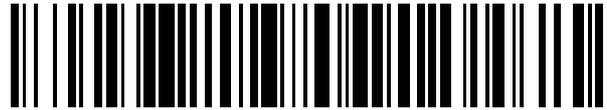


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 851**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A61K 35/51 (2015.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2014 PCT/EP2014/057191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14167018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2014 E 14716324 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2983696**

54 Título: **Uso de M-CSF para prevenir o tratar la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas**

30 Prioridad:

09.04.2013 EP 13305464

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2018

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)**

72 Inventor/es:

SIEWEKE, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 686 851 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

Uso de M-CSF para prevenir o tratar la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas

Campo de la invención:

5 La presente descripción se refiere al campo de la oncología, la terapia del cáncer y las inmunodeficiencias provocadas por la citopenia mieloide. Más en particular, la presente descripción se refiere a métodos y composiciones que comprenden un polipéptido de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) o un agonista de receptor de M-CSF para la prevención o el tratamiento de la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas (tales como infecciones) en un paciente que lo necesita (tal como un paciente sometido a trasplante de células madre hematopoyéticas).

10 Antecedentes de la invención:

El trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH), que consiste de la infusión de células madre hematopoyéticas, puede curar una amplia diversidad de enfermedades, que incluyen leucemia, linfoma, trastornos mieloproliferativos, síndrome mielodisplásico (SMD), síndromes de insuficiencia de médula ósea (MO), inmunodeficiencias congénitas, deficiencias enzimáticas y hemoglobinopatías.

15 A pesar del progreso considerable en el tratamiento de las complicaciones del TCMH, la infección (además de la toxicidad relacionada con el tratamiento (RRT) y la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) siguen siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad postrasplante, principalmente tras TCMH alogénico. Los principales avances en el tratamiento de las complicaciones infecciosas han procedido de una mejor comprensión de los mecanismos de la depresión compleja de la inmunidad observada durante los primeros meses tras el trasplante, y su papel en la predisposición a infecciones concretas, y también de ensayos terapéuticos bien diseñados. Aunque la proporción de muertes por complicaciones infecciosas tras TCMH alogénico ha disminuido a lo largo de las dos últimas décadas, queda mucho por hacer para disminuir adicionalmente este riesgo e implementar estrategias preventivas y profilácticas más eficaces adaptadas a esta población de alto riesgo.

20 Además, aunque el riesgo de muertes por complicaciones infecciosas es mucho menor tras un trasplante autólogo, el riesgo del procedimiento es mayor que el de la quimioterapia convencional, y se deberían implementar programas preventivos en cualquier programa de trasplante.

25 El espectro de patógenos a los que son más susceptibles los receptores de TCMH sigue una línea temporal que corresponde a los defectos inmunitarios predominantes. En el primer mes de TCMH, la neutropenia es el principal defecto de la defensa del hospedador, que predispone a los pacientes a infecciones bacterianas, fúngicas y virales. Tras el TCMH, la disfunción cualitativa de los fagocitos persiste debido a los corticosteroides y otros agentes inmunosupresores. El riesgo de infección por virus, bacterias y hongos filamentosos oportunistas durante este periodo está claramente asociado a la gravedad de EICH y a la necesidad de regímenes inmunosupresores potentes.

30 Por lo tanto, se han desarrollado nuevas aproximaciones para minimizar la probabilidad de infecciones. Por ejemplo, se ha usado factor estimulante de colonias de granulocitos [G-CSF o filgastim] o factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos [GM-CSF o sargramostim] debido a que acortan la duración de la neutropenia tras TCMH; sin embargo, no se hallaron datos que indicasen si estos factores de crecimiento reducen de manera eficaz la tasa de ataque de las enfermedades oportunistas (que incluyen las infecciones bacterianas o infecciones fúngicas), y por tanto si reducen la mortalidad.

35 Por lo tanto, el uso rutinario de estos factores de crecimiento tras TCMH es controvertido, y no se puede hacer una recomendación de su uso. Como resultado, todavía es muy necesario disponer de medios útiles para la prevención eficaz de las infecciones en los receptores de trasplantes de células madre hematopoyéticas (TCMH) para mejorar su supervivencia tras TCMH.

