

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 356**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/82** (2006.01)

**A61K 45/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2008** **E 08707852 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015** **EP 2126051**

54 Título: **Un método para expandir monocitos**

30 Prioridad:

**11.01.2007 EP 07300717**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.12.2015**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET  
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75654 Paris Cedex 13, FR y  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SIEWEKE, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 553 356 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Un método para expandir monocitos

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a un método para generar, mantener y expandir monocitos, macrófagos o células dendríticas en el cultivo a largo plazo.

10 **Estado de la técnica**

Los monocitos se generan en la médula ósea (MO) y se liberan a la circulación sanguínea y dan lugar a diferentes tipos de macrófagos o células dendríticas del tejido después de dejar la circulación. Los monocitos, su progenie y los precursores inmediatos en la médula ósea también se han denominado el “sistema de fagocitos mononucleares” (SFM). Derivan de los progenitores unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos (UF—GM) en la médula ósea que dan lugar a las células monolíticas y granulocíticas. El proceso de maduración del linaje monolítico *in vivo* pasa de un estado de monoblastos, a través del estado de promonocitos hasta los monocitos maduros (Goud TJ *et al.* 1975). IL-3, GM-CSF y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) estimulan la generación *in vivo* de monocitos (Metcalf D *et al.* 1990). *In vitro*, las células progenitoras hematopoyéticas cultivadas con GM-CSF inducen UFC-GM que se diferencian hacia granulocitos, mientras que la adición de FL y SCF desplaza la diferenciación desde el linaje granulocítico al monocítico (Gabbianelli M *et al.* 1995; Willems R *et al.* 2001).

Varios estudios recientes indican que, aunque la expresión de marcadores específica de la superficie puede variar con detalle entre las especies, las vías de diferenciación generales de los monocitos y su progenie parecen estar ampliamente conservadas entre ratones y seres humanos (Gordon S *et al.* 2005). Con la mayor accesibilidad a la experimentación se pudo trabajar con una vía de diferenciación más detallada en el modelo animal. Los monocitos de ratón se originan a partir de células madre hematopoyéticas (HSC) en la médula ósea a través de etapas de compromiso sucesivas y varias etapas intermedias de progenitores con potencial de diferenciación cada vez más restringido (Shizuru JA *et al.* 2005; Kondo M *et al.* 2000). Se cree que esta serie de diferenciación atraviesa el progenitor mielóide común (CMP), que puede dar lugar a todas las células mieloides, a las progenitoras de granulocitos y macrófagos (GMP), que da lugar a células monocíticas y granulocíticas y puede ser idéntica o muy similar a los progenitores de UFC-GM. Sin embargo, un progenitor monocítico más inmediato en la médula ósea parece ser el progenitor de macrófagos / células dendríticas (MDP) que puede dar lugar a macrófagos y células dendríticas, probablemente a través de una etapa intermedia de monocitos (Fogg *et al.* 2006).

Los monocitos recién formados salen de la MO en un plazo de 24 horas y migran a la sangre periférica. Los monocitos circulantes pueden adherirse a las células endoteliales de los vasos capilares y son capaces de migrar hacia varios tejidos (van Furth R. *et al.* 1992), donde pueden diferenciarse en macrófagos o células dendríticas. Esta adherencia y migración implican proteínas de la superficie, el antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD11 y el antígeno 4 (VLA-4), pertenecientes a la superfamilia de integrinas de las moléculas de adhesión (Kishimoto TK *et al.* 1989). Estas integrinas interactúan con selectinas sobre las células endoteliales. Los macrófagos derivados de monocitos pueden mostrar un alto grado de heterogeneidad que refleja una especificación morfológica y funcional adoptada en el tejido infiltrado. De acuerdo con su localización anatómica también pueden tener nombres distintos (por ejemplo, microglía en el sistema nervioso central y células de Kupffer en el hígado).

A pesar de que sigue siendo controvertido, si algunas poblaciones de macrófagos residentes pueden ser capaces de proliferar *in situ* en ciertas condiciones, la mayoría de los macrófagos parecen no tener capacidad de proliferación o esta es muy limitada (Gordon S, *et al.*, 2005). La renovación de las poblaciones de macrófagos tisulares, por tanto, depende de la entrada de monocitos y su diferenciación local (Crofton RW *et al.* 1978; Blusse van Oud Alblas A *et al.* 1981). Aunque dichos monocitos que infiltran el pueden tener una capacidad de proliferación muy limitada, los monocitos circulantes en la sangre no se reciclan y se diferencian rápidamente en macrófagos en lugar de expandirse, cuando son estimulados con M-CSF *ex vivo*.

El reclutamiento de monocitos en los tejidos difiere en condiciones homeostáticas e inflamatorias y parece implicar dos poblaciones distintas de monocitos que se han identificado en los seres humanos y en modelos de animales mamíferos (Gordon S, *et al.* 2005). Durante la inflamación aumenta la monocitopoyesis (Shum DT *et al.* 1982; van Waarde D *et al.* 1977) lo que da lugar a una cifra elevada de monocitos. Además, los mediadores inflamatorios, IL-1, IL-4, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , regulan por aumento la expresión de selectinas sobre las células endoteliales, estimulan la migración de los monocitos a los tejidos. Las mismas citocinas modulan la expresión de las moléculas de adhesión integrinas sobre los monocitos (Pober JS *et al.* and 1990). En el lugar de la inflamación, los monocitos inflamatorios están implicados en la fagocitosis de microorganismos opsonizados o complejos inmunitarios a través de los receptores  $\gamma$  de la superficie (CD64, CD32) y los receptores del complemento (CD11b, CD11c). Los microorganismos son destruidos de forma sinérgica por los metabolitos reactivos de oxígeno y nitrógeno, y a través de varias enzimas hidrolíticas (fosfatasa ácida, esterasa, lisozima y galactosidasa) (Kuijpers T. 1989; Hibbs JB *et al.* 1987). Es importante destacar que los macrófagos derivados de monocitos y las células dendríticas estimulan los linfocitos T mediante la presentación de antígenos y, por tanto, están involucrados en las fases de reconocimiento y

activación de la respuesta inmunitaria adaptativa (Nathan CF. 1987). Los monocitos también secretan un gran número de productos bioactivos que desempeñan un papel importante en las respuestas inflamatorias, proliferativas e inmunitarias, incluyendo los factores de crecimiento (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-1) y los factores antiproliferativos (IFN, TNF).

5 El lipopolisacárido (LPS) o la endotoxina es un componente estructural integral predominante de la membrana externa de las bacterias gramnegativas y uno de los iniciadores microbianos más potentes de la inflamación. El LPS se une a la glicoproteína CD14 que se expresa en la superficie de los monocitos y estimula la vía del receptor Toll a través de la activación de TLR4. Otros PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) también pueden iniciar  
10 respuestas inflamatorias a través de otros receptores TLR. La unión de LPS u otros PAMP induce la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1, -6, -8 y -10 (Wright SD. *Et al*; 1990; Dobrovolskaia MA *et al.* 2002; Foey AD. *et al.* 2000).

Aparte del LPS u otros PAMP, uno de los estímulos más eficientes para la producción de citocinas *in vitro* es el contacto directo célula-célula de los monocitos con linfocitos activados (Wey E. *et al.* 1992; Parry SL. *Et al.* 1997), a través del ligando de CD40 (CD40L) (Wagner DH. *Et al.* 1997; Shu U. *et al.* 1995; Alderson MR. *et al.* 1993). Esta interacción también puede ser importante en la vigilancia inmune de los tumores. Por lo tanto, la incubación de los monocitos con células transfectadas con CD40L da lugar a actividad tumoricida contra una línea celular de melanoma humano. Adicionalmente, también se han descrito interacciones funcionales entre monocitos y células NK, un tipo de célula con una actividad antitumoral significativa. Tanto el contacto directo célula-célula (Miller JS. *Et al.* 1992). Como la liberación de factores solubles, tales como IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-15 o IL-1 $\beta$  por monocitos activados inducen la proliferación, producción de IFN- $\gamma$  (Carson WE *et al.* 1995; Tripp CS. *et al.* 1993) y el potencial citotóxico de las células NK cocultivadas de una manera dependiente del tiempo (Chang ZL. *et al.* 1990; Bloom ET. *et al.* 1986).

25 Por último, los macrófagos también están implicados críticamente en la cicatrización de heridas y la reparación de los tejidos, donde asumen funciones tróficas mediante la eliminación de desechos y orquestando el reclutamiento y la actividad de otros tipos de células que participan en la remodelación tisular (Gordon S *et al.* 2003)

Las células dendríticas (CD) son componentes del sistema inmunológico innato. Son células presentadoras de antígeno con la capacidad única de inducir una respuesta inmunitaria primaria (Banchereu *et al.* 2000). Pueden derivar de monocitos circulantes o progenitores circulantes de las CD la sangre y los tejidos periféricos no linfoides, donde pueden convertirse en células residentes (Banchereau J. *et al.* 1998, 2000) (Geissmann, 2007) (Wu y Liu, 2007). Las CD inmaduras (CDi) reconocen los patógenos a través de los receptores de la superficie celular, incluyendo los receptores de tipo Toll (Reis e Sousa C. 2001). Después de la absorción del antígeno, las CD maduran y migran a los ganglios linfáticos. Las CD maduras (CDm) son células presentadoras de antígeno eficaces (CPA) que participan en la sensibilización de los linfocitos T (Banchereau J. *et al.* 1998.2000). Además se ha descrito un papel predominante de las CD en la activación de células NK en ratones y seres humanos. Se ha demostrado que las CD inmaduras y derivadas de monocitos humanos activadas por bacterias inducen la secreción de citocinas y la citotoxicidad de las células NK (Ferlazzo G. *et al.* 2002; Fernandez NC. *et al.* 1999).

40 La diferenciación *in vitro* de los macrófagos murinos de la médula ósea en presencia de M-CSF la describió Stanley *et al.* (1978, 1986). Mientras que las células progenitoras inicialmente proliferan en respuesta a M-CSF, en última instancia se diferencian en macrófagos maduros y al final se retiran del ciclo celular (Pixley y Stanley, 2004). Por tanto, aunque los macrófagos generados de esta manera sobrevivirán durante un tiempo limitado, no son homogéneos y no se pueden ampliar aún más en cultivo. Del mismo modo, los monocitos humanos no proliferan en respuesta a M-CSF pero inician cambios morfológicos indicativos de diferenciación de los macrófagos (Becker *et al.*, 1987). Aunque se puede obtener un número significativo de monocitos de un paciente mediante leucaféresis e hidroseparación (Stevenson *et al.*, 1983), estas células se diferenciarán aún más en macrófagos en unos pocos días sin proliferar y no pueden mantenerse en cultivo.  
50 Ahora, la presente invención proporciona un nuevo método *in vitro* para generar, mantener y expandir monocitos y macrófagos en cultivo a largo plazo.

De hecho, los inventores han demostrado que es posible expandir y mantener los monocitos y los macrófagos en cultivo durante semanas o meses, mediante la inactivación de la expresión de MafB y c-MFA en dichas células. No sólo los macrófagos generados *in vitro*, sino también los macrófagos deficientes en MafB y c-Maf de la médula ósea y los monocitos de sangre siguen proliferando en el cultivo.

Los métodos de la invención pueden, por lo tanto, ser útiles para enfoques terapéuticos que requieren la amplificación de monocitos y células derivadas de monocitos, así como para la detección selectiva de fármacos dirigidos a monocitos, macrófagos derivados de monocitos (incluidos los osteoclastos) y células dendríticas o para analizar la respuesta a fármacos específicos de una manera específica del paciente, o para estudiar las bases moleculares de enfermedades dependientes de monocitos o de células derivadas de monocitos mediante el cultivo y expansión de los monocitos o de las células derivadas de monocitos de pacientes afectados.

65

**Objeto de la invención**

La presente invención proporciona un método *ex vivo* para la expansión de monocitos, macrófagos o células dendríticas, método que comprende la inactivación de la expresión o la actividad de MafB y c-Maf en monocitos, macrófagos o células dendríticas; y la expansión de las células en presencia de M-CSF.

Otro objeto de la invención es un monocito, macrófago o célula dendrítica, que no expresa MafB y c-Maf o en el que la expresión o actividad de MafB y c-Maf se ha anulado o inactivado.

Dichos monocitos, macrófagos o células dendríticas son útiles en una composición farmacéutica, en la que se encuentran en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un objeto particular de la invención es una composición farmacéutica que comprende tales células dendríticas, cargados con una molécula antigénica, para uso como una vacuna.

La invención proporciona además el uso de un monocito, macrófago o célula dendrítica como se ha definido anteriormente, para la detección selectiva de fármacos.

La invención proporciona adicionalmente un método para la generación y la expansión de monocitos murinos, método que comprende las etapas que consisten en:

- i) aislar monocitos derivados de un ratón que no expresa MafB y c-Maf, y
- ii) cultivar dichos monocitos en presencia de M-CSF.

**25 Descripción detallada de la invención**Definiciones:

Una "secuencia de codificación o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia de codificación para una proteína puede incluir un codón de iniciación (habitualmente ATG) y un codón de terminación.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ADN que codifica o corresponde a una secuencia particular de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de una o más proteínas o enzimas, y puede o no incluir secuencias de ADN reguladoras, tales como secuencias promotoras, que determinan, por ejemplo, las condiciones en las que se expresa el gen. Un "promotor" o "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula y de iniciar la transcripción de una secuencia codificadora cadena abajo (dirección 3'). Algunos genes, que no son genes estructurales, pueden transcribirse a partir de ADN a ARN, pero no se traducen en una secuencia de aminoácidos. Otros genes pueden funcionar como reguladores de genes estructurales o como reguladores de la transcripción del ADN. En particular, el término gen puede estar destinado a la secuencia genómica que codifica una proteína, es decir, una secuencia que comprende las secuencias reguladora, promotora, intrón y exón.

Tal como se usa en el presente documento, las referencias a proteínas específicas (por ejemplo, MafB o c-Maf) pueden incluir un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos nativa, así como variantes y formas modificadas independientemente de su origen o modo de preparación. Una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos nativa es una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la obtenida de la naturaleza (por ejemplo, un MafB o c-Maf de origen natural). Tales proteínas de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o se pueden preparar utilizando métodos sintéticos y/o recombinantes. Las proteínas de la secuencia nativa abarcan formas de origen natural truncadas o solubles, formas variantes de origen natural (por ejemplo, como alternativa, formas de corte y empalme), variantes y formas alélicas de origen natural que incluyen modificaciones postraduccionales. Una proteína de secuencia nativa incluye las siguientes modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, o fosforilación, ubiquitinación, sumoilación u otras modificaciones de algunos restos de aminoácidos.

Los términos "mutante" y "mutación" significan cualquier cambio detectable en el material genético, por ejemplo, ADN, ARN, ADNc, o cualquier proceso, mecanismo o resultado de dicho cambio. Esto incluye mutaciones génicas, en las que la estructura (por ejemplo, la secuencia de ADN) de un gen está alterada, cualquier gen o ADN que surja de cualquier proceso de mutación y cualquier producto de expresión (por ejemplo, proteína o enzima) expresado por un gen o secuencia de ADN modificados. Las mutaciones incluyen delección, inserción o sustitución de uno o más nucleótidos. La mutación se puede producir en la región de codificación de un gen (es decir, en los exones), en los intrones, o en las regiones reguladoras (por ejemplo, potenciadores, elementos de respuesta, supresores, secuencias señal, secuencias de poliadenilación, promotores) del gen. Generalmente una mutación se identifica en un sujeto mediante la comparación de la secuencia de un ácido nucleico o polipéptido expresado por dicho sujeto

con el correspondiente ácido nucleico o polipéptido expresado en una población de control. Cuando la mutación está dentro de la secuencia de codificación del gen, la mutación puede ser una mutación "de sentido erróneo", en la que se reemplaza un aminoácido por otro en el producto del gen, o una mutación "sin sentido", en la que se reemplaza un codón de aminoácido por un codón de terminación. También se puede producir una mutación en un sitio de corte y empalme en el que se crean o destruyen las señales para el corte y empalme del exón-intrón y, por lo tanto, se produce un producto génico de estructura alterada. Una mutación en el material genético también puede ser "silenciosa", es decir, la mutación no da lugar a una alteración de la secuencia de aminoácidos del producto de expresión.

Variantes hace referencia a proteínas que son equivalentes funcionales de una proteína de secuencia nativa que tienen secuencias de aminoácidos similares y retienen, en cierta medida, una o más actividades de la proteína nativa. Las variantes también incluyen fragmentos que retienen la actividad. Las variantes también incluyen proteínas que son sustancialmente idénticas (por ejemplo, que tienen 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 %, de identidad de secuencia) a una secuencia nativa. Tales variantes incluyen proteínas que tienen alteraciones de aminoácidos tales como deleciones, inserciones y / o sustituciones. Una "delección" se refiere a la ausencia de uno o más restos de aminoácidos en la proteína relacionada. El término "inserción" se refiere a la adición de uno o más aminoácidos en la proteína relacionada. Una "sustitución" se refiere a la sustitución de uno o más restos de aminoácido por otro resto de aminoácido en el polipéptido. Típicamente, tales alteraciones son de naturaleza conservadoras, de forma que la actividad de la proteína variante es sustancialmente similar a una proteína de secuencia nativa (véase, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company). En el caso de sustituciones, el aminoácido que sustituye a otro aminoácido por lo general tiene propiedades estructurales y / o químicas similares. Las inserciones y deleciones normalmente están en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos, aunque dependiendo de la ubicación de la inserción, se pueden insertar o eliminar más aminoácidos. Las variaciones se pueden realizar usando métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio (Carter, *et al.* (1985); Zoller *et al.* (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:6487), mutagénesis de casete (Wells *et al.* (1985) *Gene* 34:315), mutagénesis por selección de restricción (Wells, *et al.* (1986) *Philos. Trans. R. Soc. London SerA* 317:415), y mutagénesis por PCR (Sambrook *et al.*, 2001).

Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más del 80 %, preferentemente más del 85%, preferentemente más del 90% de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente el 90 %, preferentemente más del 95%, son similares (funcionalmente idénticos). Preferentemente, las secuencias similares u homólogas se identifican mediante alineación usando, por ejemplo, el programa en cadena GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, *Versión 7*, Madison, Wisconsin) o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias, tales como BLAST, FASTA, etc.

El término "expresión", cuando se utiliza en el contexto de la expresión de un gen o ácido nucleico, 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 (por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNr, ARN antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína producida por traducción de un ARNm. Los productos génicos también incluyen los ARN mensajeros que están modificados, por procesos tales como protección, poliadenilación, metilación, y edición, y proteínas (por ejemplo, MafB o c-Maf) modificadas mediante, por ejemplo, metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, ADP-ribosilación, miristilación y glicosilación.

Un "inhibidor de la expresión" se refiere a un compuesto natural o sintético que reduce o suprime la expresión de un gen.

Un "inhibidor de la actividad" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un compuesto (natural o no) que tiene la capacidad de reducir o suprimir la actividad de una proteína.

El término "c-Maf" indica el protooncogén c-Maf, que es de secuencia idéntica al oncogén v-Maf del virus AS42 y puede transformar los fibroblastos de embrión de pollo (Nishizawa *et al.* PNAS 1989). C-Maf y otros miembros de la familia Maf forman homodímeros y heterodímeros entre sí y con Fos y Jun, en consonancia con la capacidad conocida de las proteínas AP-1 para emparejarse entre sí (Kerppola, T. K. y Curran, T. (1994) *Oncogene* 9:675–684; Kataoka, K. *et al.* (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14:700–712). La secuencia diana de ADN a la que los homodímeros de c-Maf se unen, denominada elemento de respuesta a c-Maf (MARE), es un elemento 13 o 14 pb que contiene un núcleo de palíndromo TRE (T-MARE) o CRE (C-MARE) respectivamente, pero c-Maf también puede unirse a secuencias de ADN que divergen de estos sitios de consenso incluyendo los sitios compuestos AP-1 / MARE y los semisitios de MARE con extensiones ricas en AT en 5' (Yoshida *et al.*, NAR2005). Se ha demostrado que c-Maf estimula la transcripción de varios promotores, incluyendo el promotor específico de las neuronas de Purkinje L7 (Kurscher, C. y Morgan, J. I. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 15:246–254), los promotores de  $\alpha, \beta$   $\gamma$ -Cristalina (Ring *et al.* *Development*, 2000, Kim *et al.* PNAS 1999; Kawachi *et al.* JBC1999, Yang *et al.*, JMB 2005), insulina (Matsuoka, *et al.* MCB, 2003) y p53 (Hale *et al.*, JBC 2000), además de reprimir la transcripción de otros promotores tales como el promotor temprano mielóide AND/CD13 (Hedge *et al.*, 1998). También se ha demostrado que c-Maf induce la diferenciación de los linfocitos T colaboradores de tipo 2 (Th2) (Ho *et al.*, 1996) debido a su capacidad para activar la transcripción específica de tejido de la interleucina 4 (IL-4) (Kim *et al.* 1999). Adicionalmente, la sobreexpresión de c-Maf en líneas celulares mieloides induce la diferenciación de macrófagos (Hegde *et al.*, 1999). Se han descrito la secuencia de nucleótidos del protooncogén c-maf de ratón y la secuencia de aminoácidos predicha para la proteína

c-Maf de ratón (Kurscher, C. and Morgan, J. I. (1995) Mol. Cell. Biol. 15:246–254; y número de acceso en GenBank S74567). También se han descrito la secuencia de nucleótidos del protooncogén c-maf de pollo y la secuencia de aminoácidos prevista para la proteína c-Maf de pollo (Kataoka *et al.* 1994, número de acceso en GenBank D28596). También se han descrito la secuencia de nucleótidos del protooncogén c-maf de ser humano y la secuencia de aminoácidos prevista para la proteína c-Maf de ser humano (patente de EE.UU. 6.274.338 y número de acceso en GenBank BD106780).

El término "MafB" indica el factor de transcripción MafB. Este gen se expresa en diversos tipos de células (incluyendo las células epiteliales del cristalino, endocrinas del páncreas, condrocitos y células hematopoyéticas y neuronales) y codifica una proteína de 311 aminoácidos que contiene un motivo bZip típico en su región carboxi-terminal. En el dominio bZip, MafB comparte una extensa homología no solo con v / c-Maf sino también con otras proteínas relacionadas con Maf. MafB puede formar un homodímero a través de su estructura de repetición de leucina y se une específicamente a palíndromo de los elementos de reconocimiento de Maf (MARES), sitios compuestos AP-1 / MARE o semisitios MARE con extensiones en 5' ricas en AT (Yoshida, *et al.* 2005). Además, MafB puede formar heterodímeros con c- / v-Maf o Fos a través de su estructura en cremallera, pero no con junio u otros miembros de la familia de Maf (Kataoka *et al.*, 1994). MafB también se conoce con el nombre *kreisler*, *kr* o *Krml1* (por 'cremallera de leucina de Kreisler Maf 1'), porque una microinversión cromosómica inducida con rayos x en ratones mutantes en *kreisler* ratones causa la pérdida específica de tejido de la expresión MafB en el rombencéfalo en desarrollo que es responsable del fenotipo *kreisler* (Cordes *et al.*, 1994) (Eichmann *et al.*, 1997). En el sistema hematopoyético MafB se expresa selectivamente en el linaje mielóide y está regulado por aumento sucesivamente durante la diferenciación mielóide de progenitores multipotenciales en macrófagos. De hecho, esta inducción refleja un papel importante de MafB en la diferenciación de los monocitos. Por tanto, la sobreexpresión de MafB en mieloblastos de pollo transformados (Kelly *et al.*, 2000, Bakri *et al.* 2005) y en progenitores hematopoyéticos humanos (Gemelli *et al.*, 2006) inhibe la proliferación de células progenitoras (Tillmanns *et al.*, 2007) y estimula la rápida formación de macrófagos (Kelly *et al.*, 2000, Bakri *et al.* 2005, Gemelli *et al.*, 2006), mientras que una versión dominante negativa de MafB inhibe este proceso (Kelly *et al.*, 2000), lo que indica que la inducción de MafB es un determinante específico e importante del programa monocítico en las células hematopoyéticas. La secuencia de nucleótidos del gen MafB de pollo (Kataoka, K. *et al.* 1994), ratón (Cordes *et al.* 1994) y ser humano (Wang *et al.* 1999) y las secuencias de aminoácidos predichas para las proteínas MafB también se han descrito (Números de acceso en GenBank M\_001030852 (*gallus gallus*), NM\_010658 (*mus musculus*), NM\_005461 (*homo sapiens*) D28600).

Una "célula de monocitos" es un fagocito mononuclear grande de la sangre periférica. Los monocitos varían considerablemente y su tamaño varía de 10 a 30 µm de diámetro. La relación núcleo:citoplasma varía de 2:1 a 1:1. El núcleo a menudo tiene forma de banda (de herradura) o es reniforme (en forma de riñón). Se puede plegar sobre la parte superior de sí misma, de modo que muestra circunvoluciones similares a las del cerebro. No hay nucleolos visibles. El patrón de la cromatina es fino y está dispuesto en hebras de tipo madeja. El citoplasma es abundante y aparece de color gris azul con muchos gránulos azurófilos finos, lo que da un aspecto de vidrio esmerilado en la tinción de Giemsa. Puede haber vacuolas presentes. Más preferentemente, la expresión de antígenos de superficie específicos se utiliza para determinar si una célula es una célula monocito. Los principales marcadores fenotípicos de las células monocitos humanos incluyen CD11b, CD11c, CD33 y CD115. Generalmente, las células monocitos humanas expresan CD9, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD15, CDw17, CD31, CD32, CD33, CD35, CD36, CD38, CD43, CD49b, CD49e, CD49f, CD63, CD64, CD65s, CD68, CD84, CD85, CD86, CD87, CD89, CD91, CDw92, CD93, CD98, CD101, CD102, CD111, CD112, CD115, CD116, CD119, CDw121b, CDw123, CD127, CDw128, CDw131, CD147, CD155, CD156a, CD157, CD162, CD163, CD164, CD168, CD171, CD172a, CD180, CD206, CD131a1, CD213a2, CDw210, CD226, CD281, CD282, CD284, CD286 y opcionalmente CD4, CD14, CD16, CD40, CD45RO, CD45RA, CD45RB, CD62L, CD74, CD142 y CD170, CD181, CD182, CD184, CD191, CD192, CD194, CD195, CD197, CX3CR1. Los principales marcadores fenotípicos de las células monocitos de ratón incluyen CD11b+, CD115, F4/80+. Generalmente, los monocitos de ratón expresan CD11a, CD11b, CD16, CD18, CD29, CD31, CD32, CD44, CD45, CD49d, CD115, CD116, CDw131, CD281, CD282, CD284, CD286, F4/80, y opcionalmente CD49b, CD62L, CCR2, CX3CR1, y Ly6C. Tras el contacto con células diana sensibles, las células monocitos también producen una serie de citocinas, incluyendo IFN, TNF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, e IL-1.

Una "célula macrófago" es una célula que exhibe propiedades de la fagocitosis. La morfología de los macrófagos varía entre los diferentes tejidos y entre los estados normal y patológico, y no todos los macrófagos pueden identificarse solo mediante la morfología. Sin embargo, la mayoría de los macrófagos son células grandes con un núcleo redondo o indentado, un aparato de Golgi bien desarrollado, abundantes vacuolas endocitóticas, lisosomas y fagolisosomas, y una membrana plasmática cubierta con pliegues o microvellosidades. Las funciones clave de los macrófagos en la inmunidad innata y adaptativa son la fagocitosis y la posterior degradación de las células senescentes o apoptóticas, microbios y células neoplásicas, la secreción de citocinas, quimiocinas y otros mediadores solubles, y la presentación de antígenos extraños (péptidos) sobre su superficie a los linfocitos T. Los macrófagos derivan de las células progenitoras mieloides comunes y las células progenitoras de granulocitos-monocitos en la médula ósea de los organismos de mamíferos, que, en última instancia, se desarrollan a través de otras etapas de progenitores en los monocitos, que luego entran en el torrente sanguíneo periférico. A diferencia de los neutrófilos, con sus núcleos multilobulados, los monocitos tienen núcleos en forma de riñón y asumen un cuerpo celular grande durante su posterior diferenciación y activación. A lo largo de la vida, algunos monocitos se adhieren

y migran a través del endotelio de los capilares en todos los órganos, donde se diferencian en macrófagos o células dendríticas residentes en el tejido (véase más adelante). Además que un origen de monocito, también se ha informado sobre una capacidad de autorrenovación limitada para algunas subpoblaciones de macrófagos tisulares. Los tejidos linfáticos, tales como los ganglios linfáticos y el bazo, son particularmente ricos en macrófagos. En algunos órganos, los macrófagos llevan nombres especiales, tal como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1 Ejemplos de macrófagos tisulares

Órgano	Población de macrófagos
Hueso	Osteoclastos
Sistema nervioso central	Microglía
Tejido conjuntivo	Histiocitos
Vellosidades coriónicas de la placenta	Células de Hofbauer
Riñón	Células mesangiales
Hígado	Células de Kupffer
Cavidad peritoneal	Macrófagos peritoneales
Vías respiratorias pulmonares	Macrófagos alveolares
Piel	Macrófagos epidérmicos y dérmicos
Bazo	Macrófagos de la zona marginal, macrófagos metalófilos, macrófagos de la pulpa roja, macrófagos de la pulpa blanca

En el contexto de la invención, el macrófago se selecciona del grupo que consiste en microglía, histiocitos, células de Hofbauer, células mesangiales, células de Kupffer, macrófagos peritoneales, macrófagos alveolares, macrófagos epidérmicos o dérmicos, macrófagos de la zona marginal, macrófagos metalófilos, macrófagos de la pulpa roja, macrófagos de la pulpa blanca y osteoclastos. Los macrófagos de la médula ósea o de hígado fetal son particularmente útiles.

Los osteoclastos son un tipo de célula especializada del sistema de fagocitos mononucleares que es específica de hueso y sirve una importante función homeostática y de remodelación en este tejido mediante la degradación de sus componentes mineralizados. En cultivo, los osteoclastos pueden derivar de progenitores de UFC-GM de la médula ósea y de los monocitos de la sangre mediante cultivo en M-CSF y RANKL. La importancia de estas citocinas para el desarrollo de los osteoclastos se ve subrayada por la deficiencia de osteoclastos y el desarrollo de osteopetrosis en ratones con deleciones de uno u otro de estos dos factores. Aunque no se ha demostrado formalmente *in vivo*, se supone en general que los monocitos en sangre circulante sirven como precursores de osteoclastos. El desarrollo y / o actividad aberrantes de los osteoclastos desempeñan un papel destacado en las patologías humanas debilitantes de alta prevalencia y con opciones de tratamiento limitadas, como la osteoporosis, la osteopetrosis y la artrosis (Boyle WJ *et al.* 2003; Teitelbaum SL *et al.* 2003).

Los macrófagos son una fuente importante de citocinas. Funcionalmente, los numerosos productos se pueden colocar en cinco grupos principales: (1) citocinas que median en la respuesta proinflamatoria, es decir, ayudan a reclutar más células inflamatorias (por ejemplo, las quimiocinas IL-1, IL-6, TNF, CC y CXC, tales como IL-8 y la proteína quimiotáctica de monocitos 1); (2) citocinas que median en la activación de los linfocitos T y de las células asesinas naturales (NK) (por ejemplo, IL-1, IL-12, IL-18); (3) citocinas que ejercen un efecto de retroalimentación sobre el propio macrófago (por ejemplo IL-1, TNF, IL-12, IL-18, M-CSF, IFN $\alpha/\beta$ , IFN $\gamma$ ); (4) citocinas que regulan negativamente el macrófago y / o ayudan a terminar la inflamación (por ejemplo, IL-10, TGF $\beta$ ), (5) citocinas importante para la cicatrización de heridas (por ejemplo, EGF, PDGF, bFGF, TGF $\beta$ ). La producción de citocinas por los macrófagos puede estar desencadenada por productos microbianos tales como LPS, por la interacción con las células de tipo 1 T colaboradoras o por factores solubles, incluyendo prostaglandinas, leucotrienos y, lo más importante, otras citocinas (por ejemplo, IFN $\gamma$ ). Generalmente, los macrófagos humanos expresan CD11c, CD11b, CD18, CD26, CD31, CD32, CD36, CD45RO, CD45RB, CD63, CD68, CD71, CD74, CD87, CD88, CD101, CD119, CD121b, CD155, CD156a, CD204, CD206 CDw210, CD281, CD282, CD284, CD286 y de forma por subpoblaciones CD14, CD16, CD163, CD169 CD170 y MARCO. Los monocitos de ratón expresan adicionalmente F4 / 80 y no expresan CD11c. Los macrófagos activados expresan adicionalmente CD23, CD25, CD69 y CD105.

Una "célula dendrítica" (CD) es una célula presentadora de antígeno existente *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*, o en un huésped o sujeto, o que puede derivar de una célula madre hematopoyética, un progenitor hematopoyético o un monocito. Las células dendríticas y sus precursores se pueden aislar de varios órganos linfoides, por ejemplo, el bazo, los ganglios linfáticos, así como de médula ósea y sangre periférica. La CD tiene una morfología característica con hojas delgadas (lamelipodios) que se extienden en múltiples direcciones lejos del cuerpo de las células dendríticas. Las CD expresan de forma constitutiva las moléculas del MHC de clase I y de clase II I, que presentan antígenos peptídicos a los linfocitos T CD4 + y CD8 + respectivamente. Además, las CD de piel humana y de la mucosa también expresan la familia de genes de CD1, las moléculas relacionadas con el MHC de clase I que presentan antígenos lipídicos o glicolipídicos microbianos. La membrana de las CD también es rica en moléculas que permiten la adhesión de los linfocitos T (por ejemplo, la molécula de adhesión intercelular 1 o CD54) o que coestimulan la activación de linfocitos T, tales como B7-1 y B7-2 (también conocidos como CD80 y CD86,

respectivamente). Generalmente, las CD expresan CD85, CD180, CD187 CD205 CD281, CD282, CD284, CD286 y como subpoblaciones CD206, CD207, CD208 y CD209.

5 Por "purificado" y "aislado" se quiere decir, cuando se refiere a un polipéptido o una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas. Cuando se hace referencia a una célula o una población de células, el término significa que dicha célula o dicha población de células está presente en ausencia sustancial de otras células o población de células. El término "purificado" tal como se usa aquí significa preferentemente que hay presente al menos 75 % en peso o número, más preferentemente al menos 85 % en peso o número, aún preferentemente al menos 95 % en peso o número, y lo más preferentemente al menos 98 % en peso o número, de macromoléculas biológicas o células del mismo tipo. Una molécula de ácido nucleico "aislada", que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que es sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido sujeto; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan perjudicialmente a las características básicas de la composición.

15 Tal como se utiliza aquí, el término "sujeto" se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, tal como un roedor, por ejemplo, un ratón; un felino, un canino y un primate. Lo más preferentemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano. Lo más preferentemente, los monocitos, macrófago o células dendríticas expandidos acuerdo con el método de la invención son, por tanto, células humanas.

