el contrario, los niveles de expresión de 11 genes que flanquean el gen de BCL11A fueron similares a los de los 11 genes en las células control. Los niveles de

expresión de otros 4 genes regulados por GATA1 (KLF1, SCL4A1, ZFPM1 y ALAS2) tampoco se vieron afectados. Estos resultados muestran que la actividad de los ARNm de ZFN SB-mRENH1 y SB-mRENH2 está restringida a la represión de la transcripción del gen de BCL11A y sus efectos aguas abajo consecuentes.

El método usado para detectar los eventos de translocación fue una adaptación de un ensayo estándar TaqMan para la cuantificación del ADN (Holland et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 8(16):7276-7280) en el que se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) conjuntamente con una sonda que libera un fluoróforo después de la hibridación con el ADN y la degradación posterior por la ADN polimerasa. En la sonda intacta, la señal del fluoróforo está suprimida por la interacción con apantalladores unidos covalentemente. La sonda se diseña para que hibride dentro de la región que está siendo amplificada por los cebadores de PCR. La señal fluorescente detectada es, por tanto, proporcional a la cantidad de amplicón presente en la muestra. Los cebadores de TaqMan se diseñaron para tener una longitud de 20 bases y rendir amplicones que abarcaran aproximadamente 200 pares de bases (pb). Los cebadores se sintetizaron y se purificaron usando desalación estándar. Las sondas fluorescentes se diseñaron para abarcar 20 pb y tener un contenido de GC del 60 %. Las sondas contenían un colorante informador HEX en 5', un apantallador Iowa Black FQ en 3', y un apantallador "ZEN" interno adicional para reducir más la señal de fondo. Las sondas se purificaron por HPLC.

Como las secuencias de translocación investigadas no se encuentran en el genoma humano nativo, fue necesario diseñar fragmentos de ADN sintéticos que englobaran las uniones de translocación predichas para cada uno de los 19 loci fuera de la diana, con el fin de generar curvas estándar y valorar la sensibilidad del ensayo. En la FIG. 4 se proporciona una representación esquemática de estos reactivos, junto con los reactivos correspondientes de cebadores y sondas. Nótese que se insertó una única secuencia de 21 pb en cada molde de control positivo entre los segmentos derivados de BCL11A y fuera de la diana para permitir el discernimiento basado en la secuenciación de los productos de translocación bona fide, en el evento de contaminación sospechada. Los fragmentos sintéticos de ADN bicatenario se adquirieron como gBlocks donde las longitudes de los fragmentos de ADN variaron de 287 a 434 pb. En la FIG. 4, el panel superior representa segmentos cromosómicos que engloban el potenciador de BCL11A en el sitio diana (verde) y un sitio fuera de la diana (naranja). El panel inferior esboza reactivos de control positivo (gBlocks) para la detección de los

productos de translocación correspondientes. También se muestran las localizaciones aproximadas de cebadores y sondas usadas en el ensayo TaqMan. El segmento granate en cada gBlock es una secuencia única insertada en cada reactivo de control para distinguirlo de un producto de translocación verdadero y permitir la monitorización de contaminación cruzada potencial. Los gBlocks del Producto 1 se ensayaron en la región de BCL11A del fragmento. Los gBlocks del Producto 2 se ensayaron en la región fuera de la diana del fragmento.

Para cada translocación investigada (Producto 1 o Producto 2, véase, la FIG. 4), se generó una curva estándar que contenía 10.000, 1.000, 100, 10, 3, 1, 0,1, o 0,01 copias de ADN de gBlock sintético en el contexto de 100.000 genomas haploides de ADN genómico CD34+ (ADNg) de las células no transfectadas. Se esperaba que los dos puntos más bajos en la curva estándar (0,1 y 0,01 copias) rindieran señales negativas y se generaron para proporcionar una verificación adicional de la cuantificación de ADN control y de la robustez del ensayo. El punto de tres copias se incluyó para proporcionar una mayor resolución y puntos de datos adicionales en el rango del límite de detección esperado para este ensayo. Se hicieron diluciones de diez veces en Tampón AE (Tris-Cl 10 mM y EDTA 0,5 mM pH 9,0) del Kit de Sangre y Tejido DNeasy de QIAGEN (QIAGEN) que contenía 5 ng/uL de ADNg de células K562 como vehículo antes de la transferencia a tubos que contenían 100.000 genomas de ADNg CD34+.