40 Además, en condiciones de estrés tales como infección o inflamación, el organismo necesita generar rápidamente células sanguíneas nuevas que se adapten al desafío. Se sabe que las citocinas hematopoyéticas afectan a la supervivencia, expansión y diferenciación de progenitores de linaje asignado^{1,2} pero se ha debatido si las células madre hematopoyéticas (CMH) a largo plazo son susceptibles a los efectos directos de especificación del linaje de las citocinas para producir un tipo específico de progenitores. Aunque los cambios genéticos en el equilibrio de factores de transcripción pueden sensibilizar a las CMH a las órdenes de las citocinas³, en general se cree que el inicio de la asignación de CMH se desencadena por la fluctuación estocástica de reguladores celulares intrínsecos tales como los factores de transcripción específicos de linaje^{4,5,6,7}, lo que deja que las citocinas aseguren la supervivencia y proliferación de las células de la progenie en las etapas de diferenciación posteriores^{8,9}.

Resumen de la invención:

55 En un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido de M-CSF o un agonista del receptor de M-CSF para el uso en la prevención o el tratamiento de la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas en un paciente que

lo necesita, en el que el agonista del receptor de M-CSF es un polipéptido de interleucina-34.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un polipéptido de M-CSF o un agonista de receptor de M-CSF para el uso de manera simultánea y/o posterior al TCMH en un método para mejorar el periodo de supervivencia de un paciente sometido a TCMH, en el que el agonista del receptor de M-CSF es un polipéptido de interleucina-34.

5 En particular, la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención:

Los inventores han demostrado que el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), una citocina mieloide liberada durante la infección y la inflamación, puede inducir directamente el regulador principal mieloide PU.1 y ordenar el cambio de destino a células mieloides en CMH, independientemente de la supervivencia o proliferación selectiva. Las imágenes de vídeo y el análisis de la expresión génica de células individuales revelaron que la estimulación de CMH sumamente purificadas con M-CSF en cultivo dio como resultado la activación del promotor de PU.1 y un número incrementado de células PU.1+ con un potencial de diferenciación y distintivos genéticos mieloides. *In vivo*, los niveles sistémicos elevados de M-CSF estimularon directamente la activación dependiente del receptor de M-CSF de la proteína PU.1 endógena en CMH individuales, e indujo una preferencia de diferenciación mieloide dependiente de PU.1.

De hecho, se ha demostrado que solamente M-CSF (comparativamente con GM-CSF y G-CSF) puede actuar directamente sobre CMH *in vitro* e *in vivo* para ordenar un cambio de identidad celular, y así proporcionar de manera específica y transitoria células progenitoras de granulocitos/monocitos (GMP) incrementadas sin comprometer la actividad de las células madre. Esta propiedad recién identificada de M-CSF es de gran interés para mejorar la citopenia mieloide, en particular para proteger a los pacientes de las infecciones tras el trasplante de células madre, y así para la prevención o el tratamiento de las citopenias mieloides (p.ej. neutropenia) y las complicaciones relacionadas en un paciente que lo necesita, tal como un paciente que experimenta TCMH, y más en particular las infecciones bacterianas y/o fúngicas, que se dan, por ejemplo, después de TCMH mientras el sistema inmunitario todavía no está reestablecido en el receptor para combatir estas infecciones oportunistas.

25 Métodos terapéuticos y usos:

La presente descripción proporciona métodos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas y kits de partes) para el uso para proporcionar de manera transitoria células progenitoras de granulocitos/monocitos (GMP) en un paciente que lo necesita (tal como un paciente sometido a TCMH). La presente descripción también proporciona métodos y composiciones para el uso en la prevención o el tratamiento de la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas en un paciente que lo necesita.

En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a un polipéptido de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) o un agonista del receptor de M-CSF para el uso en un método para proporcionar de manera transitoria células progenitoras de granulocitos/monocitos (GMP) en un paciente que lo necesita.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "proporcionar de manera transitoria" en el contexto de las células se refiere al incremento transitorio (es decir, durante un periodo de tiempo limitado, preferiblemente durante un mes después del TCMH) del número de un tipo celular característico, o tipos celulares, de una población inicial de células. Por lo tanto, las células de interés (es decir, células progenitoras de granulocitos/macrófagos) que se proporcionan de manera transitoria se producen mediante diferenciación *in vivo* de la población inicial de células (es decir, se administra un injerto de CMH al paciente sometido a TCMH). Se debería indicar adicionalmente que el polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF (tal como el polipéptido IL-34) proporciona de manera específica y transitoria células progenitoras de granulocitos/macrófagos, y no proporciona otras células, lo que incluye las células linfoides (p.ej. células progenitoras linfoides). Por lo tanto, la mayoría de CMH administradas al paciente sometido a TCMH dieron lugar de manera específica y transitoria a células progenitoras de granulocitos/macrófagos, pero no a otro tipo de células, en particular células progenitoras linfoides (lo que provocaría riesgo de EICH). De hecho, la "enfermedad del injerto contra el huésped" (también denominada "ICH" o "EICH") se refiere a una respuesta celular que se da cuando se introducen linfocitos de una clase de MHC diferente en un huésped, lo que da como resultado la reacción de los linfocitos contra el huésped.