20 En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en el presente documento, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir la enfermedad o afección a la que se aplica tal término, o uno o más síntomas de dicha enfermedad o afección.

#### 25 Métodos para generar y expandir monocitos en cultivo a largo plazo

De hecho, los inventores han demostrado que es posible generar, mantener y expandir los monocitos en cultivo durante varios meses, mediante la inactivación de la expresión de MafB y c-Maf en dichas células.

30 Por tanto, la invención proporciona un método *ex vivo* para la expansión de monocitos, macrófagos o células dendríticas, método que comprende la inactivación de la expresión o la actividad de MafB y c-Maf en monocitos, macrófagos o células dendríticas; y la expansión de las células en presencia de M-CSF.

35 Los monocitos, macrófagos o células dendríticas que sirven como material de partida se pueden aislar de acuerdo con cualquier técnica conocida en la materia.

40 Los métodos para aislar los monocitos de partida son bien conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Fluks AJ. (1981); Hardin JA. *et al.* (1981); Harwood R. (1974); Elias JA *et al.* (1985); Brandslund I *et al.* (1982); Pertoft H *et al.* (1980); Nathanson SD *et al.* (1977); Loos H *et al.* (1976), Whal SM. *et al.* (1984). Los macrófagos y las células dendríticas pueden obtenerse *in vitro* a partir de monocitos mediante diferenciación (Stanley *et al.*, 1978, 1986; Gieseler R *et al.* 1998, Zhou *et al.* 1996; Cahpuis *et al.* 1997, Brossart *et al.* 1998, Palucka *et al.* 1998). En ratones, los macrófagos y CD de ratones pueden obtenerse a partir de suspensiones de bazo (Fukao, T., y Koyasu, S, 2000; Fukao, T., Matsuda, S., y Koyasu, S. 2000), de la cavidad peritoneal (Mishell, B.B. y Shiigi, S.M. (1980) o lo más habitualmente partir de diferentes células progenitoras de hígado o de médula ósea fetal utilizando diversos cócteles de citocinas (Ardavin *et al.*, 2001).

50 Otro método estándar para el aislamiento de monocitos, macrófagos o células dendríticas consiste en la recolección de una población de células de un sujeto y el uso de unión diferencial de anticuerpos, en el que las células de una o más determinadas etapas de diferenciación se unen mediante anticuerpos para la diferenciación de antígenos. Por tanto, se puede usar clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para separar las células deseadas que expresan antígenos de diferenciación seleccionados de la población de células aisladas. En otra realización, se pueden utilizar perlas magnéticas para aislar monocitos, macrófagos o células dendríticas a partir de una población de células (MACS). Por ejemplo, pueden utilizarse perlas magnéticas marcadas con anticuerpos específicos de tipo de células monoclonales para la selección positiva de monocitos humanos, macrófagos y células dendríticas de sangre del cordón umbilical, sangre periférica o PBMC, así como de líquidos pleural, peritoneal o sinovial, o de varios tejidos, tales como el bazo y los ganglios linfáticos. Otros métodos pueden incluir el aislamiento de monocitos mediante agotamiento de las células no monocitos (selección negativa). Por ejemplo, las células no monocitos pueden marcarse magnéticamente con un cóctel de anticuerpos monoclonales elegidos dirigidos contra CD3, CD7, CD19, CD56, CD123 y CD235a. Los kits para el aislamiento de monocitos, macrófagos y células dendríticas están disponibles comercialmente de Miltenyi Biotec (Auburn, CA, EE.UU.), Stem Cells Technologies (Vancouver, Canadá) o Dynal Bioech (Oslo, Noruega).

60 Los métodos para el aislamiento y la preparación de células dendríticas y monocitos también se describen en la solicitud de patente internacional WO2004066942 y en la patente de EE.UU. N° 6.194.204.

65



Como método alternativo, las poblaciones progenitoras de monocitos pueden obtenerse de la médula ósea o de sangre del cordón umbilical y diferenciarse en monocitos *ex vivo* mediante cultivo en M-CSF.

Como alternativa adicional, las células dendríticas y los macrófagos pueden derivar de monocitos aislados.

5 Por ejemplo, los monocitos pueden diferenciarse en macrófagos mediante cualquier técnica bien conocida en la materia. La diferenciación de monocitos en macrófagos puede ser inducida por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). En estudios recientes se ha demostrado que la óptima diferenciación inducida por CSF-M humana recombinante implica la actividad autocrina de interleucina 6 secretada (IL-6), que regula por aumento la expresión de receptores de M-CSF funcionales en los monocitos y potencia la citotoxicidad de los macrófagos, la producción de superóxido, la fagocitosis, la quimiotaxis, y la secreción secundaria de citocinas (Akira, 1996). La interacción entre IL-6 y M-CSF regula la diferenciación de monocitos en macrófagos e inhibe la diferenciación de las CD a partir de monocitos tratados con GM-CSF / IL-4 (Chomarat *et al.*, 2000, Mitani *et al.*, 2000).

15 Adicionalmente, los monocitos humanos pueden también diferenciarse *in vitro* en macrófagos mediante un cultivo de 7 días en bolsas hidrofóbicas (Chokri *et al.*, 1989). Otras técnicas también se describen en D'Onofrio C *et al.* (1983) o Gersuk G, *et al.* (2005). Otros métodos incluyen los descritos por Salahuddin *et al.* (1982) y Hashimoto *et al.* (1997).

20 Los monocitos pueden diferenciarse en células dendríticas (CD) por cualquier técnica bien conocida en la materia. Por ejemplo, el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) con interleucina-4 (IL-4) diferencia los monocitos en CD. Se han descrito múltiples métodos bien conocidos en la técnica para diferenciar los monocitos de sangre humana en células dendríticas mediante el uso de unión de GM-CSF, IL-4, y / o IFN- $\gamma$  y / o CD40 (Gieseler R *et al.* 1998, Zhou *et al.* 1996; Cahpuis *et al.* 1997, Brossart *et al.* 1998, Palucka *et al.* 1998). Las células CL, una subpoblación de CD pueden obtenerse utilizando TGF- $\beta$  además (Strobl *et al.* 1997).

Los métodos que permiten la diferenciación de monocitos en osteoclastos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo M-CSF y RANKL diferencian monocitos en CO (Yasuda, H. *et al.* 1998; Hsu, H. *et al.* 1999).

30 La diferenciación de los monocitos en macrófagos o células dendríticas puede producirse antes de la inactivación de MafB y c-Maf, o después.

Por ejemplo, en una realización particular, el método comprende:

- 35
- aislar los monocitos;
  - inactivar la expresión o actividad de MafB y c-Maf en dichos monocitos;
  - cultivar los monocitos en los que la expresión o actividad de MafB y c-Maf se ha inactivado, en condiciones que permiten la diferenciación de los monocitos en macrófagos o células dendríticas.

40 Para esta diferenciación se pueden emplear citocinas tales como M-CSF.

Dado que la ausencia de MafB y c-Maf prolonga la fase de expansión celular en respuesta a M-CSF antes de su efecto sobre la diferenciación de los macrófagos, la terminación de la fase de expansión y la diferenciación de los macrófagos puede iniciarse mediante la terminación de la inactivación de MafB y c-Maf usando cualquiera de los métodos de inactivación transitoria descritos a continuación. Como alternativa, las concentraciones de M-CSF pueden reducirse en el medio y complementarse directamente con IL-6.

La inactivación de la expresión o la actividad de c-Maf y MafB pueden conseguirse mediante cualquier técnica.

50 En una realización particular, la expresión de MafB y c-Maf puede inactivarse mediante el uso de oligonucleótidos de ARNip, oligonucleótidos antisentido o ribozimas.

Los oligonucleótidos antisentido, incluidas moléculas de ARN antisentido y moléculas de ADN antisentido, actuarían bloqueando directamente la traducción del ARNm de c-Maf y MafB mediante la unión al mismo y, por lo tanto, la prevención de la traducción de proteínas o aumentando la degradación del ARNm, disminuyendo así el nivel de las proteínas c-Maf y MafB y, por lo tanto, la actividad, en una célula. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia del transcrito del ARNm que codifica c-Maf y MafB se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante técnicas de fosfodiéster convencionales. Los métodos para utilizar técnicas antisentido para inactivar específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia se conoce son bien conocidos en la materia (por ejemplo, véase la patente de EE.UU. N° 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321; y 5.981.732). Los métodos específicos para la preparación de oligonucleótidos antisentido para c-Maf se describen en la patente de EE.UU. 6.274.338.

65 Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de c-Maf y MafB para su uso en la presente invención. La expresión de los genes C-Maf y MafB se puede reducir poniendo en

- contacto las células monocitos con un ARN pequeño bicatenario (ARNpb), o un vector o construcción que causa la producción de un ARN pequeño bicatenario, de tal manera que la expresión de c-Maf y MafB se inactiva específicamente (es decir, la ARN de interferencia o ARNi). Los métodos para la selección de un ARNpb adecuado o un vector que codifica ARNpb son bien conocidos en la técnica para genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo, véase Tuschl, T. *et al.* (1999); Elbashir, S. M. *et al.* (2001); Hannon, G.J. (2002); McManus, M.T. *et al.* (2002); Brummelkamp, T.R. *et al.* (2002); las patentes de EE.UU. N° 6.573.099 y 6.506.559; y las publicaciones de patente internacional N° WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836). Los métodos específicos para la preparación de ARNpi contra c-Maf también se describen en la patente de EE.UU. N° 6.274.338 y para MafB en (Kim *et al.* 2006).
- 10 Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de c-Maf y MafB para su uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de acción de las ribozimas implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima al ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima con motivo modificado por ingeniería en horquilla o cabeza de martillo que catalizan específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de las secuencias de ARNm de c-Maf y MafB son, por tanto, útiles dentro del alcance de la
- 15 presente invención. Inicialmente se identifican sitios específicos de escisión por ribozima dentro de cualquier potencial diana de ARN n ARN mediante barrido de la molécula diana para buscar sitios de escisión por ribozimas que normalmente incluyen las secuencias siguientes: GUA, GuU y GUC. Una vez identificadas, las cortas secuencias de ARN de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio
- 20 de escisión se pueden evaluar para determinar características estructurales previstas, tal como la estructura secundaria, que pueden convertir la diana en inoperable. La idoneidad de los candidatos diana también se puede evaluar mediante el análisis de su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios usando, por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasa.
- 25 Los oligonucleótidos antisentido, los oligonucleótidos de ARNpi y las ribozimas útiles como inhibidores de la expresión de c-Maf y MafB se pueden preparar mediante métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química tales como, por ejemplo, mediante síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Como alternativa, las moléculas de ARN anti-sentido pueden generarse mediante transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN pueden incorporarse en una
- 30 amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de la polimerasa de T7 o SP6. Se pueden introducir diversas modificaciones de los oligonucleótidos de la invención como medio de aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las posibles modificaciones incluyen, entre otros, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y / o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de enlaces fosfodiesterasa dentro de la estructura del
- 35 oligonucleótido.
- Los oligonucleótidos antisentido, los oligonucleótidos de ARNpi y las ribozimas de la invención se pueden administrar solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido antisentido, el oligonucleótido de ARNpi o el ácido nucleico de la
- 40 ribozima a los monocitos. Preferentemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con degradación reducida en relación con el grado de degradación que daría lugar a la ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagemidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de las secuencias de oligonucleótido antisentido, el oligonucleótido de ARNpi o de ácido nucleico de la ribozima.
- 45 Los métodos para la liberación de ARNpi, ribozimas y/u oligonucleótidos antisentido en monocitos son bien conocidos en la técnica e incluyen pero no se limitan a, transfección, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por fosfato cálcico o infección con un vector viral que contiene las secuencias génicas, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen numerosas técnicas en la materia para la introducción de genes extraños en células y pueden usarse de acuerdo con la presente invención, siempre que las funciones fisiológicas y para el desarrollo necesarias de las células receptoras no se alteren. La técnica puede proporcionar la transferencia estable del gen a la célula, de modo que el gen se puede expresar en la célula y es lo puede heredar y expresar su progenie celular. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las
- 50 células. Después, las células se introducen en selección para aislar las células captadas y que expresan el gen transferido. Después, las células se liberan a un sujeto. Una variación de la técnica puede proporcionar la transferencia transitoria de oligonucleótidos o genes que codifican oligonucleótidos a los monocitos para permitir la expansión temporal de monocitos *ex vivo* o *in vivo* sin modificación genética permanente.
- 55 En una realización adicional, la expresión MafB y C-Maf puede inactivarse mediante compuestos que actúan sobre la actividad del promotor, el procesamiento del ARN o la estabilidad de las proteínas.
- 60 En otra realización, la inactivación de la actividad de MafB y c-Maf se puede lograr mediante el uso de polipéptidos de MafB y c-Maf mutados que compiten con MafB y c-Maf de tipo silvestre.
- 65

Esta técnica se conoce generalmente como la técnica de "mutantes negativos dominantes". Un mutante dominante negativo es una secuencia de la región de codificación de ácido nucleico o polipéptido que se ha modificado con respecto a al menos una posición en la secuencia, con relación a la versión nativa de tipo silvestre correspondiente en una posición que cambia una posición de resto de aminoácido en una activo requerido para la actividad biológica del péptido nativo.

Por ejemplo, un mutante dominante negativo puede consistir en una molécula de MafB o c-Maf truncada desprovista de dominios efectores en N-terminal que pueden actuar como un inhibidor competitivo de MafB o c-Maf para la unión y transactivación de ADN (Kelly *et al.* 2000). La eficiencia de represión de c-Maf/MafB puede mejorarse adicionalmente mediante la fusión de los dominios represores que aumentan la función inhibitoria.

Los métodos de la invención se consiguen mediante la exposición de monocitos, macrófagos o células dendríticas a un mutante negativo dominante *in vitro*. La exposición puede estar mediada por la transfección de la célula con un polinucleótido que codifica el polipéptido mutante dominante negativo y la expresión de dicho mutante dominante negativo codificado por el polinucleótido de manera que se inactiva la actividad de MafB y/o c-Maf. Los métodos para la transfección de tales polinucleótidos pueden consistir en los descritos anteriormente.

La exposición también puede estar mediada por la exposición de monocitos y/o macrófagos y/o células dendríticas a un polipéptido mutante dominante negativo directamente, por ejemplo, poniendo en contacto la célula con dicho péptido acoplado preferentemente a un resto de internalización. Los restos de internalización adecuados se conocen en la técnica y, por ejemplo, se pueden seleccionar del grupo que consiste en una secuencia de internalización del péptido derivada de proteínas tales como polipéptido TAT del VIH o de Antennapedia u otras homeoproteínas. Como alternativa, la transferencia puede estar mediada por un liposoma y un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o ligando que se une a un receptor de superficie sobre la célula diana.

Como alternativa, los inhibidores de la actividad pueden consistir en moléculas que son inhibidores de la modificación enzimática postraducciona que regulan la actividad tales como fosforilación, acetilación, metilación, ribosilación, ubiquitinación, modificación de molécula de tipo ubiquitina (sumoilación, nedulación, etc.) o moléculas que alteran la conformación o la interacción con co activadores o correpresores.

Como alternativa adicional, los inhibidores de la actividad pueden consistir en inhibidores de la unión de ADN, dimerización o interacción con el cofactor.

Los inhibidores de la actividad pueden incluir macromoléculas o moléculas orgánicas pequeñas. La expresión "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de un tamaño comparable al de las moléculas orgánicas generalmente utilizadas en los productos farmacéuticos. La expresión excluye a las macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en cuanto al tamaño hasta aproximadamente 5.000 Da, más preferentemente hasta 2.000 Da, y lo más preferentemente hasta aproximadamente 1.000 Da.

El método como se ha descrito anteriormente comprende una etapa de expansión de las células en presencia de M-CSF.

En una realización preferida, las células se mantienen y expanden en presencia de M-CSF. El factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) es un miembro de la familia de proteínas conocidas como factores estimulantes de colonias (CSF). El M-CSF es una glicoproteína secretada o de superficie celular compuesta por dos subunidades que están unidas por un enlace disulfuro con una masa molecular total que varía de 40 a 90 kDa (Stanley ER *et al.* 1997). Se conocen varias variantes secretadas y unidas a la membrana (Pixley y Stanley, 2004). El M-CSF es producido por los macrófagos, monocitos, osteoblastos, células endoteliales y células de los tejidos articulares humanos, tales como condrocitos y fibroblastos sinoviales, en respuesta a proteínas tales como interleucina-1 o el factor alfa de necrosis tumoral. El M-CSF estimula la formación de colonias de macrófagos a partir de células madre progenitoras hematopoyéticas pluripotenciales (Stanley E. R., *et al.*, Mol. Reprod. Dev., 46:4-10 (1997)). El M-CSF es un regulador importante de la función, la activación y la supervivencia de los monocitos / macrófagos. Los M-CSF recombinante murino o humano están disponibles comercialmente de R&D SYSTEMS, ABCYS, PREPOTTECH, SIGMA o STEM CELL TECHNOLOGIES.

La concentración de M-CSF en el medio de cultivo puede ascender desde 1 ng / ml a 100 ng / ml, preferentemente 5 a 50 ng / l y de un modo particularmente preferido 10 ng/l.

Como alternativa, es posible hacer crecer las células en medio de cultivo que contiene 20 % de sobrenadante de fibroblastos L929 como fuente de M-CSF murino (disponible en la ATCC: CCL-1). Como fuente de M-CSF human se puede usar en su lugar la línea celular KPB-M15.

Los monocitos, macrófagos o células dendríticas obtenidas de este modo se pueden cultivar durante un mínimo de un mes, preferentemente al menos 4, 5, 6, 7, 8, o 12 meses.