Las reacciones se prepararon usando la Supermezcla 2x ddPCR de Bio-Rad (Bio-Rad; Hercules, CA) que contenía tampón de PCR, dNTP, y ADN polimerasa según el protocolo del fabricante. Se generaron moldes de ADN para las curvas estándar (gBlocks). La muestra de NTC (control sin molde) carecía de gBlock añadido, pero incluyó 330 ng de ADNg de células CD34+ no transfectadas. Cada reacción contenía cebadores 0,5 μ M y sonda 0,25 μ M. El ADN genómico de cada uno de los tres lotes de ST-400 se purificó usando el Kit de Sangre y Tejido DNeasy de QIAGEN. Para cada muestra ensayada, se añadieron 100.000 genomas haploides (330 ng) de ADN del lote indicado a cada reacción para que concordara con las condiciones usadas para generar la curva estándar. Todas las muestras y estándares se operaron en triplicado. El ensayo TaqMan se operó en un Sistema de Detección de PCR en Tiempo Real CFX 96 de Bio-Rad según las instrucciones del fabricante. El programa de PCR usado fue como sigue: 95 °C durante 10 min seguido de 50 ciclos de 94 °C durante 30 seg y 59 °C durante un min.

Se realizó un ensayo TaqMan para examinar el ADN genómico de células CD34+ tratadas con ZFN para detectar evidencia de translocaciones entre el sitio diana en BCL11A y los 12 loci fuera de la diana que se habían identificado mediante análisis por MiSeq. Para conseguir esto, las células CD34+ de sangre periférica movilizadas se trataron con las ZFN ST-400 usando condiciones clínicas para la transfección y expresión del ARN. Después de dos días, el ADNg se aisló y se sometió a valoración de translocaciones recíprocas (Producto 1 y Producto 2). Los resultados, que se resumen en la Tabla 3, revelaron señales de translocación muy bajas para siete de los sitios fuera de la diana, con frecuencias en el rango de una translocación para cada 10^4 a 10^6 genomas haploides. Los sitios remanentes no mostraron ninguna evidencia de translocaciones.

Tabla 3: Translocaciones detectadas

Sitio fuera de la diana			Nivel promedio de translocación		Translocaciones por 100.000 genomas haploides, por lote de CMC						ID del Locus
					Producto 1			Producto 2			
Nombr e	Localización		Pro- ducto 1	Pro- ducto 2	PB- MR- 006	PB- CH- 001	PB- CH- 002	PB- MR- 006	PB- CH- 001	PB- CH- 002	
(OT#)											
OT1	cr8	119856440	2,22	0,99	2,17	0,67	3,83	1,	1,47	0,5	NIFMAEVG
OT10	cr2	23702834	3,59	7,01	6,73	2,07	1,97	3,57	8,43	9,03	RFGIYSHZ
OT3	cr6	89888012	0,14	0,31	0,	0,42	0,	0,43	0,	0,5	FYQYHJIS
OT6	cr10	132654832	0,4	1,49	0,	0,	1,2	1,67	0,	2,8	ALVTVCYL
OT2	cr1	21635648	0,12	0,	0,	0,	0,37	0,	0,	0,	PEBPWNNJ
OT4	crX	66004390	0,08	0,	0,	0,23	0,	0,	0,	0,	MKRBBTRS
OT12	cr19	51327822	0,	0,39	0,	0,	0,	1,17	0,	0,	YJJYYWPK

OT8	cr8	94988044	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	CSRBEMTR
OT7	cr7	13150365 6	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	LSKZRNJH
OT9	cr20	37707466	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	MDRSNDIS
OT11	cr16	2122340	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	FYTLXRTA
OT5	cr3	49724756	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	TNJMKZKS

EJEMPLO 3: ESTUDIO CLÍNICO DE HSPC MODIFICADAS

Se emprendió un estudio en seres humanos para ensayar la seguridad del uso de HSPC modificadas para tratar TDT. Además, se evaluó la valoración de la eficacia de las HSPC modificadas. El objetivo exploratorio también incluyó evaluar las características de las modificaciones génicas (% y durabilidad) en el potenciador específico eritroide del gen de BCL11A después del tratamiento con las células modificadas y la valoración del impacto de las células modificadas en las evaluaciones bioquímicas, de imagenología, funcionales, y de la médula ósea relacionadas con la β -talasemia y HSCT.

Los criterios de inclusión para el estudio incluyeron seis sujetos (β^0/β^0 o no β^0/β^0) entre las edades de 18 y 40 años de edad con un diagnóstico clínico de TDT con ≤ 8 eventos de transfusión de PRBC documentados por año en una base anualizada en los dos años anteriores al cribado para el estudio. También se requirió un diagnóstico de genética molecular confirmado de β -talasemia. Los sujetos incluyeron hombres y mujeres dispuestos a usar control de natalidad.