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "células progenitoras de granulocitos/macrófagos" o "GMP" se refieren a células derivadas de células progenitoras mieloides comunes, y caracterizadas por su capacidad de dar lugar a granulocitos y macrófagos, pero que en general no dan lugar a células eritroides o megacariocitos del linaje mieloide.

En un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a un polipéptido de M-CSF o un agonista del receptor de M-CSF para el uso en la prevención o el tratamiento de la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas en un paciente que lo necesita.

55 Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "polipéptido de factor estimulante de colonias de macrófagos" o "polipéptido de M-CSF" (también conocido como CSF-1, para el "polipéptido de factor 1 estimulante

de colonias") se refieren a cualquier citocina nativa o variante (ya sea nativa o sintética) que controla la producción, diferenciación, y función de los macrófagos. La expresión incluye las variantes de M-CSF naturales y las formas modificadas de las mismas. Así, se han descrito tres isoformas de M-CSF variantes diferentes producidas por medio de un corte y empalme alternativo de mRNA, respectivamente una variante M-CSF[alfa] que se refiere a una proteína de 256 aminoácidos proporcionada en la base de datos UniProt Uniparc con el número de acceso UPI0000D61F83, una variante M-CSF[beta] que se refiere a una proteína de 554 aminoácidos proporcionada en la base de datos GenPept con el número de acceso NP_000748.3 y codificada por la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la base de datos GenBank con el número de acceso NM_000757.5, y una variante M-CSF[gamma] que se refiere a una proteína de 438 aminoácidos proporcionada en la base de datos GenPept con el número de acceso NP_757349.1 y codificada por la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la base de datos GenBank con el número de acceso NM_172210.2.

En una realización, el polipéptido de M-CSF es la isoforma humana M-CSF[alfa] de 256 aminoácidos proporcionada en la base de datos UniProt/Uniparc con el número de acceso UPI0000D61F83, y se muestra a continuación (SEQ ID N°: 1) o un polipéptido que tiene una secuencia al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia SEQ ID N°: 1:

MTAPGAAGRCPPTTWLGSLLLLVCLLASRSITEEVSEYCSHMIGSGHLQSLQR
 LIDSQMETSCQITFEFVDQEQLKDPVCYLKKAFLLVQDIMEDTMRFRDNTPNIAIAIVQ
 LQELSLRLKSCFTKDYEEDKACVTRTFYETPLQLLEKVKNVFNETKNLLDKDWNIFS
 KNCNNSFAECSSQGHERQSEGSFSPQLQESVFHLLVPSVILVLLAVGGLLFYRWRRRS
 HQEPQRADSPLEQPEGSPLTQDDRQVELPV

En una realización, el polipéptido de M-CSF es la isoforma humana M-CSF[beta] de 554 aminoácidos proporcionada en la base de datos GenBank con el número de acceso NP_000748.3, y se muestra a continuación (SEQ ID N°: 2) o un polipéptido que tiene una secuencia al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia SEQ ID N°: 2:

MTAPGAAGRCPPTTWLGSLLLLVCLLASRSITEEVSEYCSHMIGSGHLQSLQR
 LIDSQMETSCQITFEFVDQEQLKDPVCYLKKAFLLVQDIMEDTMRFRDNTPNIAIAIVQ
 LQELSLRLKSCFTKDYEEDKACVTRTFYETPLQLLEKVKNVFNETKNLLDKDWNIFS
 KNCNNSFAECSSQDVVTKPDCNCLYPKAIPSSDPASVSPHQPLAPSMAPVAGLTWED
 SEGTEGSSLLPGEQPLHTVDPGSAKQRPPRSTCQSFEPPETPVVKDSTIGGSPQPRPSVG
 AFNPGMEDILDSAMGTNWVPEEASGEASEIPVPOGTELSRPGGGSMQTEPARPSNF
 LSASSPLPASAKGQQPADVTGTALPRVGPVRPTGQDWNHTPQKTDHPSALLRDPPEP
 GSPRISSLRPQGLSNPSTLSAQPQLSRSHSSGSVLPLGELEGRRSTRDRRSPAEPGGPA
 SEGAARPLPRFNSVPLTDTGHERQSEGSSSPQLQESVFHLLVPSVILVLLAVGGLLFYR
 WRRRSHQEPQRADSPLEQPEGSPLTQDDRQVELPV