Células deficientes en MafB/c-Maf

El método de la invención conduce a la generación de monocitos, macrófagos o células dendríticas de gran interés en el campo terapéutico.

5 Un objeto de la invención es un monocito, macrófago o célula dendrítica, que no expresa MafB y c-Maf. Preferentemente, el monocito, el macrófago o la célula dendrítica carece de los genes MafB y c-Maf.

10 Los monocitos, macrófagos o células dendríticas pueden ser de cualquier especie. Es preferentemente a de origen murino o de origen humano.

15 Cuando la célula es una célula dendrítica, puede ser útil sensibilizar la célula a los antígenos. Para ello, se pueden poner en contacto las células dendríticas con la molécula antigénica de interés o los péptidos antigénicos durante de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 5 horas ("pulso de péptido o de antígeno"). También se pueden poner en contacto las células dendríticas con células o membranas de células que expresan antígenos o péptidos antigénicos, con liposomas que contienen antígenos o péptidos antigénicos o con ARN que codifican antígenos o péptidos antigénicos.

20 Un objeto particular de la invención es, por tanto, una célula dendrítica como se ha definido anteriormente, es decir, deficientes en MafB y c-Maf, que se carga adicionalmente con una molécula antigénica.

25 La molécula antigénica puede ser cualquier molécula contra la cual se busca una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de moléculas de antígeno comprenden, por ejemplo, proteínas o péptidos vitales, proteínas o péptidos bacterianos o antígenos tumorales, tales como MART-1, MAGE, BAGE, PSA, p53, Rb, Ras, etc.

**Monocitos de ratón**

30 Otro objeto de la invención se refiere a un método para generar monocitos murinos en el que dicho método comprende las etapas que consisten en:

- i) aislar monocitos derivados de un ratón deficiente para los factores MafB y c-Maf y
- ii) cultivar dichas células en presencia de M-CSF.

35 Los embriones de ratón deficientes para MafB y c-Maf se pueden obtener a través del cruce de ratones deficientes en MafB con ratones deficientes en c-Maf. La generación de ratones deficientes en MafB se ha descrito previamente (Blanchi B. *et al.*, 2003). La generación de ratones deficientes en c-MAF también se ha descrito (Kim JL. *et al.* 1999). Los ratones con un sistema hematopoyético deficiente en MafB and c-Maf puede obtenerse mediante la reconstitución de ratones irradiados con células de hígado fetal deficientes en MafB y c-Maf. Tal método se describe en el ejemplo siguiente.

40 Otro objeto de la invención se refiere a un monocito murino deficiente en MafB/Cmaf obtenible mediante delección específica de tejido de MafB y c-Maf utilizando un sistema de recombinasa loxP / Cre.

45 Otro objeto de la invención se refiere a un monocito murino deficiente en MafB/c-Maf obtenible mediante el método como se ha descrito anteriormente.

Los macrófagos, o células dendríticas, murinos deficientes en MafB/c-Maf se pueden obtener a través de las técnicas de diferenciación como se ha descrito anteriormente.

**Terapia celular:**

50 De acuerdo con la presente invención, los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas se pueden generar con facilidad y eficacia *in vitro*. La capacidad para obtener un gran número de monocitos, macrófagos y células dendríticas expandidos *in vitro* abre nuevas oportunidades para el campo terapéutico.

55 Por tanto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un monocito, macrófago o célula dendrítica como se ha definido anteriormente, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende la célula dendrítica como se ha definido anteriormente, cargada con una molécula antigénica, para su uso como una vacuna.

65 El sistema de fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos) representa un órgano distribuido responsable de la homeostasia dentro del huésped. Dicho sistema está involucrado en cada proceso de la enfermedad en el que hay una lesión tisular o trastorno metabólico persistente. Los macrófagos y monocitos participan en la inflamación tanto aguda como crónica, y estimulan la reparación a través de la eliminación de las células muertas y la fibrina mediante fagocitosis y fibrinólisis, inducen el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis) y modulan la

invasión y la producción de fibroblastos de la matriz extracelular. Producen mediadores que movilizan las respuestas sistémicas del huésped, incluida fiebre, liberan y catabolizan las hormonas de tensión y otras, aumentan la actividad metabólica de otras células e influyen en el flujo de sangre a los tejidos y la permeabilidad capilar. Los propios macrófagos muestran una heterogeneidad considerable en sus funciones, que a menudo expresan activadores así como inhibidores de una propiedad, por ejemplo, la actividad proteolítica, o la producción de citocinas pro y antiinflamatorias, en función de la evolución de una respuesta del huésped particular.

Por lo tanto, se describe un método para tratar a un sujeto afectado con una enfermedad que resulta de una deficiencia en el compartimiento de monocitos, cuyo método comprende administrar dicho sujeto con monocitos, macrófagos o células dendríticas, en el que la expresión o la actividad de MafB and c-Maf se inactivan, preferentemente con monocitos, macrófagos deficientes o células dendríticas deficientes en MafB y c-Maf.

Un objeto adicional de la invención es el uso de un monocito, macrófago o célula dendrítica como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en un cáncer, inmunodeficiencias agudas o adquiridas, lesión crónica o aguda, heridas, enfermedades degenerativas, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias crónicas, aterosclerosis, poli- y osteoartritis, osteoporosis, enfermedades infecciosas (por ejemplo, infecciones por virus o bacterias), y enfermedades metabólicas.

Las inmunodeficiencias incluyen las adquiridas o las de origen genético, o las que son el resultado de la radioterapia / quimioterapia. Particularmente se contempla el SIDA. Asimismo, la invención ofrece la posibilidad para el desarrollo de inmunoterapias de cáncer específicas de antígeno.

Los macrófagos acuerdo con el invención pueden ser útiles para el tratamiento de infecciones por el VIH. La disfunción de los neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares [PMNL]) y las células macrofágicas se produce, de hecho, como consecuencia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). Los macrófagos contribuyen a la resolución de la inflamación temprana mediante ingestión de cuerpos apoptóticos de PMNL. Un estudio reciente sugiere que la alteración de la fagocitosis por los macrófagos de los cuerpos apoptóticos de PMNL puede contribuir a la persistencia del estado inflamatorio en sujetos infectados por el VIH, especialmente durante las infecciones oportunistas que suelen verse más favorecidas por la actividad fagocítica defectuosa (Torre D *et al.* 2002). Por lo tanto, los métodos para generar macrófagos como se ha descrito anteriormente pueden ser útiles para el tratamiento de sujetos infectados con el VIH.

Los pacientes en tratamiento con quimioterapia con agentes anticancerosos tales como ciclofosfamida (CP) experimentan una fuerte reducción del tamaño de las poblaciones de macrófagos tisulares que acompaña a la leucopenia sanguínea. Por tanto, estos pacientes son especialmente susceptibles a las infecciones oportunistas, incluyendo la neumonía por bacterias gramnegativas. Tales infecciones oportunistas son una causa común de muerte en los pacientes con cáncer que se someten a quimioterapia (Santosuosso M, *et al.* 2002). Por lo tanto, los métodos para generar macrófagos como se ha descrito anteriormente pueden ser útiles para el tratamiento de sujetos que han sido sometidos a quimioterapia.

Los macrófagos pueden inhibir la apoptosis de las células precursoras en un contacto entre células y pueden servir como soporte de estroma para el injerto celular eficiente para la reparación de tejidos (véase, por ejemplo, el documento WO2005014016). En particular, los macrófagos podrían inhibir la apoptosis de las células precursoras miogénicas. Por lo tanto, los métodos para generar macrófagos como se ha descrito anteriormente pueden ser útiles para el tratamiento de lesiones tales como lesiones óseas o musculares, posiblemente como resultado de una enfermedad o una lesión. Puede ser, por ejemplo, una fractura ósea, o un desgarro muscular. En una realización más particular de la invención, dicha lesión es una lesión o daño cardíaco. En particular, puede ser, por ejemplo, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, trombosis coronaria, miocardiopatía dilatada o cualquier disfunción de los cardiomiocitos con posterioridad a, o como resultado de, cualquier defecto genético. Por lo tanto, los métodos para generar los macrófagos como se ha descrito anteriormente pueden ser útiles para el tratamiento de insuficiencias cardíacas agudas con mal pronóstico a pesar del progreso en los tratamientos, tales como miocardiopatía infiltrativa, o miocardiopatía por toxicidad por antraciclinas o miocardiopatía secundaria a la infección por VIH.

Los métodos para generar los macrófagos como se ha descrito anteriormente pueden ser también útiles para el tratamiento de lesiones de la médula espinal. Una terapia para la lesión medular completa (LMC) puede, de hecho, consistir en injertos autólogos de macrófagos que se han instruido en un fenotipo de cicatrización de heridas mediante coincubación con tejido de la piel (Schwartz M *et al.* 2006).

Los macrófagos son esenciales para la cicatrización de heridas y, por lo tanto, los métodos para generar los macrófagos como se ha descrito anteriormente pueden ser útiles para mejorar la cicatrización de heridas y / o la reparación de daños en los tejidos. El proceso de cicatrización de la herida tiene, de hecho, 3 fases. Durante la fase inflamatoria, los macrófagos secretan numerosas enzimas y citocinas. Estas incluyen colagenasas, que limpian la herida de residuos, interleucinas y factor de necrosis tumoral (TNF), que estimulan los fibroblastos (para producir colágeno) y estimulan la angiogénesis; y el factor transformante de crecimiento  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), que, en la curación de

heridas de la piel, estimula los queratinocitos. Esta etapa marca la transición al proceso de reconstrucción de tejidos, es decir, la fase proliferativa.

Los macrófagos desempeñan un papel importante en la enfermedad inflamatoria y autoinmune crónica y, por lo general, se activan o hiperactivan de una manera específica en estas condiciones. Los monocitos pueden amplificarse mediante el método descrito para modificarse genéticamente, tratarse farmacológicamente o, como alternativa, activarse o estimularse mediante moléculas bioactivas, tales como citocinas o factores de crecimiento para presentar un fenotipo deseable antes de la introducción en un sujeto para competir con y suplantar macrófagos con la actividad indeseada.

El cáncer es la segunda causa de muerte en la mayoría de los países desarrollados, representando aproximadamente 150.000 y 550.000 muertes al año en Francia y EE.UU., respectivamente. A pesar de que más de la mitad de todos los casos de cáncer se puede curar, el paciente de cáncer medio no puede curarse con cirugía o radioterapia, sino que tiene una posibilidad menor del 10 % de curarse mediante cualquier otro tratamiento (A. Grillo-Lopez, 2003). Durante mucho tiempo se ha planteado la hipótesis, y ahora se reconoce, de que el sistema inmunológico desempeña un papel en la vigilancia del cáncer y en la prevención de tumores.

Los macrófagos son un componente principal del infiltrado de leucocitos de los tumores y se ha demostrado que tienen efectos tanto positivos como negativos sobre la formación y la progresión del tumor, donde el resultado final depende en gran medida de la polarización dependiente del microentorno de los macrófagos asociados a los tumores (MAT). Por tanto, los macrófagos amplificados y modificados podrían ser terapéuticamente útiles para llevar los macrófagos del perfil de polarización deseado o que llevan las construcciones génicas terapéuticas o reactivos al sitio del tumor (Bingle *et al.*, 2002) (Mantovani *et al.*, 2002). Adicionalmente, las células dendríticas (CD) sensibilizan a los linfocitos T vírgenes para que se conviertan en células efectoras capaces de proporcionar protección a largo plazo contra la recurrencia del tumor. Por lo tanto, la terapia celular basada en estos dos tipos de células aparece como una herramienta prometedora para el tratamiento de pacientes con cáncer. Por lo tanto, los métodos para la generación de macrófagos y / o células dendríticas como se ha descrito anteriormente pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades cancerosas.

Puede inducirse la maduración de las células dendríticas (CD en maduración) a través de un corto tratamiento con un extracto bacteriano e interferón-gamma. Adicionalmente, se ha demostrado que la vacunación terapéutica contra los tumores proporciona protección a largo plazo en modelos animales. Los lisados tumorales (o línea de células tumorales) constituyen una fuente atractiva de múltiples antígenos tumorales para desencadenar las respuestas de linfocitos T CD8 y CD4. Por lo tanto, los pulsos en las células dendríticas con tales antígenos tumorales representan una herramienta para el tratamiento del cáncer.

Por lo tanto, los métodos de la invención pueden ser útiles para preparar composiciones farmacéuticas que comprenden macrófagos y / o células dendríticas para el tratamiento de cáncer. El cáncer incluye los carcinomas de mama, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar y conductos biliares, intestino delgado, riñón, vejiga, urotelio, tracto genital femenino, (incluyendo el cuello uterino, el útero y los ovarios, así como coriocarcinoma y la enfermedad trofoblástica gestacional), del tracto genital masculino (incluyendo tumores de próstata, vesículas seminales, testículos y de células germinales), glándulas endocrinas (incluyendo las glándulas tiroideas, suprarrenal e hipófisis), y de piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo los derivados de huesos y tejidos óseos, así como el sarcoma de Kaposi) y tumores de cerebro, nervios, ojos, tales como astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, schwannomas y meningiomas y los tumores derivados de neoplasias malignas hematopoyéticas tales como leucemias, así tanto los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin.

En el tratamiento del cáncer, por ejemplo, las células dendríticas pueden pulsarse con antígenos tumorales y administrarse a un paciente a tratar, por ejemplo tumores establecidos, o para prevenir la formación de tumores, como se ha tratado anteriormente.

En otra realización, una célula dendrítica de la invención puede fusionarse a una célula de cáncer y, por lo tanto, se puede administrar al paciente, en el que la célula dendrítica fusionada presentará, en su papel como célula presentadora de antígeno, el antígeno al sistema inmunológico. Las células dendríticas se pueden fusionar con otras células, por ejemplo células cancerosas, por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los métodos para la fusión de células dendríticas con células cancerosas, así como métodos para su administración a los animales se han descrito en Gong *et al.* (Nat. Med. 3 (5): 558–561 (1997)) y Guo *et al.* (Science 263: 518–520 (1994)). La célula de cáncer puede ser cualquier tipo de célula de cáncer objetivo en un paciente, por ejemplo las células cancerosas de mama, hígado, piel, boca, páncreas, próstata, tracto urinario, por ejemplo, vejiga, útero, ovario, cerebro, ganglios linfáticos, vías respiratorias, por ejemplo laringe, esófago y pulmón, tracto gastrointestinal, por ejemplo estómago, intestinos grueso y delgado, colon o recto, hueso, sangre, tiroideas, y testículos, o cualquier línea celular cancerosa conocida en la técnica que es adecuada para la fusión con otras células, por ejemplo células dendríticas.

Se pueden aplicar protocolos de vacunación similares a enfermedades infecciosas mediante la carga de las células dendríticas con el antígeno patógeno (viral, bacteriano o parasitario).

En una realización preferida, los monocitos, macrófagos, células dendríticas se obtienen directamente del sujeto al que se administran. En ese caso, el trasplante es autólogo. Sin embargo, en otra realización, el trasplante puede ser también no autólogo. Para el trasplante no autólogo, el receptor recibe, preferentemente, un fármaco inmunosupresor para reducir el riesgo de rechazo de la célula trasplantada. Los métodos de administración de las células de acuerdo con el invención incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal y epidural. Las células se pueden administrar por cualquier vía conveniente y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La vía de administración es, preferentemente, intravenosa o intradérmica. El título de los monocitos y/o macrófagos y/o células dendríticas trasplantadas que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos *in vitro* pueden emplearse, opcionalmente, para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno y se decidirá de acuerdo con el juicio del médico encargado y las circunstancias de cada sujeto.

#### 15 **Composiciones farmacéuticas:**

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un monocito y / o macrófago y / o célula dendrítica producidos de acuerdo con la invención, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una célula como se ha descrito anteriormente se entiende una cantidad suficiente de dicha célula para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en una relación beneficio / riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. No obstante, se entenderá que el uso diario total de composiciones de la presente invención será decidido por el médico responsable dentro del alcance de un juicio médico sólido. El nivel de dosis específico terapéuticamente eficaz para cualquier paciente dependerá de diversos factores, incluyendo el trastorno que se esté tratando y su gravedad, la actividad del compuesto específico usado, la composición específica usada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente o sujeto; la hora de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico usado; la duración del tratamiento, los fármacos usados en combinación o coincidiendo con las células específicas usadas y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable incluye, entre otros, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol y combinaciones de los mismos. El vehículo y la composición pueden ser estériles. La formulación debe adaptarse al modo de administración. La composición, si se desea, puede también contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o tamponadores del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, o emulsión. En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocaina, para aliviar el dolor en el punto de la inyección.

#### 40 **Métodos para la modificación por ingeniería de células de la invención:**

Los monocitos, macrófagos y células dendríticas de la invención pueden diseñarse genéticamente además de manera que dichas células expresen un ácido nucleico terapéutico de interés, que codifica una proteína de interés.

Los genes adecuados de interés incluyen factores de crecimiento. Por ejemplo, las células de la invención pueden modificarse genéticamente para producir productos génicos beneficiosos en el trasplante de las células manipuladas genéticamente a un sujeto. Tales productos génicos incluyen, pero no se limitan a, factores antiinflamatorios, por ejemplo, anti-TNF, anti-IL-1, anti-IL-6, anti-IL-2, etc. Como alternativa, las células de la invención pueden manipularse genéticamente para "desactivar" la expresión de MHC con el fin de disminuir el riesgo de rechazo.

Se ha demostrado que los macrófagos se fusionan con células musculares o hepatocitos y pueden corregir un defecto genético en estas células (Camargo *et al.*, 2003) (Camargo *et al.*, 2004) (Willenbring *et al.*, 2004). Las células de la invención pueden, por tanto, manipularse también para expresar una o varias copias de variantes normales o hiperactivos de genes que están mutados en trastornos genéticos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, deficiencias enzimáticas en el hígado o la distrofina en la distrofia muscular de Duchenne.