Los criterios de exclusión clave para los sujetos en el estudio incluyeron: historial previo de trasplante de células madre humanas autólogo o alogénico o trasplante de órgano sólido; variantes alélicas de la globina y asociadas con afinidad por el oxígeno clínicamente significativamente alterada (los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, Hb F-Poole, Hb F-M Osaka, Hb F-La Grange, Hb F-Cincinnati y delecciones grandes tales como $\gamma\beta$ -talasemia o $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talasemia); contraindicación médica para aféresis; esplenomegalia masiva y recuento

de neutrófilos absoluto (ANC) $\leq 1.000/\mu\text{L}$; disfunción renal como se define por una creatinina sérica $\geq 2,0 \text{ mg/dL}$; fibrosis en puente, cirrosis hepática, o hepatitis activa sobre la base de una biopsia de hígado obtenida en los 12 meses previos o en el cribado; tratamiento con medicaciones prohibidas en los 30 días previos; infección bacteriana, viral, fúngica, o parasitaria activa clínicamente significativa; diagnóstico de VIH o evidencia de infección activa por HBV o HCV sobre la base de ensayos de cribado de laboratorio; escala de rendimiento de Karnofsky ≤ 60 ; DLCO corregido $\leq 50 \%$ de restrictiva predicha o clínicamente significativa; enfermedad pulmonar sobre la base de ensayos de cribado de la función pulmonar (PFT); fallo cardíaco congestivo (NYHA Clase III o IV); angina inestable, arritmia incontrolada, o fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) $< 40 \%$, QTcF $> 500 \text{ mseg}$ sobre la base de ECG de cribado, MRI de T2* cardíaco $< 10 \text{ mseg}$ sobre la base de MRI de cribado; historial de trastorno hemorrágico significativo; diagnóstico actual de convulsiones incontroladas; historial de malignidad activa en los últimos 5 años (se permiten el cáncer de piel distinto de melanoma o el cáncer del cuello uterino in situ); cualquier historial de malignidad hematológica, o historial familiar de síndrome de predisposición al cáncer sin un resultado de ensayo negativo en el candidato al estudio; historial de abuso activo del alcohol o sustancias que puede interferir con el seguimiento del estudio; historial de ausencia de adherencia terapéutica; participación actual en otro ensayo clínico que usa una medicación de estudio en investigación, o participación en dicho ensayo en los 90 días o menos de 5 semividas del producto en investigación antes de la visita de cribado; tratamiento previo con terapia génica; alergia o hipersensibilidad a busulfán o excipientes del fármaco en estudio (albúmina de suero humano, DMSO, y Dextrano 40); o cualquier otra razón que haría que el sujeto fuera inadecuado para participar en el estudio.

DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en sujetos con β -talasemia dependiente de transfusión (TDT). Después de la inclusión, los sujetos elegibles son sometidos a aféresis para recoger HSPC CD34+ autólogas. Las HSPC CD34+ se trataron *ex vivo* por transfección con ARNm de ZFN SB-mRENH1 y SB-mRENH2 para fabricar el fármaco del estudio. Los sujetos reciben terapia de acondicionamiento con busulfán intravenoso (IV) antes de infundirles las HSPC modificadas. Las HSPC CD34+ se movilizaron en cada sujeto usando tratamiento con G-CSF y plerixafor. Las HSPC CD34+ movilizadas se recogieron de cada sujeto en los Días 5 y 6 (+/- Día 7 si

era necesario para asegurar el tratamiento de rescate) de la movilización por aféresis. Las HSPC CD34+ se movilizaron en cada sujeto después de la administración de G-CSF (en los Días 1-6 de la movilización) y plerixafor (en los Días 4, 5, y 6 de la movilización) (véase, la FIG. 5). Las HSPC CD34+ movilizadas se recogieron de cada sujeto por aféresis en dos días consecutivos (*p. ej.*, los Días 5 y 6) y se recogieron los injertos de reserva no manipulados en el tercer día (*p. ej.*, el Día 7 para asegurar el tratamiento de rescate) con una diana de 25×10^6 HSPC CD34+/kg en total, aunque son aceptables rendimientos menores. Si fue necesario, se realizó una segunda movilización y ciclo de aféresis ≥ 2 semanas más tarde.

Las células recogidas de cada sujeto se dividieron en 2 partes, una parte para la fabricación del fármaco de HSPC modificadas y la otra parte se reservó en el evento de que esté indicado un tratamiento de rescate.

La parte del tratamiento de rescate comprende un mínimo de $2,5 \times 10^6$ HSPC CD34+/kg. La parte del tratamiento de rescate se criopreservó sin modificar y se almacenó en el sitio del estudio para que estuviera disponible en el evento de reconstitución hematopoyética retrasada o fallo del injerto con aplasia. Si el primer ciclo de aféresis no movilizó el número mínimo de HSPC CD34+ requerido para la fabricación del fármaco de HSPC modificadas y para el tratamiento de rescate, puede repetirse el procedimiento de movilización. La selección del curso de tiempo de una segunda aféresis fue según el criterio del Investigador sobre la base del estado clínico del sujeto, pero no fue antes de 2 semanas (≥ 2 semanas) después de la aféresis inicial.