En una realización, el polipéptido de M-CSF es la isoforma humana M-CSF[gamma] de 438 aminoácidos proporcionada en la base de datos GenBank con el número de acceso NP_757349.1, y se muestra a continuación (SEQ ID N°: 3) o un polipéptido que tiene una secuencia al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia SEQ ID N°: 3:

MTAPGAAGRCPPTTWLGSLLLLVCLLASRSITEEVSEYCSHMIGSGHLQSLQR
 LIDSQMETSCQITFEFVDQEQLKDPVCYLKKAFLLVQDIMEDTMRFRDNTNPNAIAIVQ
 LQELSLRLKSCFTKDYEEHDKACVRTFYETPLQLLEKVKNVFNETHKNLLDKDWNIFS
 KNCNNSFAECSSQDVVTKPDCNCLYPKAISSDPASVSPHQPLAPSMAPVAGLTWED
 SEGTEGSSLLPGEQPLHTVDPGSAKQRPPRSTCQSFPEPPTPVVKDSTIGGSPQPRPSVG
 AFNPGMEDILDSAMGTNWVPEEASGEASEIPVPQGTELSPSRPGGGSMQTEPARPSNF
 LSASSPLPASAKGQQPADVTGHERQSEGSSSPQLQESVFHLLVPSVILVLLAVGGLLFY
 RWRRRSHQEPQRADSPLEQPEGSPLTQDDRQVELPV

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producido de manera natural o sintética, que no tiene una longitud específica. Así, los péptidos, oligopéptidos y proteínas se incluyen en la definición de polipéptido, y estos términos se usan de manera intercambiable a lo largo de la memoria descriptiva, así como en las reivindicaciones. El término polipéptido no excluye las modificaciones postraduccionales que incluyen, pero sin limitación, la fosforilación, acetilación, glicosilación y similares. El término también se aplica a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son una molécula mimética química artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos que naturales y polímeros de aminoácidos no naturales.
- 10 La expresión "polipéptido de M-CSF" se define en la presente memoria para incluir el polipéptido humano natural M-CSF y las variaciones alélicas naturales del polipéptido. Las variaciones alélicas son cambios naturales de bases en la población de una especie que pueden o no dar como resultado un cambio de aminoácidos en un polipéptido o proteína. Además, los polipéptidos de M-CSF según la presente descripción no solamente abarcan los polipéptidos que comprenden o que consisten en M-CSF de longitud completa y las variantes de los mismos, sino también los
- 15 polipéptidos que consisten en fragmentos de los mismos, con tal de que los fragmentos sean biológicamente activos. Además, en esta definición se incluyen las versiones recombinantes y sintéticas del polipéptido de M-CSF, que pueden contener modificaciones inducidas en el polipéptido y las secuencias de ADN del mismo. Por lo tanto, la expresión polipéptido de M-CSF pretende abarcar los equivalentes funcionales de los polipéptidos de M-CSF codificados por la secuencia SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 o SEQ ID N°: 3.
- 20 Tal como se usa en la presente memoria, un "equivalente funcional" se refiere a una molécula (p.ej. un polipéptido recombinante) que conserva la actividad biológica y la especificidad del polipéptido original. Por lo tanto, la expresión "equivalente funcional del polipéptido de M-CSF" incluye las variantes y fragmentos del polipéptido al que se refiere (es decir, el polipéptido de M-CSF), con tal de que los equivalentes funcionales exhiban al menos una, preferiblemente todas, las actividades biológicas del polipéptido de referencia, como se describe más adelante.
- 25 Una "variante" de un polipéptido se refiere a un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos alrededor de un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos respecto del polipéptido de secuencia nativa. Tales variantes incluyen, por ejemplo, los polipéptidos en los que se añaden, o se delecionan, uno o más residuos de aminoácidos, en el extremo N- o C-terminal del polipéptido. Generalmente, una variante tiene al menos alrededor de un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos alrededor de un 90% de identidad de
- 30 secuencia de aminoácidos, y aún más preferiblemente al menos alrededor de un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos respecto del polipéptido de secuencia nativa.
- Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, un 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de búsqueda de la presente descripción, quiere decir que la secuencia de aminoácidos del polipéptido en cuestión es idéntica a la secuencia de búsqueda, excepto porque la secuencia del polipéptido en
- 35 cuestión puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de búsqueda. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos un 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de búsqueda, se puede insertar, delecionar, o sustituir con otro aminoácido hasta un 5% (5 de 100) de los residuos de aminoácidos en la secuencia en cuestión.
- 40 En el marco de la presente solicitud, el porcentaje de identidad se calcula mediante el uso de una alineación global (es decir, las dos secuencias se comparan a lo largo de toda su longitud). Los métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el programa "Needle", que usa el algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) para hallar la alineación óptima (que incluye huecos) de dos secuencias cuando se considera su longitud completa. El programa Needle está disponible, por ejemplo, en el sitio de Internet ebi.ac.uk. El porcentaje de
- 45 identidad, de acuerdo con la presente descripción, se calcula preferiblemente mediante el uso del programa EMBOSS::needle (global) con un parámetro de "Apertura de Huecos" igual a 10,0, un parámetro de "Prolongación de Huecos" igual a 0,5, y una matriz Blosum62.