Los macrófagos son un componente principal del infiltrado tumoral. Los genes adecuados de interés para su expresión por las células de la invención pueden, por lo tanto, ser también genes que llevan actividad antitumoral.

Además, las células de la invención pueden manipularse para inactivar la expresión de genes mediante ARNip o antisentido o genes que codifican ARNip o antisentido que se introducen de forma estable o transitoria en las células. Los objetivos para la inactivación incluyen, pero no se limitan a, citocinas inflamatorias, proteasas, factores de transcripción y enzimas que afectan a las vías inflamatorias.

Además, las células de la invención pueden manipularse genéticamente para expresar un factor de crecimiento que estimula la diferenciación y / o la proliferación.

5 Los monocitos, macrófagos y células dendríticas de la invención pueden manipularse adicionalmente de manera que dichas células lleven una molécula de interés.

10 La molécula adecuada (o incluso genes) de interés como inhibidores de la proteasa o desactivación de proteasas, factores de transcripción o versiones dominantes de los mismos para inactivar globalmente la expresión de mediadores inflamatorios, citocinas, quimiocinas, proteasas o para inducir globalmente mediadores antiinflamatorios, citocinas, quimiocinas e inhibidores de la proteasa. Los genes de interés pueden codificar citocinas y enzimas que afectan selectivamente a la polarización de M1 / M2 de los macrófagos (Il-4, Il-10, Il-13, TGF), o citocinas que inactivan la diferenciación de los osteoclastos (tales como RANKL anti, OPN), o factores de crecimiento e inhibidores de proteasa que estimulan la cicatrización de heridas (tales como PDGF, EGF, SLPI), o péptidos antimicrobianos.

15 La entrega de dichos genes puede realizarse por cualquier método bien conocido en la técnica como se ha descrito anteriormente.

#### **Medicina regenerativa:**

20 Debido al suministro inadecuado de donantes de órganos, se necesitan desesperadamente alternativas a los aloinjertos. Las terapias de reemplazo celular pueden proporcionar una alternativa prometedora al trasplante de hígado, páncreas o de células de los islotes. Tales terapias también pueden proporcionar opciones de tratamiento en los sistemas de órganos en los que el trasplante no es posible o no está indicado. Recientemente se ha demostrado que no sólo las células madre o progenitoras, sino también las células mielo-monocíticas comprometidas, incluyendo monocitos maduros, los macrófagos proporcionan un potencial significativo para la terapia celular dirigida y bien tolerada destinada a la regeneración de órganos, especialmente en el hígado y el páncreas. Se ha demostrado que tales células mielo-monocíticas maduras de origen tanto murino como humano pueden contribuir significativamente al tejido hepático y de los islotes beta pancreáticos en diferentes modelos de ratón y realizar funciones específicas de tejido en estos órganos (Camargo, F.D., Green, R., *et al*, 2003; Willenbring, Bailey *et al*. 2004; Ruhnke, Ungefroren *et al*. 2005). Aunque el mecanismo de esto no está del todo claro, estas observaciones indican que la administración de los macrófagos directamente en el órgano dañado o el trasplante sistémica de sus progenitores proliferativos representa una estrategia terapéutica atractiva y poco invasiva. La perspectiva de una aplicación clínica de este enfoque, sin embargo, se ve obstaculizada por la dificultad para amplificar un número suficiente de monocitos en cultivo.

35 Los monocitos, macrófagos o células dendríticas obtenidos por el método de la invención se pueden usar en medicina regenerativa, por ejemplo, para la administración directamente a un órgano dañado o trasplante sistémico.

#### **Métodos de detección selectiva:**

40 En ciertas enfermedades, se puede desear destruir o reducir el número de monocitos, macrófagos o células dendríticas, o tener como objetivo y tratar monocitos, macrófagos o células dendríticas infectados. En tales casos, se desea desarrollar medicamentos dirigidos a monocitos, macrófagos, o células dendríticas.

45 El método de la invención para la generación de monocitos, macrófagos o células dendríticas puede ser útil para la detección selectiva de tales fármacos.

50 Un método general para la detección selectiva de fármacos, cuyo método comprende poner en contacto un monocito, un macrófago o célula dendrítica como se ha definido anteriormente, con un compuesto candidato, y determinar la capacidad de dicho compuesto para unirse y, opcionalmente, destruir, dicha célula, para inhibir su replicación o para modificar su comportamiento. En particular, el compuesto candidato puede cambiar el comportamiento de la célula (por ejemplo, su capacidad para diferenciarse) en respuesta a un estímulo particular, por ejemplo, una citocina.

55 Por ejemplo, varios patógenos son capaces de alterar el proceso de fagocitosis mediante una serie de estratagemas usando una vía vacuolar para la invasión y la supervivencia, incluso en los macrófagos. Se conocen otros ejemplos por los cuales los organismos evaden la ingestión (micoplasma), destruyen las opsoninas enzimáticamente, inhiben la fusión y la acidificación (micobacterias) y reclutan nuevas membranas (Legionella), así como otros orgánulos. Trypanosoma cruzi y Candida albicans reclutan rápidamente lisosomas, tal vez para promover su propia diferenciación. Leishmania se multiplica libremente dentro de los fagolisosomas, mientras que Listeria monocytogenes interrumpe las membranas lisosomales y se escapa en el citoplasma, donde inicia la polimerización de actina para el movimiento intracelular y la propagación intercelular. Las bacterias del género Brucella son patógenos intracelulares capaces de sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos de huéspedes mamíferos. Este patógeno utiliza varias estrategias para eludir los mecanismos de defensa de los macrófagos y generar un orgánulo permisivo para la replicación. Finalmente, el patógeno intracelular facultativo *Salmonella enterica* desencadena la muerte celular programada en los macrófagos.



Por lo tanto, los métodos para generar los macrófagos como se ha descrito anteriormente pueden ser útiles para la detección selectiva de fármacos contra patógenos tales como *Mycoplasma*, *Mycobacteria*, *Legionella*, *Trypanosoma*, *Leishmanias*, *Listeria*, *Brucella* o *Salmonella*.

- 5 El macrófago también contribuye a la infección inicial, la diseminación y la persistencia del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) en el cuerpo. Los factores conocidos que influyen sobre la infección de los macrófagos por diferentes cepas de VIH incluyen CD4 y correceptores de quimiocinas para la entrada viral.

10 Por lo tanto, los métodos para generar macrófagos como se ha descrito anteriormente pueden ser útiles para la detección selectiva de fármacos contra infecciones por VIH.

15 Los métodos de la invención pueden ser también útiles para la detección selectiva de fármacos que inhiben una respuesta inflamatoria en los macrófagos para su uso contra enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas (tales como poliartritis, enfermedad de Crohn o esclerosis múltiple) o cáncer con una fuerte contribución de los macrófagos asociados a tumores inflamatorios.

Los métodos para generar macrófagos como se ha descrito anteriormente también pueden ser útiles para la detección selectiva de fármacos que estimulan la cicatrización de heridas o la reducción de la cicatrización.

20 Los métodos para generar macrófagos como se ha descrito anteriormente pueden ser útiles para la detección selectiva de fármacos inhibidores de la diferenciación de osteoclastos para su uso en la osteoartritis y la osteoporosis.

**Descripción detallada de las figuras:**

25 **Figura 1:** 20.000 células hepáticas fetales de embriones E14.5 salvajes (barras abiertas) o con doble deficiencia en MafB/c-Maf (barras rellenas) se incubaron en medio semisólido que contiene una mezcla de citocinas de SCF, GM-CSF, IL-3, IL-6, y EPO recombinante **(A)** o 10 ng / ml de M-CSF recombinante **(B)**, GM-CSF **(C)**, G-CSF **(D)** o IL-3 **(E)** solamente. Las colonias se puntuaron después de 12 días y se indica el número promedio de CFU-M, CFU-E, CFU-GEMM, CFU-GM y CFU-G. Se realizaron experimentos por duplicado y las barras de error indican el error estándar de la media de tres embriones individuales de cada genotipo.

30 **Figura 2:** 10.000 células de hígado fetal de embriones E14.5 salvajes (rombos) o con doble deficiencia en MafB/c-Maf (cuadrados) se incubaron en medio semisólido que contiene 10ng/ml de M-CSF, GM-CSF, o IL-3 recombinante, como se ha indicado. Las colonias se puntuaron cada 8 días, se lavaron del medio y se volvieron a sembrar a la misma concentración y en las mismas condiciones. Los ensayos se realizaron por duplicado y dos experimentos independientes mostraron resultados equivalentes.

35 **Figura 3:** Las células de hígado fetal de embriones E14.5 salvajes, deficientes en MafB, deficientes en c-Maf o con doble deficiencia en MafB/c-Maf como se ha indicado se diferenciaron en monocitos / macrófagos durante 9 días en medio acondicionado de células L como fuente de M-CSF, se simularon durante 24 horas con la concentración indicada de M-CSF recombinante y se analizaron para determinar la proliferación mediante la supervisión de las células en la fase S después de 18 horas de incorporación de BrdU. Se indica el índice de proliferación como la razón de la proliferación en los cultivos estimulados y no estimulados. Las barras de error indican el error estándar de la media de muestras por triplicado y dos experimentos independientes mostraron resultados equivalentes.

40 **Figura 4:** Se obtuvieron tres cultivos de monocitos independientes de ensayos de colonias de M-CSF de células de hígado fetal de E14.5 con doble deficiencia en MafB / c-Maf E14.5 mediante el lavado de las células del medio semisólido y su incubación en el medio acondicionado de células L como fuente de M-CSF. El medio se cambió cada 4 días y los cultivos se contaron y pasaron en confluencia. El gráfico muestra el número total calculado de las células derivadas después del número indicado de pases.

45 **Figura 5 Caracterización fenotípica y funcional de cultivos de monocitos con deficiencia doble en MafB/c-Maf:** **A.** Tinción de Giemsa de un citospín de cultivos de monocitos con doble deficiencia en MafB/c-Maf que muestran una morfología homogénea de monocitos / macrófagos. **B.** Microfotografía de contraste de fase de cultivos de monocitos con doble deficiencia en MafB/c-Maf **C./D.** Perfiles de FACS de cultivos de monocitos con doble deficiencia en MafB/c-Maf teñidos para antígenos de linaje mielóide (C) u otros linajes (D). Las células eran casi 100 % positivas para antígenos de monocitos / macrófagos (Mac-1, F4 / 80 y FcγRII / III), pero negativas para el marcador granulocítico Gr-1, los marcadores progenitores c-kit y CD34, el marcador eritroide Ter119, y los marcadores T-linfoideos CD3 y CD4. También fueron negativos para el marcador CD19 de linfocitos B (no mostrado). **E.** Los cultivos de monocitos con doble deficiencia en MafB/c-Maf (células DKO) se incubaron con perlas de látex recubiertas con PE y se analizaron por FACS para perlas fluorescentes ingeridas como una medida de la fagocitosis. Para comparar la actividad fagocítica de la línea celular de macrófagos RAW 267 se muestra como control positivo. El control negativo muestra células no incubadas con perlas.

50 **Figura 6:** Obtención de cultivos de monocitos de sangre deficiente en MafB/c-Maf de ratones envejecidos. **A.-D.** 100.000 glóbulos blancos (WBC) de sangre periférica de ratones de 22 meses de edad se reconstituyeron con células de hígado fetal salvajes o con doble deficiencia de MafB / c-Maf a los 2 meses de edad se incubaron en medio semisólido que contiene 100 ng / ml de M-CSF recombinante y se analizó para determinar la formación de colonias después de 12 días. Las microfotografías de colonias en muestras salvajes (A) o deficientes en MafB / c-

Maf (B) y el gráfico (C) que muestra el número total de colonias de muestras salvajes o deficientes MafB/c–Maf. Las barras de error indican el error estándar de la media de muestras duplicadas de dos ratones individuales de cada genotipo. Una ampliación de una colonia individual en B se muestra en el panel de D. **E., F.** 100,000 WBC de sangre periférica de ratones salvajes o deficientes en MafB/c–Maf reconstituidos se cultivaron en medio acondicionado de células L como fuente de M-CSF, se contaron y se pasaron cada 8 días. Una microfotografía de contraste de fase de un cultivo de monocitos deficientes en MafB/c–Maf se muestra en E y el número total calculado de las células en cada número de pase indicado se muestra en F.

#### Ejemplo:

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Ratones:** Previamente, los inventores han descrito la generación de ratones deficientes en MafB en un fondo de 129Sv-C57BL / 6 y su genotipado mediante PCR con cebadores para *mafB* y *gfp*, sustituyendo *mafB* en el alelo defectivo (Blanchi *et al.* 2003). La generación de ratones deficientes en c–Maf también se ha descrito (Kim *et al.* 1999). Los ratones MafB+/- y c–Maf+/- se cruzaron para obtener ratones MafB;c–Maf+/-;+/-, que se inter cruzaron para obtener embriones MafB;c–Maf-/-;-/-. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices institucionales usando ratones mantenidos en condiciones libres de patógenos específicas.

**Preparación de células de hígado fetal:** Los embriones se recogieron asépticamente el día embrionario E14.5. Se preparó una única suspensión de células en medio de células primarias (IMDM, 20 % de FCS, 1 % de penicilina / estreptomycin) del hígado de cada embrión y se almacenaron a 4 °C hasta que el genotipo se confirmó mediante PCR.

**Ensayos de colonias:**  $2 \times 10^4$  células de hígado fetal se sembraron en medio semisólido que contiene MethoCult M3232 que contiene una mezcla de citocinas (SCF, Epo, GM–CSF, Il–3, Il–6) o MethoCult M3234 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) suplementado con 10 ng/ml de rM–CSF murino, 10 ng/ml de rGM–CSF murino, 10 ng/ml de rG–CSF murino o 10 ng/ml de rIl–3 murino (Pepro Tech Incorporation) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, 300 ml de medio que contiene células se mezcló con 300 ml de medio que contiene citocinas se añadieron a 1.400 ml de medio de metilcelulosa y se mezclaron vigorosamente antes de sembrar 900 ml de cada una de esta mezcla en placas de 35 mm por duplicado. El tamaño y el número total de colonias con más de 16 células se puntuaron en placas por duplicado después de 4, 6, 9 y 12 días.

**Ensayos de resiembra:**  $1 \times 10^4$  células de hígado fetal por placa se sembraron en medio semisólido que contenía metilcelulosa (M3234, Stem Cells Technologies) suplementado con 50 ng/ml de rM–CSF murino, rGM–CSF murino o rIl–3 murino (allPepro Tech Incorporation). Después de 8 días se contaron las colonias y las células se lavaron varias veces en un medio para eliminar la metilcelulosa hasta que se obtuvo una suspensión de células individuales.  $1 \times 10^4$  células se volvieron a sembrar en las mismas condiciones y la formación de colonias se puntuó de nuevo tras el día 8. La repetición de la siembra se repitió tres veces.

**Crecimiento de células deficientes en MafB/c–Maf en cultivo líquido:** Después de la cuarta siembra en placas, solo las células deficientes en MafB/c–Maf en condiciones de M-CSF daban colonias todavía. Estas se lavaron repetidamente en medio para eliminar la metilcelulosa y se suspendieron en cultivo líquido a  $1 \times 10^4$ /100 ml de DMEM / 10 % de FCS inactivado por calor / 1 % de penicilina / estreptomycin y 1 % de Na-piruvato, suplementado con 20 % de sobrenadante de células L como fuente de M-CSF. El cultivo en M-CSF murino recombinante dio lugar a características de crecimiento idénticas. Las células se sometieron a un cambio de medio parcial cada 4 días y se dividieron a 1:4 con un cambio de medio completo cada 8 días.

**Producción de sobrenadante de células L:** Fibroblastos L929 (disponibles de la ATCC: CCL–1) se utilizaron como fuente de medio acondicionado de M-CSF murino. Las células L se cultivaron y mantuvieron en medio de cultivo de células L (DMEM, 10 % de FCS HI, 1 % de Na Pyruvate, 1 % de penicilina / estreptomycin). Para la producción de sobrenadante, las células se cultivaron a una confluencia del 70 % y el medio se cambió a al medio del sobrenadante de las células L (IMDM, HI 2 % de FCS, 1 % de piruvato Na, y 1 % de penicilina / estreptomycin). El sobrenadante se recogió después de 5 días y se añadió más medio durante otros 5 días. Después de recoger el segundo sobrenadante, ambos se combinaron y se filtraron a través de un filtro de 0,22 mm y se almacenaron en alícuotas a -20 °C.

**Análisis FACS:** Para la tinción de anticuerpos, las células se resuspendieron en medio FACS filtrado (0,2 % de FCS y, si es necesario, anticuerpo de bloqueo FcγII/III en PBS) a una concentración de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células / ml seguido de incubación a 4 °C durante 30 minutos con anticuerpos monoclonales de fluorocromo adecuadamente diluidos. Los anticuerpos marcados con fluorocromo directamente contra antígenos de ratón se adquirieron en BD o en eBiosciences. Después de lavar dos veces con PBS, las células se analizaron en una máquina FACSCalibur o FACS Canto (Becton–Dickinson, San Jose, CA). Los datos se analizaron con el software Cell Quest® (Becton–Dickinson) o Flowjo®.