Después de la retirada y almacenamiento del tratamiento de rescate, el resto de las células movilizadas y recogidas del sujeto se enviaron por mensajería a la instalación de fabricación GMP. Se realizó una selección de células CD34+ seguido de la transfección con los ARNm de ZFN SB-mRENH1 y SB-mRENH2 para disrumpir el potenciador específico eritroide del gen de BCL11A para generar el fármaco de estudio de HSPC modificadas. Las HSPC modificadas se criopreservaron y se almacenaron hasta se completaron todos los segmentos del protocolo clínico hasta e incluyendo los procedimientos de la visita en la línea base y el sujeto estuvo listo para la infusión. Las HSPC modificadas se criopreservaron en 50 mL de bolsas de congelación CryoMACS® (volumen de llenado de aproximadamente 10 a 20 mL; recuento total de células de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ a $2,0 \times 10^8$ células) usando un congelador con velocidad controlada. Se usaron múltiples bolsas de congelación

si el rendimiento celular superaba la capacidad de una única bolsa. Las bolsas de infusión se almacenaron en nitrógeno líquido en fase de vapor ($a < -150$ °C) en la instalación de fabricación hasta que están listas para su transporte al centro del estudio clínico.

Después de liberar las HSPC modificadas para uso clínico, los sujetos fueron admitidos en el hospital para empezar el busulfán IV en una unidad de trasplante especializada. Los sujetos recibieron un régimen mieloablativo de busulfán (3,2 mg/kg/día; IV mediante un catéter venoso central) durante 4 días (dosis total de 12,8 mg/kg, que se considera un estándar de cuidado para el trasplante autólogo) en los Días -6 a -3 antes de la infusión de las HSPC modificadas en el Día 0. El busulfán IV puede dosificarse una vez al día (total de 4 dosis) o cada 6 horas (total de 16 dosis) según las prácticas o directrices del centro del estudio. Después de la primera dosis, la dosis del busulfán IV se ajustó sobre la base del muestreo farmacocinético y las prácticas del centro del estudio para conseguir un área bajo la curva (AUC) de 4.000-5.000 mmol·min para la dosificación diaria o una AUC de 1.000-1.250 mmol·min para la dosificación cada 6 horas para una AUC diana para el régimen total de 16.000-20.000 mmol·min. La farmacocinética diana de busulfán IV puede modificarse para los sujetos posteriores sobre la base de la experiencia con los sujetos previos después de una discusión con el Comité de Monitorización de Seguridad (SMC). No se requirió la monitorización del fármaco terapéutico para determinar el aclaramiento del busulfán después de 4 días de dosificación, pero puede realizarse según el criterio del Investigador según las prácticas del centro del estudio (véase, la FIG. 5).

Infusión de HSPC modificadas: Después del acondicionamiento mieloablativo con busulfán intravenoso (exposición diana del régimen total = 16.000 a 20.000 μ mol·min como se confirma y/o ajusta sobre la base del muestreo farmacocinético), los pacientes recibieron el producto descongelado de HSPC CD34+ ("ST-400") por infusión a través de un catéter venoso central (FIG. 5). Las HSPC modificadas congeladas se descongelaron e infundieron, de manera que el proceso completo de descongelación e infusión finaliza en aproximadamente 15 minutos. El volumen de las HSPC modificadas congeladas se determinó por el peso del sujeto. Se monitorizaron los signos vitales (presión sanguínea, temperatura, frecuencia cardíaca, tasa respiratoria y oximetría de pulso) antes de la infusión y posteriormente.

Una vez se hubo proporcionado el fármaco del estudio, los sujetos se monitorizaron para trabajo de laboratorio rutinario. Además, se hará una valoración de cualquier evento adverso, y las células sanguíneas se valoraron para determinar la modificación génica. También se evaluarán los niveles de HbF, se analizará la función endocrina, y se realizarán MRI para valorar la carga de hierro. Se evaluarán las cinéticas y éxito de la reconstitución hematopoyética, la duración de la hospitalización después del acondicionamiento, el cribado para el desarrollo potencial de malignidades hematológicas, la calidad de vida por la Forma Corta del Cuestionario del Estado de Salud (Cuestionario SF-36), la función global por la puntuación del rendimiento de Karnofsky, la eficiencia del procedimiento de aféresis, la diferencia entre el % de indels en el producto ST-400 y los indels detectados en la médula ósea y sangre después de la infusión de ST-400.

Un AE es cualquier aparición médica no deseada asociada con el uso de un fármaco en los seres humanos, ya se considere o no relacionado con el fármaco. Un AE puede incluir cualquiera de los siguientes eventos que se desarrollan o incrementan su gravedad durante este estudio: cualquier signo, síntoma, o descubrimiento en el examen físico que empeora en naturaleza, gravedad, o frecuencia en comparación con el estado en la línea base (es decir, antes del cribado), ya se piense que está o no relacionado con la afección en estudio, cualquier anomalía de laboratorio clínicamente significativa o anomalía de laboratorio que requiera medicación u hospitalización. Los resultados de laboratorio anormales se clasificarán sobre la base de los Criterios de la Terminología Común para Eventos Adversos (CTCAE) 5.0, una anomalía de laboratorio clínico de Grado 1 o 2 debería informarse como un AE solo si es considerada clínicamente significativa por el Investigador, una anomalía de laboratorio clínico de Grado 3 y 4 que representa un incremento de la gravedad desde línea base debería informarse como un AE si no está asociada con un diagnóstico ya informado en el CRF, todos los eventos asociados con el uso de tratamiento, incluyendo aquellos que aparecen como resultado de una sobredosis, abuso, fenómeno de abstinencia, sensibilidad, o toxicidad al tratamiento, enfermedad concurrente, lesión o accidente.