**Ensayo de fagocitosis:** Las perlas fluorescentes (Molecular Probes, 1  $\mu$ M, F-8851) se lavaron una vez en PBS estéril, se resuspendieron en DMEM / 10 % de FCS y se sometieron a ultrasonidos en 10 intervalos de 10 segundos cada uno. 25  $\mu$ l de la solución de esferas se incubaron en macrófagos en placas de 24 pocillos durante 2 horas. Las células se lavaron abundantemente con PBS, se fijaron con PFA al 1 % y se analizaron mediante citometría de flujo

5

**Ratones de médula ósea reconstituida:** Para los experimentos de reconstitución, una única suspensión de células de células de hígado fetal de los mismos genotipos (MafB;c-Maf<sup>-/-</sup>; -/- or WT) se combinó, se filtró a través de una gasa de 100  $\mu$ m, se lavó una vez con 1x HBSS o PBS y se resuspendió en PBS o HBSS para inyección. 1x10<sup>6</sup> células FL en 200  $\mu$ l de PBS/HBSS se inyectaron en la vena de la cola de ratones receptores Ly5.1 de la misma edad y sexo irradiados letalmente (900 a 1000 rad). La irradiación se realizó por lo menos 4 horas antes de la transferencia celular y los ratones se mantuvieron con antibióticos en el agua de bebida durante 4 semanas después del trasplante.

10

**Ensayo de proliferación:** Las células hepáticas fetales se diferenciaron durante 9 días en medio que contiene M-CSF, se lavaron en PBS y se sembraron en una placa de fondo plano de 96 pocillos a 20.000 células / pocillo en 200  $\mu$ l de medio que contiene las concentraciones indicadas de M-CSF recombinante. Después de 36 horas se añadió BrdU a una concentración final de 10 nM y 18 horas más tarde las células se fijaron y se marcaron con anticuerpo anti-BrdU siguiendo el protocolo de un kit colorimétrico con BrdU en ELISA de proliferación celular (Roche n° de cat. 1 647 229). Brevemente, los pocillos se lavaron 5 veces con solución de lavado y se incubaron con 100  $\mu$ l de reactivo de detección. Después de 20 minutos, la reacción de ELISA se detuvo añadiendo 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y el producto de color se midió en un espectrofotómetro a 450 nm.

15

20

## RESULTADOS

25

**Las células hepáticas fetales con doble deficiencia en MafB, c-Maf tienen un mayor potencial formador de colonias monocíticas:** Ya que la deficiencia en MAFB es letal para neonatos, los inventores analizaron el efecto de la doble deficiencia en MafB/c-Maf en la hematopoyesis en el hígado fetal E14.5. La tinción en FACS para marcadores de superficie específicos de linaje no reveló anomalías de distribución linaje en hígado fetal E14.5 deficiente en MafB/c-Maf. Para cuantificar el número de células que podrían proliferar en respuesta a citocinas específicas, las células de control deficientes en MafB/c-Maf o salvajes (WT) de embriones E14.5 se cultivaron en medio de metilcelulosa con una mezcla de citocinas (Il-3, Il-6, GM-CSF, SCF y Epo; fig.1A) o citocinas mieloides individuales M-CSF, GM-CSF, G-CSF o Il-3, fig.1 B-E) o colonias de monocitos (UFC-M) se incrementaron significativamente para la deficiencia en MafB / c-Maf en comparación con células de hígado fetal salvajes en todas las condiciones que apoyan el crecimiento monocítico, (M-CSF, GM-CSF, IL-3 y condiciones mixtas), mientras que otra tipos de colonias se mantuvieron en el intervalo normal. Adicionalmente, tal aumento en las colonias monocíticas no se vio en las células de hígado fetal deficientes en MafB or c-Maf individuales (no mostrado). Esto indicó que la pérdida combinada de MafB y c-Maf resultó en un aumento del número de células que dan lugar a colonias de monocitos en respuesta a citocinas mieloides.

30

35

40

**Las células monocíticas con deficiencia doble en MafB, c-Maf tienen una mayor capacidad de autorrenovación en M-CSF:** Para analizar más a fondo, si las células monocíticas deficientes en MafB/c-Maf mantienen o no su potencial de autorrenovación, los inventores han analizado la capacidad para repetir la siembra de las células de las colonias de UFC-M deficientes en MafB/c-Maf. En tales ensayos, las colonias se lavaron hacia fuera de Methocell, se disociaron y se volvieron a sembrar en las mismas condiciones de citocinas en cultivos de Methocell frescos.

45

Como se muestra en la figura 2, en condiciones de GM-CSF y Il-3, las colonias se pudieron volver a sembrar a partir de ensayos Wu y con deficiencia en MafB / c-Maf 3 veces, pero no se formaron colonias después de la cuarta repetición de la siembra. Por el contrario se observaron grandes diferencias entre las células WT y las deficientes en MafB/c-Maf en condiciones de M-CSF. Mientras que las colonias WT ya habían desaparecido después de la segunda repetición de la siembra, se formaban continuamente células deficientes en MafB/c-Maf en número de colonias creciente en M-CSF hasta la cuarta repetición de la siembra. Esto indicó que las células monolíticas derivadas de hígado fetal deficiente en MafB/c-Maf tenían la capacidad de autorrenovarse y expandirse específicamente en M-CSF.

50

55

**Los monocitos deficientes en MafB/c-Maf muestran un incremento de la proliferación en respuesta a M-CSF:** Para analizar si este potencial aumento de la autorrenovación se debía a un aumento de la proliferación dependiente de M-CSF de los monocitos deficientes en MafB/c-Maf, los inventores diferenciaron las células de hígado fetal de embriones E14.5 salvajes, deficientes en MafB, deficientes en c-Maf o deficientes en MafB/c-Maf en monocitos durante 9 días y después se estimularon estas células con diferentes concentraciones de M-CSF durante 36 horas. Los inventores vigilaron su tasa de síntesis de ADN en respuesta a M-CSF y establecieron su índice de proliferación mediante la comparación de la tasa de incorporación de BrdU después de 18 horas en células de estimuladas y no estimuladas. Como se muestra en la fig. 3, los monocitos deficientes en MafB o deficientes en c-Maf mostraron casi ninguna respuesta proliferativa a M-CSF. Por el contrario, los monocitos deficientes en MafB/c-Maf mostraron un incremento drástico de la proliferación en respuesta a M-CSF: Esto indicó que la continua

60

65

expansión observada de monocitos deficientes en MafB / c-Maf se debe a un fuerte aumento de la capacidad de proliferar en respuesta a M-CSF.

**Los monocitos deficientes en MafB/c-Maf se pueden mantener en cultivo de M-CSF durante varios meses y se expanden en más de  $10^{10}$  veces:**

A fin de analizar aún más durante cuanto tiempo se podía mantener esta autorrenovación potenciada y la capacidad de proliferación dependiente de M-CSF de los monocitos deficientes en MafB / c-MAF, se tomaron las UFC-M de las colonias monocíticas en cultivo líquido y se cultivaron en presencia de medio que contiene M-CSF. Bajo estas condiciones, las células continuaron proliferando y expandiéndose en cultivo. Cuatro poblaciones de células se obtuvieron de forma independiente a partir de diferentes embriones y ensayos de resiembra y se pudieron mantener en cultivo que contiene M-CSF durante al menos 15 pases o 4 meses sin ningún signo de crecimiento lento o crisis. Dos poblaciones entraron en crisis en el pase 16, pero los otros dos no mostraron ningún signo de la crisis hasta el pase 24 o a los 6,5 meses y una de ellas se ha mantenido continuamente en cultivo durante 18 meses sin crisis o ralentización del crecimiento. Las curvas de crecimiento hasta el pase 15 de tres de estas poblaciones (denominadas DKO 42, 46 y 56) se muestran en la Fig.4. Las células congeladas en cada pase se pudieron suspender fácilmente en el cultivo de nuevo. Las poblaciones derivadas también pudieron clonarse y se han establecido al menos 6 líneas independientes derivadas de células individuales de poblaciones de pase temprano.

Se calculó el número total de células que se pueden obtener sin crisis en el cultivo a largo plazo para representar un factor de amplificación de al menos  $10^{10}$ . Para ilustrar este enorme factor de amplificación, los monocitos presentes en un típico volumen de un análisis de sangre de rutina (aproximadamente 5 ml) serían teóricamente suficientes para generar los monocitos totales de 10 millones de personas, si se amplificaron de forma similar.

**Las células monocíticas deficientes en c-Maf/MafB en los cultivos de M-CSF tienen un fenotipo de monocitos/macrófagos normal:**

Las células deficientes en c-Maf / MafB cultivadas de forma continua en presencia de M-CSF durante periodos prolongados de tiempo mantienen un fenotipo de monocitos / macrófagos. Como se muestra en la figura 5<sup>a</sup>, las células deficientes en c-Maf/MafB mostraron una morfología típica de los macrófagos en la tinción de Giemsa / May-Gruenwald. Su aparición en cultivo con contraste de fase fue menos aplanada que en los cultivos de macrófagos típicos, lo que es probable que sea una indicación de su continua proliferación (figura 5A). El análisis FACS mostró también que la población total de células deficientes en c-Maf/MafB expresaba los marcadores de monocitos / macrófagos típicos F4/80, Mac-1 (CD11b), M-CSFR (CD115) y FcγRII/III (CD16/CD32) pero ninguno de los marcadores de linfocitos T seleccionados (CD3, CD4, CD8), linfocitos B (CD19), eritroides (Ter-119), granulocíticos (Gr-1) (fig.5C,D). En los cultivos que contienen cantidades bajas de M-CSF, pero no cantidades altas de M-CSF, se observó que se CD11c estaba regulado por aumento, lo que sugiere que estas células tienen el potencial de diferenciación de las CD, que puede suprimirse con la presencia continua de M-CSF. Adicionalmente, las células deficientes en c-Maf/MafB exhibieron una función típica de monocitos / macrófagos, ya que fueron capaces de fagocitar cuantitativamente grandes cantidades de perlas de látex fluorescente en un grado igual o superior a las de los macrófagos primarios salvajes o líneas celulares de macrófagos (fig.5E).

En conjunto, estas observaciones indicaron que a pesar de su continua proliferación en el cultivo, todas las células mantuvieron un fenotipo maduro de monocitos / macrófagos totalmente diferenciados y funcionales.

**Los monocitos y macrófagos deficientes en c-Maf/MafB no desarrollan neoplasias malignas *in vivo*:**

El aumento de la eficiencia de la repetición de la siembra *in vitro* se observa también para las células transformadas malignas que tienen potencial leucémico *in vivo*. Para controlar esta posibilidad, los inventores reconstituyeron los ratones receptores irradiados letalmente con células de hígado fetal deficientes en c-Maf / MafB y se observó a los ratones reconstituidos durante largos periodos de tiempo para analizar si desarrollarían los trastornos de leucemia mieloide o mieloproliferativa. Hasta el momento se reconstituyó a 8 ratones a las 6-8 semanas de edad y se analizaron a los 8, 11, 14 y 22 meses de edad, el último de los cuales está cerca de la vida útil máxima de un ratón. Durante todo el periodo de observación, los ratones parecían normales y no mostraron ningún signo de malestar. El análisis de sangre regular hasta los 22 meses mostró recuentos y morfología de glóbulos blancos normales sin indicación de blastos o células anormales. Mediante análisis FACS, los monocitos tenían un fenotipo CD115+, CD11b+, F4/80+ normal y no se detectó aumento del número de células que expresan marcadores de superficie de las células progenitoras o inmaduras. Tras el sacrificio, la disección tampoco reveló signos macroscópicos de leucemia, el bazo presentaba un tamaño normal y un aspecto saludable. El análisis FACS y la tinción histológica de los citoespín de la sangre, la médula ósea, el bazo y el exudado peritoneal no reveló ninguna indicación de leucemia o enfermedad mielo-proliferativa. No se observó un aumento del número de células con un perfil de marcador de superficie progenitor (CMP, GMP) o células con morfología de blastos o inmadura en la médula ósea. Esto indica que el los monocitos deficientes en c-Maf/MafB y las células derivadas de monocitos pueden contribuir con normalidad y a largo plazo al sistema hematopoyético sin causar patologías hematológicas.

**Los monocitos deficientes en c-Maf/MafB de ratones envejecidos se pueden expandir en cultivo de M-CSF:**

Los inventores querían analizar si los monocitos / macrófagos deficientes en c-Maf/MafB con capacidad ampliada de autorrenovación no pudieron solo derivar de células embrionarias, sino también de las células diferenciadas terminalmente de adultos o incluso animales de edad avanzada. Por lo tanto, los inventores han analizado si los monocitos de ratones reconstituidos con un sistema hematopoyético deficiente en MafB/c-Maf podrían expandirse

en el cultivo de M-CSF y dar lugar a colonias en medio methocell que contiene M-CSF. Como se muestra en la figura 6, los monocitos de ratones reconstituidos salvajes no pudieron dar lugar a colonias en cultivo Methocell de M-CSF, como cabía esperar. Por el contrario, los glóbulos blancos deficientes en c-Maf/MafB dieron lugar a UFC-M de colonias de monocitos y podían expandirse en el cultivo de M-CSF. En conjunto, esto demostró que el fenotipo observado no es específico de las células embrionarias, pero que la deficiencia de MafB/c-Maf confiere una capacidad de autorrenovación extendida a los monocitos terminalmente diferenciados a partir de ratones adultos de edad avanzada.

**Los monocitos/macrófagos deficientes en c-Maf/MafB se expandieron en cultivo doméstico a los tejidos periféricos tras inyección intravenosa:** Para analizar si en el cultivo de cultura las células c-Maf / MafB expandidas que emigrarían de la circulación en los tejidos periféricos, como los monocitos normales, los inventores reinyectaron  $1 \times 10^6$  monocitos/macrófagos deficientes en c-Maf/MafB Ly5.2 + por vía intravenosa en huéspedes Ly5.1 + y se analizó su presencia en la circulación y en los tejidos periféricos después de 4, 24 y 48 horas. Los inventores observaron que las células donantes CD11b + eran detectables en el peritoneo a partir de 4 horas en adelante y en el bazo de 24 horas en adelante. Esto indicó que las células c-Maf/MafB expandidas en cultivo podrían contribuir a las poblaciones de células derivadas de monocitos *in vivo*.

#### Referencias:

- 20 Akira S, Kishimoto T. Role of interleukin-6 in macrophage function. *Curr Opin Hematol*. 1996 Jan;3(1):87-93.
- Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med*. 1993;178:669-674
- 25 Ardavin, C., Martínez del Hoyo, G., Martín, P., Anjuere, F., Arias, C. F., Marin, A. R., Ruiz, S., Parrillas, V., and Hernandez, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* 22, 691-700.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-252
- 30 Becker, S., Warren, M.K. and Haskill, S. (1987) Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J Immunol*, 139, 3703-3709.
- Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196, 254-265.
- 35 Blanchi B, Kelly LM, Viemari JC, Lafon I, Burnet H, Bevengut M, Tillmanns S, Daniel L, Graf T, Hilaire G, Sieweke MH. MafB deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth. *Nat Neurosci*. 2003 Oct;6(10):1091-100.
- 40 Bloom ET BJ, Kawakami K. Monocyte-mediated augmentation of human natural killer cell activity: Conditions, monocyte and effector cell characteristics. *J Immunol*. 1986;137:172
- Blusse van Oud Alblas A, van der Linden-Schrever B, van Furth R. Origin and kinetics of pulmonary macrophages during an inflammatory reaction induced by intravenous administration of heat-killed bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med*. 1981;154:235-252
- 45 Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42
- 50 Brandslund I, Rasmussen JM, Fisker D, Svehag SE. Separation of human peripheral blood monocytes on continuous density gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (Percoll). *J Immunol Methods*. 1982;48(2):199-211.
- 55 Brossart P, Grunebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Mohle R, Kanz L, Brugger W. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1998 Dec 1;92(11):4238-47
- 60 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002 Apr 19;296(5567):550-3. Epub 2002 Mar 21.
- Camargo, F.D., Green, R., Capetanaki, Y., Jackson, K.A. & Goodell, M.A. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* 9, 1520-7 (2003).
- 65 Camargo, F.D., Finegold, M., and Goodell, M.A. (2004). Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J Clin Invest* 113, 1266-1270.

- Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K, Caligiuri MA. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest.* 1995;96:2578–2582
- 5 Carter P, Bedouelle H, Winter G. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res.* 1985 Jun 25;13(12):4431–43.
- Chang ZL WT, Herberman RB. Immunoregulatory role of in vitro differentiated macrophages on human natural killer (NK)-cell activity. *Cell Immunol.* 1990;125:183
- 10 Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol.* 1997;27:431–441.
- Chokri M, Freudenberg M, Galanos C, Poindron P, Bartholeyns J. Antitumoral effects of lipopolysaccharides, tumor necrosis factor, interferon and activated macrophages: synergism and tissue distribution. *Anticancer Res.* 1989 Jul-Aug;9(4):1185–90.
- 15 Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 2000 Dec;1(6):510–4.
- 20 Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA, VanDeusen JB, Waite RE, Liu Y, Aguila HL, Caligiuri MA. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood.* 2002;100:3633–3638
- Cordes SP, Barsh GS. The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell.* 1994 Dec 16;79(6):1025–34.
- 25 Crofton RW, Diesselhoff-den Dulk MM, van Furth R. The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J Exp Med.* 1978;148:1–17
- 30 Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect.* 2002;4:903–914
- D'Onofrio C, Paradisi F. In-vitro differentiation of human monocytes into mature macrophages during long-term cultures. *Immunobiology.* 1983 Feb;164(1):13–22.
- 35 Eichmann, A., Grapin-Botton, A., Kelly, L., Graf, T., Le Douarin, N.M., and Sieweke, M. (1997). The expression pattern of the *mafB/kr* gene in birds and mice reveals that the kreisler phenotype does not represent a null mutant. *Mech Dev* 65, 111–122.
- 40 Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 2001 Dec 3;20(23):6877–88.
- Elias JA, Chien P, Gustilo KM, Schreiber AD. Differential interleukin-1 elaboration by density-defined human monocyte subpopulations. *Blood.* 1985 Aug;66(2):298–301.
- 45 Erickson-Miller CL, Brennan JK, Abboud CN. Examination of survival, proliferation and cell surface antigen expression of human monocytes exposed to macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). *Int J Cell Cloning.* 1990 Sep;8(5):346–56.
- 50 Ferlazzo G, Morandi B, D'Agostino A, Meazza R, Melioli G, Moretta A, Moretta L. The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2003;33:306–313
- Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med.* 2002;195:343–351
- 55 Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med.* 1999;5:405–411.
- 60 Fluks AJ. Three-step isolation of human blood monocytes using discontinuous density gradients of Percoll. *J Immunol Methods.* 1981;41(2):225–33.
- Foey AD, Feldmann M, Brennan FM. Route of monocyte differentiation determines their cytokine production profile: CD40 ligation induces interleukin 10 expression. *Cytokine.* 2000;12:1496–1505
- 65

- Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*. 2006 Jan 6;311(5757):83–7. Epub 2005 Dec 1. Erratum in: *Science*. 2006 Mar 3;311(5765):1242.
- 5 Fukao, T., and Koyasu, S. (2000). Expression of functional IL-2 receptors on mature splenic dendritic cells. *Eur J Immunol* 30, 1453–1457.
- Fukao, T., Matsuda, S., and Koyasu, S. (2000). Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN- $\gamma$  production by dendritic cells. *J Immunol* 164, 64–71.
- 10 Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, Vitelli L, Barberi T, Testa U, Lyman S, *et al.* Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood*. 1995;86:1661–1670
- 15 Geissler K, Tricot G, Grimm G, Siostrzonek P, Broxmeyer H. Recombinant human colony stimulating factor–granulocyte/macrophage and –granulocyte, but not macrophage induce the development of a respiratory burst in primary human myeloid leukemic cells in vitro. *Blut*. 1989 Sep;59(3):226–30.
- Geissmann, F. (2007). The origin of dendritic cells. *Nat Immunol* 8, 558–560.
- 20 Gerosa F, Baldani–Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*. 2002;195:327–333
- Gersuk G, Hiraoka A, Marr KA. Human monocytes differentiate into macrophages under the influence of human KPB–M15 conditioned medium. *J Immunol Methods*. 2005 Apr;299(1–2):99–106.
- 25 Gieseler R, Heise D, Soruri A, Schwartz P, Peters JH. In–vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes. *Dev Immunol*. 1998;6(1–2):25–39.
- 30 Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005 Dec;5(12):953–64
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jan;3(1):23–35
- 35 Goud TJ, Schotte C, van Furth R. Identification and characterization of the monoblast in mononuclear phagocyte colonies grown in vitro. *J Exp Med*. 1975;142:1180–1199
- Grillo–Lopez AJ. Cancer therapies crisis in the USA. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2003 Oct;3(5):579–82.
- 40 Hale TK, Myers C, Maitra R, Kolzau T, Nishizawa M, Braithwaite AW. Maf transcriptionally activates the mouse p53 promoter and causes a p53–dependent cell death. *J Biol Chem*. 2000 Jun 16;275(24):17991–9.
- Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):244–51. Review.
- 45 Hardin JA, Downs JT. Isolation of human monocytes on re–orienting gradients of Percoll. *J Immunol Methods*. 1981;40(1):1–6.
- Harwood R. Cell separation by gradient centrifugation. *Int Rev Cytol*. 1974;38(0):369–403.
- 50 Hashimoto S, Yamada M, Motoyoshi K, Akagawa KS. Enhancement of macrophage colony–stimulating factor–induced growth and differentiation of human monocytes by interleukin–10. *Blood*. 1997 Jan 1;89(1):315–21.
- Hedge, S.P., Kumar, A., Kurschner, C., and Shapiro, L.H. (1998). c–Maf interacts with c–Myb to regulate transcription of an early myeloid gene during differentiation. *Mol Cell Biol* 18, 2729–2737.
- 55 Hegde, S.P., Zhao, J., Ashmun, R.A., and Shapiro, L.H. (1999). c–Maf induces monocytic differentiation and apoptosis in bipotent myeloid progenitors. *Blood* 94, 1578–1589.
- Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. 1987;235:473–476
- 60 Hsu, H. *et al.* Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 3540–3545 (1999).
- 65 Kataoka K, Noda M, Nishizawa M. Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP–1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol*. 1994 Jan;14(1):700–12.

- Kawauchi S, Takahashi S, Nakajima O, Ogino H, Morita M, Nishizawa M, Yasuda K, Yamamoto M. Regulation of lens fiber cell differentiation by transcription factor c-Maf. *J Biol Chem*. 1999 Jul 2;274(27):19254–60.
- 5 Kerppola TK, Curran T. Maf and Nrl can bind to AP-1 sites and form heterodimers with Fos and Jun. *Oncogene*. 1994 Mar;9(3):675–84.
- Kim JI, Ho IC, Grusby MJ, Glimcher LH. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity*. 1999 Jun;10(6):745–51.
- 10 Kim, K., Kim, J. H., Lee, J., Jin, H. M., Kook, H., Kim, K. K., Lee, S. Y., and Kim, N. (2006). MafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation. *Blood*.
- Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL, Dustin ML, Staunton DE, Springer TA. The leukocyte integrins. *Adv Immunol*. 1989;46:149–182
- 15 Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:759–806
- 20 Kuijpers T. Leukocyte Membrane Adhesion Proteins LFA-1, CR3 and p150,95: a Review of Functional and Regulatory Aspects. *Res Immunol*. 1989;140:461–486
- Kurschner C, Morgan JI. The maf proto-oncogene stimulates transcription from multiple sites in a promoter that directs Purkinje neuron-specific gene expression. *Mol Cell Biol*. 1995 Jan;15(1):246–54.
- 25 Loos H, Blok-Schut B, van Doom R, Hoksbergen R, Brutel de la Riviere A, Meerhof L. A method for the recognition and separation of human blood monocytes on density gradients. *Blood*. 1976 Nov;48(5):731–42.
- 30 Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23, 549–555.
- Matsuoka TA, Zhao L, Artner I, Jarrett HW, Friedman D, Means A, Stein R. Members of the large Maf transcription family regulate insulin gene transcription in islet beta cells. *Mol Cell Biol*. 2003 Sep;23(17):6049–62.
- 35 Mellman I. Fc Receptor Function in Macrophages and Lymphocytes. In: van Furth R ed. *Mononuclear Phagocytes*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1992
- 40 Metcalf D. The colony stimulating factors: discovery, development, and clinical applications. In: Fortner JG RJ ed. *Accomplishments in cancer research*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1990
- Miller JS, Oelkers S, Verfaillie C, McGlave P. Role of monocytes in the expansion of human activated natural killer cells. *Blood*. 1992;80:2221–2229
- 45 Mitani H, Katayama N, Araki H, Ohishi K, Kobayashi K, Suzuki H, Nishii K, Masuya M, Yasukawa K, Minami N, Shiku H. Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br J Haematol*. 2000 May;109(2):288–95.
- Naeim F. *Pathology of Bone Marrow*. In: Mitchell CW ed (ed second). Baltimore: Williams & Wilkins; 1998
- 50 Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*. 1987;79:319–326
- Nathanson SD, Zamfirescu PL, Drew SI, Wilbur S. Two-step separation of human peripheral blood monocytes on discontinuous density gradients of colloidal silica-polyvinylpyrrolidone. *J Immunol Methods*. 1977;18(3–4):225–34.
- 55 Nishizawa M, Kataoka K, Goto N, Fujiwara KT, Kawai S. v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989 Oct;86(20):7711–5.
- 60 Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol*. 1998 May 1;160(9):4587–95.
- Parry SL, Sebbag M, Feldmann M, Brennan FM. Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production: role of T cell membrane TNF-alpha. *J Immunol*. 1997;158:3673–3681
- 65



- Pertoft H, Johnsson A, Warmegard B, Seljelid R. Separation of human monocytes on density gradients of Percoll. *J Immunol Methods*. 1980;33(3):221–9.
- 5 Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med*. 2002;195:335–341
- Pixley, F.J. and Stanley, E.R. (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol*, 14, 628–638.
- 10 Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*. 1990;50:537–544
- Reis e Sousa C. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity*. 2001;14:495–498
- 15 Ring BZ, Cordes SP, Overbeek PA, Barsh GS. Regulation of mouse lens fiber cell development and differentiation by the Maf gene. *Development*. 2000 Jan;127(2):307–17.
- Ruhnke, M., H. Ungefroren, *et al.* (2005). "Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells." *Gastroenterology* 128(7): 1774–1786.
- 20 Salahuddin SZ, Markham PD, Gallo RC. Establishment of long-term monocyte suspension cultures from normal human peripheral blood. *J Exp Med*. 1982 Jun 1;155(6):1842–57.
- Sallusto, F., A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Exp. Med.* 179:1109–18
- 25 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (2001)
- Santosuosso M, Divangahi M, Zganiacz A, Xing Z Reduced tissue macrophage population in the lung by anticancer agent cyclophosphamide: restoration by local granulocyte macrophage-colony-stimulating factor gene transfer. *Blood*. 2002 Feb 15;99(4):1246–52.
- 30 Schwartz M, Yoles E. Immune-based therapy for spinal cord repair: autologous macrophages and beyond. *J Neurotrauma*. 2006 Mar-Apr;23(3-4):360–70.
- 35 Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med*. 2005;56:509–38
- Shu U, Kiniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, Hakimi J, Gately M, Delespesse G. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol*. 1995;25:1125–1128
- 40 Shum DT, Galsworthy SB. Stimulation of monocyte production by an endogenous mediator induced by a component from *Listeria monocytogenes*. *Immunology*. 1982;46:343–351
- 45 Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, Yeung YG. Biology and action of colony-stimulating factor-1. *Mol Reprod Dev*. 1997 Jan;46(1):4–10.
- Stanley, E.R. (1986) Action of the colony-stimulating factor, CSF-1. *Ciba Found Symp*, 118, 29–41.
- 50 Stanley, E.R., Chen, D.M. and Lin, H.S. (1978) Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature*, 274, 168–170.
- Stevenson, H.C., Miller, P., Akiyama, Y., Favilla, T., Beman, J.A., Herberman, R., Stull, H., Thurman, G., Maluish, A. and Oldham, R. (1983) A system for obtaining large numbers of cryopreserved human monocytes purified by leukapheresis and counter-current centrifugation elutriation (CCE). *J Immunol Methods*, 62, 353–363.
- 55 Strobl, H., C. Bello-Fernandez, E. Riedl, W.F. Pickl, O. Majdic, S.D. Lyman, W. Knapp. 1997. *flt3* ligand in cooperation with transforming growth factor- $\beta$ 1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allow single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. *Blood* 90:1425–34
- 60 Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 2003 Aug;4(8):638–49
- Tillmanns, S., Otto, C., Jaffray, E., Duroure, C., Bakri, Y., Vanhille, L., Sarrazin, S., Hay, R.T., and Sieweke, M.H. (2007). SUMO-modification regulates MafB driven macrophage differentiation by enabling Myb dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 27, 5554–5564.
- 65

- Torre D, Gennero L, Baccino FM, Speranza F, Biondi G, Pugliese A. Impaired macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Sep;9(5):983–6.
- 5 Trinchieri G. Interleukin–12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:133–146
- Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:3725–3729
- 10 Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double–stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 1999 Dec 15;13(24):3191–7.
- 15 van Furth R. Production and Migration of Monocytes and Kinetics of Macrophages. In: van Furth R ed. *Mononuclear Phagocytes.* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1992
- van Waarde D, Hulsing–Hesselink E, Sandkuyl LA, van Furth R. Humoral regulation of monocytopoiesis during the early phase of an inflammatory reaction caused by particulate substances. *Blood.* 1977;50:141–154
- 20 Vey E, Zhang JH, Dayer JM. IFN–gamma and 1,25(OH)2D3 induce on THP–1 cells distinct patterns of cell surface antigen expression, cytokine production, and responsiveness to contact with activated T cells. *J Immunol.* 1992;149:2040–2046
- 25 Wagner DH, Jr., Stout RD, Suttles J. Role of the CD40–CD40 ligand interaction in CD4+ T cell contact–dependent activation of monocyte interleukin–1 synthesis. *Eur J Immunol.* 1994;24:3148–3154
- Wahl SM, Katona IM, Stadler BM, Wilder RL, Hessel WE, Wahl LM. Isolation of human mononuclear cell subsets by counterflow centrifugal elutriation (CCE). II. Functional properties of B–lymphocyte–, T–lymphocyte–, and monocyte–enriched fractions. *Cell Immunol.* 1984 May;85(2):384–95.
- 30 Wang PW, Eisenbart JD, Cordes SP, Barsh GS, Stoffel M, Le Beau MM. Human KRML (MAFB): cDNA cloning, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. *Genomics.* 1999 Aug 1;59(3):275–81.
- 35 Willems R, Henckaerts E, Lenjou M, Nijs G, Rodrigus I, Moulijn AC, Slegers H, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Establishment of serum–free pre–colony forming unit assays for differentiation of primitive hematopoietic progenitors: serum induces early macrophage differentiation and inhibits early erythroid differentiation of CD34++CD38–cells. *Ann Hematol.* 2001;80:17–25
- 40 Willenbring, H., A. S. Bailey, *et al.* (2004). "Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver." *Nature Medicine* 10(7): 744–748. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990;249:1431–1433.
- 45 Wu, L., and Liu, Y.J. (2007). Development of dendritic–cell lineages. *Immunity* 26, 741–750.
- Yang Y, Cvekl A. Tissue–specific regulation of the mouse alphaA–crystallin gene in lens via recruitment of Pax6 and c–Maf to its promoter. *J Mol Biol.* 2005 Aug 19;351 (3):453–69.
- 50 Yasuda, H. *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesisinhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 3597–3602 (1998).
- Yoshida T, Ohkumo T, Ishibashi S, Yasuda K. The 5'–AT–rich half–site of Maf recognition element: a functional target for bZIP transcription factor Maf. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jun 21;33(11):3465–78. Print 2005.
- 55 Zhou, L.J., T.F. Tedder. 1996. CD14' blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83' dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2588–92
- Zoller MJ, Smith M. Oligonucleotide–directed mutagenesis using M13–derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Res.* 1982 Oct 25;10(20):6487–500.
- 60

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *ex vivo* para la expansión de monocitos, macrófagos o células dendríticas, método que comprende la inactivación de la expresión o la actividad de MafB y c-Maf en monocitos, macrófagos o células dendríticas; y la expansión de las células en presencia de M-CSF.  
5
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la expresión de MafB y c-Maf se inhibe mediante el uso de oligonucleótido de ARNiP, oligonucleótido antisentido o ribozimas.
- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad de MafB y c-Maf se inhibe mediante el uso de polipéptidos de MafB y c-Maf mutados que compiten con MafB y c-Maf de tipo silvestre.
4. Un monocito, macrófago o célula dendrítica, que no expresa MafB y c-Maf o en el que la expresión o la actividad de MafB y c-Maf se inactivan de manera que dicho monocito, macrófago o célula dendrítica se pueden expandir en presencia de M-CSF.  
15
5. Un monocito, macrófago o célula dendrítica de la reivindicación 4, que carece de los genes MafB y c-Maf.
6. Un macrófago de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, que se selecciona del grupo que consiste en microglía, histiocitos, células de Hofbauer, células mesangiales, células de Kupffer, macrófagos peritoneales, macrófagos alveolares, macrófagos epidérmicos o dérmicos, macrófagos de la zona marginal, macrófagos metalófilos, macrófagos de la pulpa roja, macrófagos de la pulpa blanca y osteoclastos.  
20
7. Una célula dendrítica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, que está cargada adicionalmente con una molécula antigénica.  
25
8. Una composición farmacéutica que comprende un monocito, macrófago o célula dendrítica de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende la célula dendrítica de la reivindicación 7, cargada con una molécula antigénica, para su uso como una vacuna.
10. Un monocito, macrófago o célula dendrítica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en un cáncer, inmunodeficiencias agudas o adquiridas, lesión crónica o aguda, heridas, enfermedades degenerativas, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias crónicas, aterosclerosis, poli y osteoartritis, osteoporosis, enfermedades infecciosas y enfermedades metabólicas.  
35
11. Un monocito, macrófago o célula dendrítica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para su uso en medicina regenerativa.  
40
12. Uso de un monocito, macrófago o célula dendrítica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para la detección selectiva de fármacos.
- 45 13. Un método para la generación y la expansión de monocitos murinos, método que comprende las etapas que consisten en:
- i) aislar monocitos derivados de un ratón que no expresa MafB y c-Maf, y  
ii) cultivar dichos monocitos en presencia de M-CSF.  
50

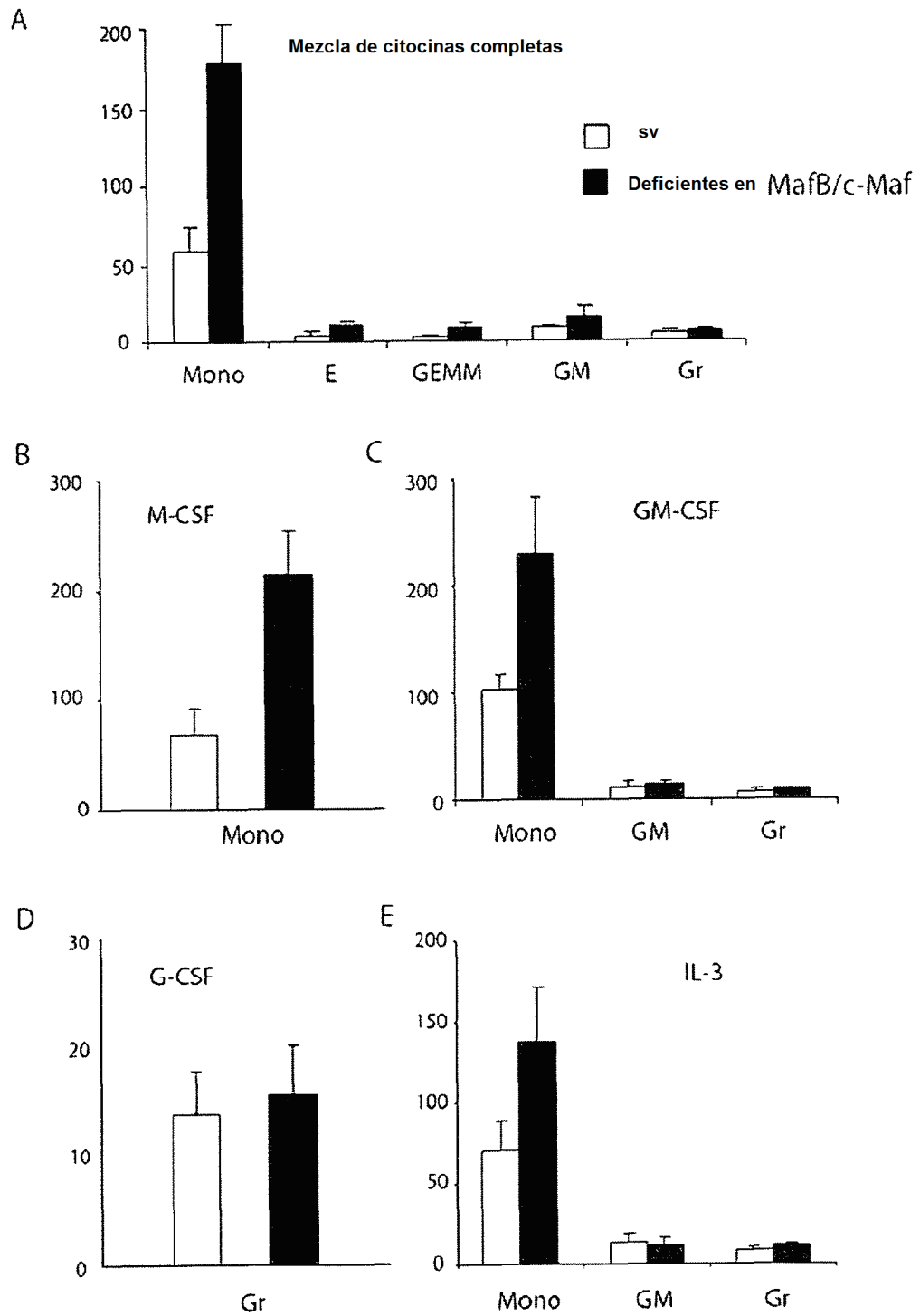
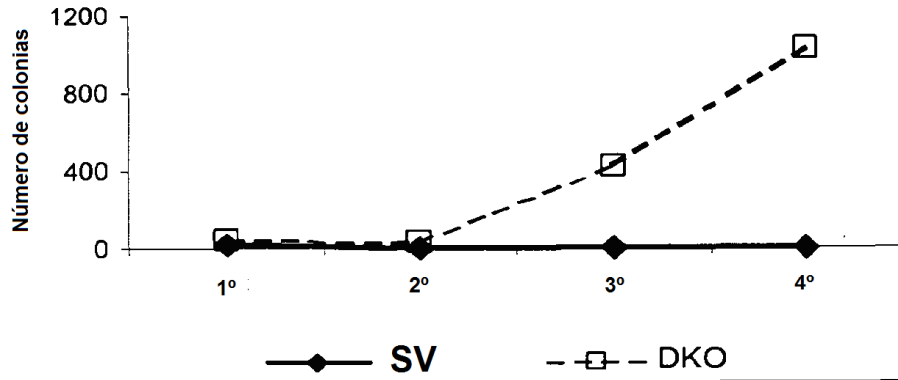
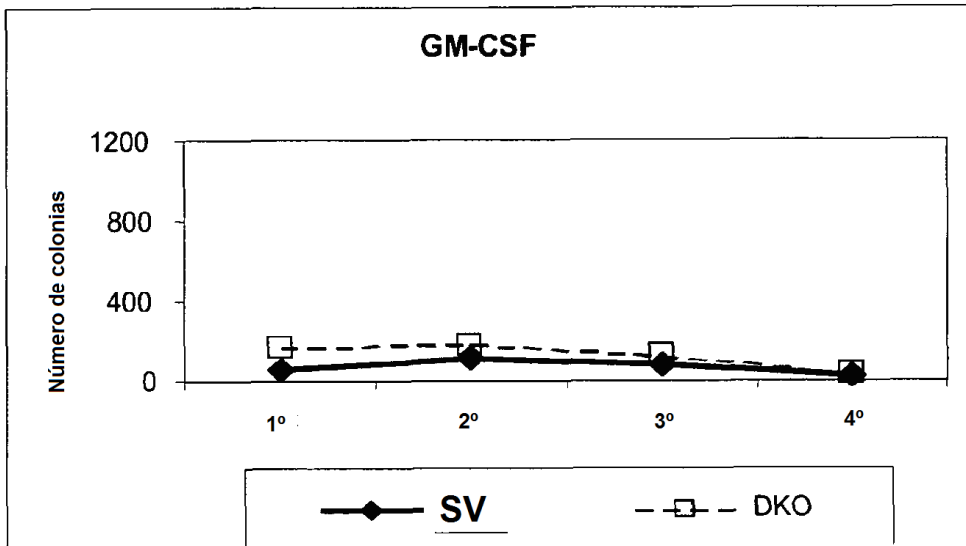


Figura 1

**M-CSF**



**GM-CSF**



**IL-3**

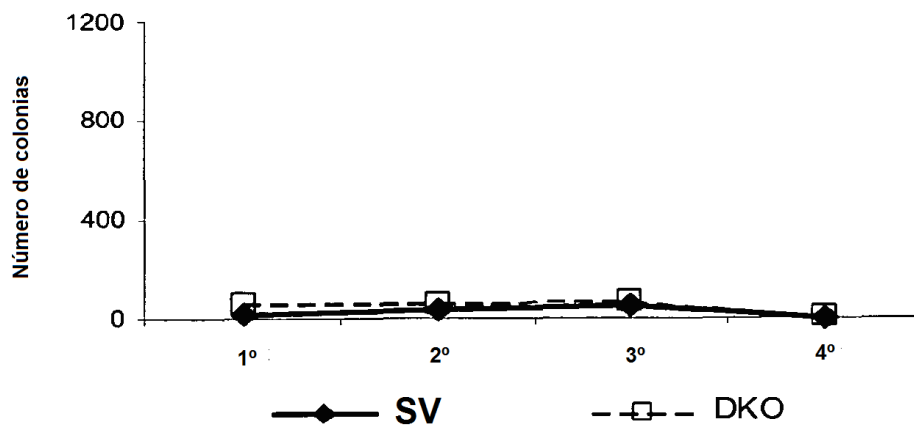


Figura 2

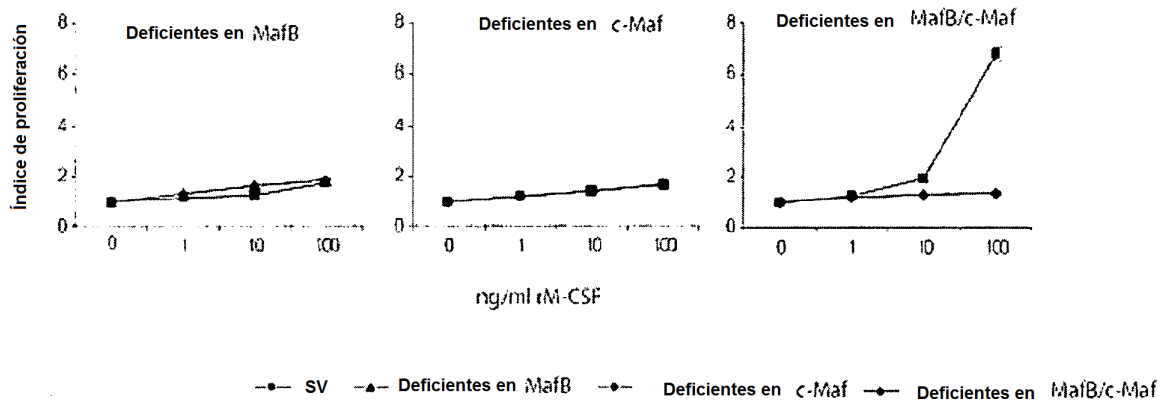


Figura 3

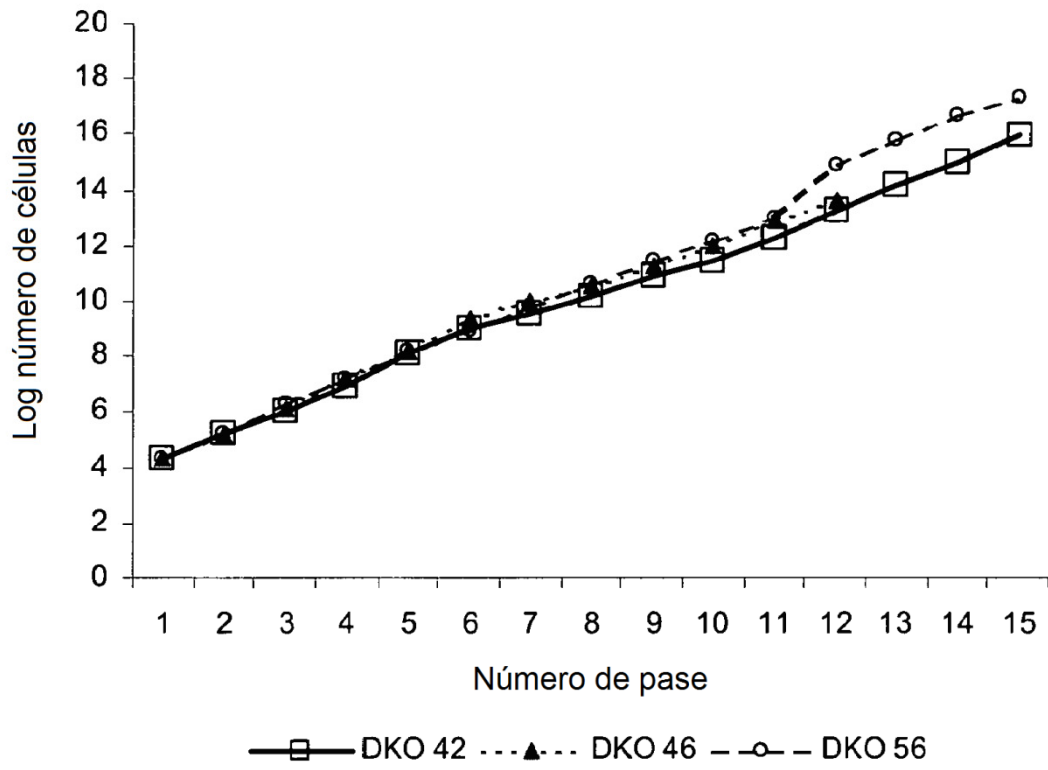
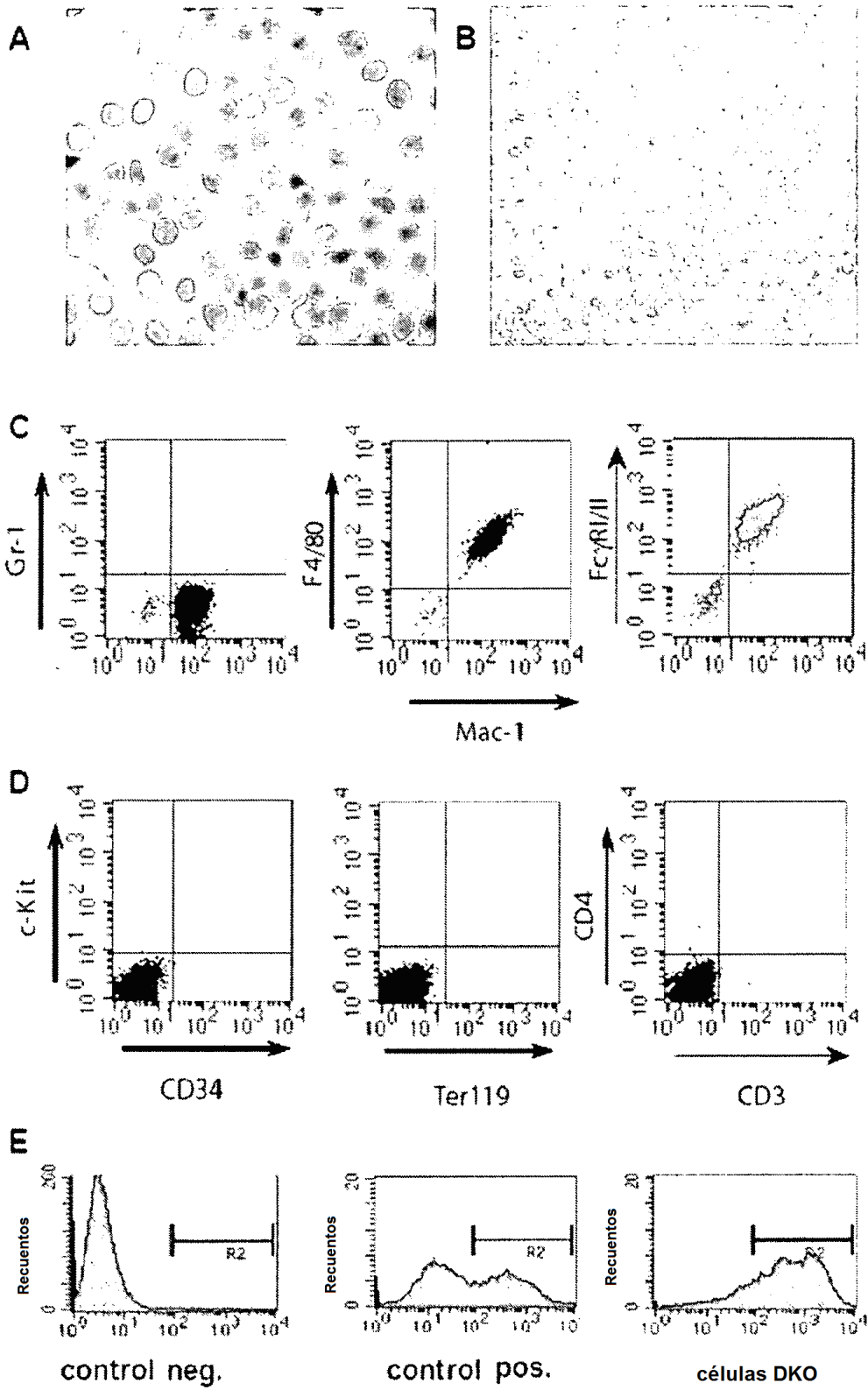


Figura 4



**Figura 5**



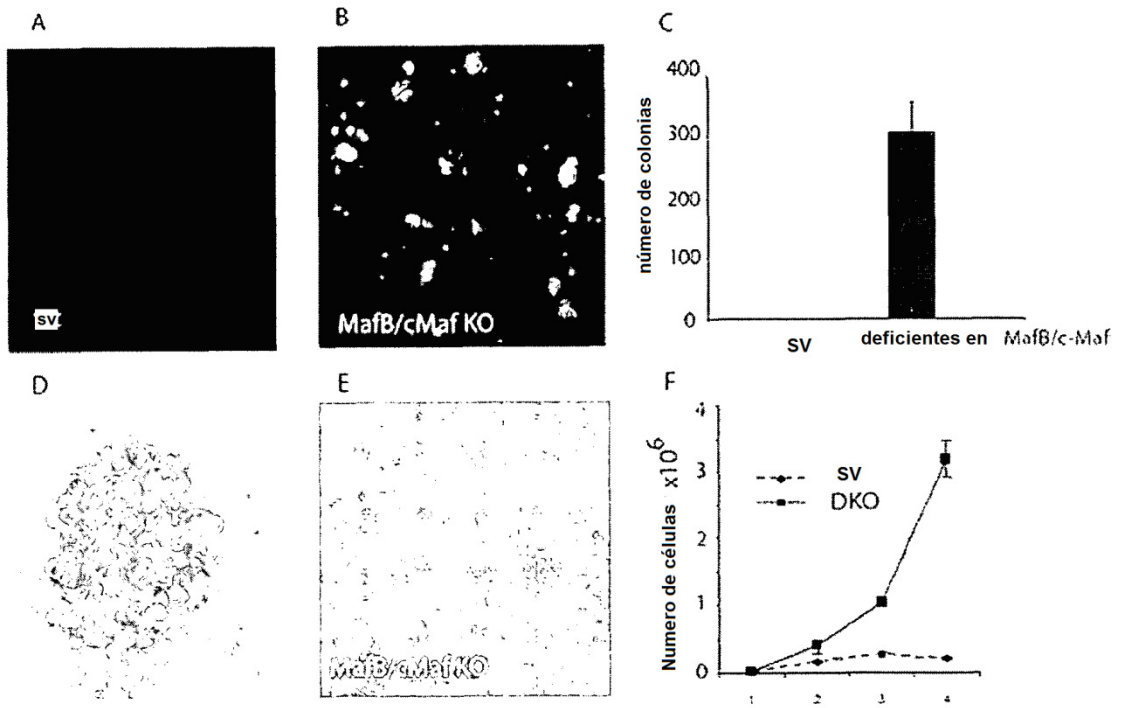


Figura 6