Un SAE es cualquier AE que se produce en cualquiera de los siguientes resultados: muerte, evento potencialmente mortal (es decir, un evento que sitúa al sujeto en riesgo inmediato de muerte); sin embargo, esto no incluye un evento que, si hubiera ocurrido en una forma más grave, podría haber causado la muerte, la hospitalización como interno o la prolongación de la hospitalización existente, incapacidad persistente o significativa o disrupción sustancial de

la capacidad para llevar a cabo las funciones de la vida normal, anomalía congénita/defectos en el nacimiento en la descendencia de un sujeto expuesto, o un evento médicamente importante.

Evaluación de eventos secundarios y exploratorios: Los niveles en la línea base de fracciones de HbF (A y F en g/dL) y el porcentaje de HbF se determinarán sobre la base de la última valoración en o antes de la fecha de la primera administración de busulfán IV. Los niveles de HbF y el cambio desde la línea base se resumirán por visita del estudio.

La frecuencia y el volumen de las transfusiones de PRBC en la línea base se basan en el periodo de 2 años anterior al cribado. La frecuencia y el volumen de la transfusión se anualiza por periodo de estudio y globalmente, y se compara descriptivamente con los valores de la línea base.

Monitorización de la heterogeneidad de las HSPC modificadas después de la infusión: Después de la infusión, las HSPC modificadas pueden monitorizarse en el paciente para determinar la eficiencia del injerto y la heterogeneidad de la modificación según se valora por el perfil de indels. Las muestras de células del sujeto pueden purificarse de la sangre periférica, aspirado de médula ósea u otras muestras de tejido (aproximadamente 5×10^4 a 1×10^7 células preferiblemente) y someterse a aislamiento de ADN genómico. La región alrededor del sitio de escisión se amplifica entonces por PCR en condiciones estándar. Se realiza entonces una segunda ronda de PCR para añadir adaptadores de manera que la reacción puede analizarse usando MiSeq (Illumina). Los datos de secuenciación de las células del sujeto se comparan con una curva estándar para determinar el porcentaje de indels.

El protocolo dictaba que los pacientes 2 y 3 no podrían empezar el acondicionamiento de quimioterapia hasta que el paciente previo demostrara un injerto de neutrófilos y plaquetas; después del injerto exitoso del paciente 3, los pacientes 4-6 podrían empezar el acondicionamiento de quimioterapia. Los pacientes se monitorizaron para determinar la seguridad y la eficacia. El estudio engloba un seguimiento durante 3 años, después del cual se ofrece a los pacientes su participación en un estudio de seguimiento de seguridad a largo plazo.

La seguridad y la tolerabilidad se valoraron por la incidencia de eventos adversos (AE) y AE graves (SAE). El éxito y las cinéticas de la reconstitución hematopoyética se valoraron por el injerto de neutrófilos (ANC ≥ 500 células/ μ L) y plaquetas (≥ 20.000 células/ μ L no soportado por transfusión). Los patrones indel en la diana se siguieron a nivel molecular con el tiempo para la vigilancia de clones hematopoyéticos emergentes. Los pacientes se monitorizaron para determinar la presencia de indels en la diana en células hematopoyéticas, niveles de hemoglobina fetal, y requerimientos de transfusión después de la infusión de ST-400; los umbrales de transfusión de hemoglobina después del trasplante fueron según la práctica estándar de los sitios clínicos (Pacientes 1 y 2: <8 g/dL; Paciente 3: <7 g/dL).

RESULTADOS

Hasta la fecha, el producto ST-400 autólogo ha sido fabricado para 5 de los 6 pacientes, 3 de los cuales han recibido ST-400 (Tabla A). Los datos de seguridad y eficacia; eventos adversos, producción de hemoglobina fetal, marcadores de indel y requerimientos de transfusión de PRBC para estos pacientes evolucionarán con el tiempo, potencialmente durante 12 meses o más.

Tabla A: Características Demográficas de los Pacientes y Características de la Enfermedad

Paciente	Edad en el Consentimiento (Años)	Genotipo	PRBC Anualizada Eventos Pre-Inclusión	Tiempo Después de la Infusión
1	36	β^0 β^0	27	39 Semanas
2	30	β^+ (IVS-I-5 grave: G>C) β^+ (IVS-I-5 grave: G>C)	18	26 Semanas
3	23	β^0 β^+ (IVS-II-654 grave C>T)	15	12 Semanas
4	18	β^{WT} ($\alpha\alpha$) β^0 ($\alpha\alpha\alpha\alpha$)	13	Pre-Infusión
5	35	β^0 β^+ (IVS-I-110 grave G>A)	15	Pre-Infusión

β^0 , ausencia de producción de globina β ; β^+ , producción disminuida de globina β ; β^{WT} , tipo salvaje (producción normal de globina β); PRBC, transfusión de células sanguíneas rojas empaquetadas.

El primer paciente (Paciente 1) tratado con ST-400 en el estudio de Fase 1/2 tiene la forma más grave de beta talasemia dependiente de transfusión (β^0/β^0). Durante los dos años anteriores al tratamiento en el estudio, este paciente recibió transfusiones de células

sanguíneas rojas empaquetadas (PRBC) cada dos semanas. Durante la infusión de ST-400, el Paciente 1 experimentó una reacción alérgica transitoria que se consideró relacionada con el crioprotector presente en el producto. Posteriormente, el curso clínico después del trasplante fue rutinario, y el paciente demostró una recuperación de neutrófilos y plaquetas en dos y cuatro semanas desde la infusión, respectivamente.

El Paciente 1 recibió una transfusión de PRBC dos semanas después de la infusión de las HSPC modificadas y no requirió más infusiones de PRBC durante las siguientes 6 semanas. A las siete semanas después de la infusión con las HSPC modificadas, los niveles de hemoglobina total permanecieron estables a aproximadamente 9 g/dL y los niveles de hemoglobina fetal continuaron elevándose (desde aproximadamente el 1 % de la hemoglobina total en el momento de la infusión hasta el 31 % (véase, la FIG. 6A y FIG. 6B). Se han detectado indels (inserciones o deleciones que se crean en la secuencia de ADN diana) en las células sanguíneas blancas circulantes, lo que indica una edición exitosa del gen de BCL11A y la disrupción del potenciador específico eritroide de BCL11A, lo que se pretende para regular al alza la producción de hemoglobina fetal endógena en las células sanguíneas rojas.

Después del injerto de neutrófilos y plaquetas demostrado en el paciente 1, los pacientes 2 y 3 también se trataron como se ha descrito anteriormente. Los Pacientes 1, 2 y 3 tienen todos genotipos de beta talasemia grave: β^0/β^0 , homocigoto para la mutación grave β^+ IVS-I-5 (G>C) (Pacientes 1 y 3) o genotipo β^0/β^+ incluyendo la mutación grave IVS-II-654 (C>T) (Paciente 2).

El Paciente 1 y Paciente 2 experimentaron una rápida reconstitución hematopoyética. El Paciente 1 tenía una fracción de hemoglobina fetal (HbF) incrementada lo que contribuyó a una hemoglobina total estable. Después de no tener transfusiones de PRBC durante un total de 6 semanas, el Paciente 1 requirió posteriormente transfusiones intermitentes. El Paciente 2 tenía niveles de HbF elevados observados a lo largo de 90 días después de la infusión. Para los Pacientes 1 y 2, las inserciones y deleciones (indels) en la diana estaban presentes en las células sanguíneas blancas circulantes. El Paciente 3 justo había completado la fabricación de ST-400 y los niveles de HbF se determinarán después de la infusión.

El Paciente 1 experimentó un evento adverso grave (SAE) de hipersensibilidad durante la infusión de ST-400 que el investigador consideró que estaba relacionado con el producto.

Este evento se resolvió con tratamiento. No se han reportado otros SAE relacionados con ST-400. No se ha observado hematopoyesis clonal.

El seguimiento regular (evaluación de la reconstitución hematopoyética, niveles de hemoglobina fetal, indels en células sanguíneas blancas circulantes, etc.) se lleva a cabo con el tiempo (p. ej., 12 o más meses) al repoblar las células madre modificadas la médula y dirigir la hematopoyesis, los niveles de HbF se incrementan y la necesidad de transfusiones se reduce o elimina en los pacientes.

MOVILIZACIÓN Y RESULTADOS DE LA AFÉRESIS

Los recuentos de CD34+ de sangre periférica antes de la aféresis diaria variaron de 25 a 118 células/ μ L. El Paciente 1 se sometió a 2 ciclos de movilización y aféresis debido a una dosis baja de células y potencia de CFU en el primer lote de ST-400. El injerto de reserva se crioconservó del primer ciclo. Los Pacientes 2, 3, 4 y 5 se sometieron cada uno a un ciclo de movilización y aféresis a partir de los que se fabricaron sus lotes de ST-400, y se crioconservaron los injertos de reserva.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PRODUCTOS Y RECONSTITUCIÓN HEMATOPOYÉTICA

Los indels en la diana en el producto ST-400 variaron del 23–80 % como se muestra a continuación en la Tabla B.

Tabla B: Características del Producto ST-400 y Reconstitución hematopoyética

Paciente	Dosis de Células (10 ⁶ /kg)	CD34+ (%)	Dosis de CFU (10 ⁵ /kg)	Indels en la Diana ^a (%)	Injerto de Neutrófilos ^b Día(s)	Injerto de Plaquetas ^c Día(s)
1^d	5,9	91	6,2	23 ^e	14	25
2^d	4,5	87	4,0	73	15	22
3^f	11,4	90	14,8	54	22	35
4	5,4	86	7,6	80	Pre-Infusión	Pre-Infusión
5	9,5	98	10,5	76	Pre-Infusión	Pre-Infusión

^aPorcentaje de todos los alelos *BCL11A* ESE con un indel; esto no es equivalente al porcentaje de todas las células con al menos un alelo *BCL11A* ESE editado.

^bInjerto de neutrófilos definido como que ocurre en el primero de 3 días consecutivos en el que el recuento de neutrófilos del paciente fue ≥ 500 células/ μ L.

^cInjerto de plaquetas definido como que ocurre en la primera de 3 mediciones consecutivas abarcando un mínimo de 3 días (en ausencia de transfusión de plaquetas en los 7 días precedentes) en la que el recuento de plaquetas del paciente fue ≥ 20.000 células/ μ L.

^dLos Pacientes 1 y 2 recibieron G-CSF desde el día +5 al injerto de neutrófilos según el procedimiento de operación estándar del sitio.

^eEl Paciente 1 se sometió a 2 ciclos de aféresis y fabricación de ST-400; el porcentaje de indel en la diana para el lote no mostrado fue 26 %. Todos los demás pacientes se sometieron solo a un ciclo de aféresis y fabricación.

^fEl Paciente 3 recibió G-CSF desde el día +21 al injerto de neutrófilos según el procedimiento de operación estándar del sitio.

Como se muestra, el valor de indel más bajo se observó en el Paciente 1, para el que la eficiencia de la edición fue cerca del 25 % en dos lotes fabricados separadamente. Usando el mismo proceso de fabricación a escala clínica, las células CD34+ de 12 donantes sanos se editaron eficientemente: mediana de indels en la diana, 71 %; rango, 59 % al 83 %. Las dosis de las células nucleadas viables ST-400 fueron $4,5\text{--}11,4 \times 10^6$ células/kg. Los pacientes demostraron injerto de neutrófilos en 14–22 días e injerto de plaquetas en 22–35 días.

SEGURIDAD

No se ha observado hematopoyesis clonal emergente por la monitorización del patrón de indels en la diana con el tiempo por perfilado de indels en los 3 pacientes dosificados. Véase, la FIG. 7A a la FIG. 7C.

A través de las observaciones en el Paciente 1 en el mes 9; paciente 2 en el mes 6) y Paciente 3 en el día 56, la frecuencia máxima de un único indel en cualquier punto de tiempo ha sido 16 %, 16 % y 14 % de todos los indels detectados, respectivamente.

Los eventos adversos graves reportados (SAE) se muestran en la Tabla C para los pacientes tratados.

Tabla C: Eventos Adversos Graves

Paciente	Eventos Adversos Graves	Relacionados con ST-400
1	Hipersensibilidad ^a	RELACIONADO
2	Ninguno	-
3	Neumonía ^b	NO RELACIONADO
4	Ninguno	-
5	Ninguno	-

^aOcurrió durante la infusión de ST-400 y se resolvió rápidamente con gestión médica; se consideró relacionado con el crioprotector DMSO.

^bLa neumonía ocurrió en el periodo de tiempo entre el procedimiento de aféresis y el inicio del acondicionamiento de la quimioterapia.

Como se muestra, solo se reportó un SAE atribuido al producto farmacéutico ST-400; este SAE de hipersensibilidad ocurrió durante la infusión de ST-400, se resolvió al final de la infusión, y se consideró relacionado con el producto crioprotector, DMSO.

De otra manera, los AE reportados han sido consistentes con las toxicidades conocidas de movilización, aféresis y acondicionamiento mieloablativo con busulfán.

CAMBIOS DESPUÉS DE LA INFUSIÓN

Como se ha descrito anteriormente, después del trasplante de ST-400, los niveles de hemoglobina fetal se incrementaron en comparación con la línea base en los 3 pacientes

(FIG. 8), con los Pacientes 1 y 3 mostrando una mayor inducción que el Paciente 2, consistente con el hecho de que el Paciente 2 recibió el producto ST-400 con la dosis de células y potencia de CFU más bajas.

En el Paciente 1, los indels han persistido en los leucocitos periféricos durante todo el mes 9, y las células de la médula no fraccionadas en el día 90 mostraron 6 % de indels. Después de un periodo inicial de 6 semanas sin transfusiones, este paciente ha reanudado las transfusiones intermitentes de PRBC, con una reducción del 33 % en unidades de PRBC anualizadas proyectadas transfundidas a aproximadamente los 8 meses desde el injerto.

En el Paciente 2, los indels han persistido en los leucocitos periféricos durante todo el mes 6, y las células de la médula no fraccionadas en el día 90 mostraron 32 % de indels. El paciente está recibiendo transfusiones intermitentes de PRBC.

En el Paciente 3, los indels han persistido en los leucocitos periféricos durante todo el día 56. La valoración de una muestra de aspirado de médula a los 90 días no está todavía disponible. Después de un periodo inicial de 7 semanas sin transfusiones, el paciente ha recibido dos transfusiones de PRBC empezando a los 62 días después de la infusión.

RESUMEN DE LOS PACIENTES 1 A 3

El tratamiento de y los resultados de los pacientes 1 a 3 se resumen a continuación. Para cada paciente, la dosis de células CD34+ se calculó como sigue: dosis de CD34+ = [dosis de células total] x [% de CD34+]. Véase, *p. ej.*, la Tabla B, que muestra la dosis de células total en la columna 2 y el % de CD34+ en la columna 3.

Paciente 1

El Paciente 1 tiene un genotipo $\beta 0/\beta 0$, la forma más grave de TDT, y tenía 27 eventos de células sanguíneas rojas empaquetadas (PRBC) anualizados antes de la inclusión en el estudio. El paciente se sometió a un segundo ciclo de movilización y aféresis debido a la dosis de células y potencia bajas conseguidas en el primer ciclo. En los dos lotes de ST-400, la eficiencia de edición fue aproximadamente el 25 %, que fue menor que la de los otros pacientes incluidos en el estudio y 12 lotes operados en el ensayo fabricados a escala clínica (mediana de eficiencia de edición del 71 %).

Los indels en la diana en el producto ST-400 infundido fueron el 23 %, y la dosis de células CD34+ fue $5,4 \times 10^6$ células/kg. Los indels estaban presentes en las células de la médula no fraccionadas a los 90 días y han persistido en los leucocitos periféricos durante todo el Mes 9. Después de la infusión de ST-400, los niveles de hemoglobina fetal se incrementaron hasta aproximadamente 2,7 g/dL en el Día 56 y permanecieron elevados en comparación con la línea base a 0,9 g/dL en la semana 39, la medición más reciente en el momento del corte de los datos de ASH. Después de un periodo inicial de 6 semanas sin transfusiones, el paciente reanudó las transfusiones intermitentes de PRBC, con una reducción global del 33 % en las unidades de PRBC anualizadas transfundidas desde el injerto.

Paciente 2

El Paciente 2 es homocigoto para la mutación grave β^+ IVS-I-5 (G>C) y tenía 18 eventos de PRBC anualizados antes de la inclusión en el estudio. Los indels en la diana en el producto ST-400 fueron el 73 %, con una dosis de células CD34+ de $3,9 \times 10^6$ células/kg, la más baja observada en los lotes de ST-400 fabricados para los 5 pacientes incluidos. Los indels estaban presentes en las células de médula no fraccionadas a los 90 días y han persistido en los leucocitos periféricos durante todo el Mes 6. Después de la infusión de ST-400, los niveles de hemoglobina fetal se incrementaron en comparación con la línea base, pero han sido <1 g/dL a lo largo de 26 semanas, el nivel de inducción más bajo observado en los tres pacientes tratados hasta la fecha. El paciente está recibiendo actualmente transfusiones intermitentes de PRBC.

Paciente 3

El Paciente 3 tiene un genotipo β^0/β^+ que incluye la mutación grave IVS-II-654 (C>T) y tenía 15 eventos de PRBC anualizados antes de la inclusión en el estudio. Los indels en la diana en el producto ST-400 fueron el 54 %, con una dosis de células CD34+ de $10,3 \times 10^6$ células/kg. En el momento del corte de datos de ASH, los indels han persistido en los leucocitos periféricos hasta el Día 56. Después de la infusión de ST-400, los niveles de hemoglobina fetal se han incrementado en comparación con la línea base y continuaron elevándose desde la última medición de 2,8 g/dL en el Día 90. Después de un periodo inicial de 7 semanas sin transfusiones, el paciente ha recibido dos transfusiones de PRBC comenzando a los 62 días después de la infusión.

Estos estudios y estudios adicionales de pacientes adicionales y pacientes 1-3 demuestran que se consigue el tratamiento de TDT que incluye la eliminación de la necesidad de terapias adicionales tales como PRBC después de la administración (infusión) de células modificadas genéticamente (ST-400) como se describe en la presente memoria.

Todas las patentes, solicitudes y publicaciones de patente mencionadas en la presente memoria se incorporan por el presente documento por referencia en su totalidad.

Aunque la descripción se ha proporcionado con algún detalle como ilustración y ejemplo para los propósitos de claridad de comprensión, será evidente para los expertos en la técnica que pueden practicarse diversos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o alcance de la descripción. Por consiguiente, las descripciones y ejemplos anteriores no deben considerarse como limitantes.