5 Los polipéptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos "al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica" a una secuencia de referencia pueden comprender mutaciones tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. El polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de referencia puede corresponder a una variante alélica de la secuencia de referencia. Por ejemplo, puede comprender solamente sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. Las sustituciones preferiblemente corresponden a sustituciones conservativas, tal como se indica en la tabla siguiente.

Sustituciones conservativas	Tipo de Aminoácido
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	Aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas alifáticas
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	Aminoácidos con cadenas laterales sin carga pero polares
Asp, Glu	Aminoácidos con cadenas laterales ácidas
Lys, Arg, His	Aminoácidos con cadenas laterales básicas
Gly	Cadena lateral neutra

10 Un "fragmento" de polipéptido, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un polipéptido biológicamente activo que es más corto que un polipéptido de referencia (p.ej. un fragmento del polipéptido de M-CSF). Así, el polipéptido según la presente descripción abarca los polipéptidos que comprenden o que consisten en fragmentos de M-CSF, con tal de que los fragmentos sean biológicamente activos.

15 En el marco de la presente descripción, el fragmento biológicamente activo puede comprender, por ejemplo, al menos 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525 o 550 aminoácidos consecutivos del polipéptido de M-CSF.

20 Como se describió anteriormente, las tres isoformas de M-CSF se sintetizan a partir de un precursor de longitud completa y uno truncado. Se debería indicar además que los 150 aminoácidos N-terminales de los precursores son idénticos y suficientes para la actividad biológica *in vitro* como se describe en Pixley *et al.* 2004 Trends Cell Biol. nov. de 2004;14(11):628-38. De hecho, los aminoácidos 1-150 de las tres formas maduras de M-CSF son idénticos, y se cree que contienen secuencias esenciales para la actividad biológica de M-CSF. Por lo tanto, un fragmento biológicamente activo del polipéptido de M-CSF es un fragmento N-terminal que comprende al menos 150 aminoácidos.

En una realización, el polipéptido de M-CSF es un polipéptido recombinante de 156 aminoácidos de M-CSF murino, y se muestra a continuación (SEQ ID N°: 4):

MKEVSEHCSHMIGNHGLKVLQQLIDSQMETSCQIAFEFVDQEQLDDPVCYLK
 KAFFLVQDIIDETMRFKDNTPNANATERLQELSNLNSCFTKDYEEQNKACVRTFHE
 25 TPLQLLEKIKNFFNETKNLLEKDWNIPTKNCNNSFAKCSSRDVVTKP

En una realización particular, el polipéptido de M-CSF comprende o consiste en un polipéptido de 150 aminoácidos de M-CSF humano, y se muestra a continuación (SEQ ID N°: 5):

MTAPGAAGRCPPTTWLGSLLLLVCLLASRSITEEVSEYCSHMIGSGHLQSLQR
 LIDSQMETSCQITFEFVDQEQLKDPVCYLKKAFLLVQDIMEDTMRFRDNTPNIAIVQ
 LQELSLRLKSCFTKDYEEHDKACVRTFYETPLQLLEKVK

30 La "actividad biológica" de M-CSF o un fragmento del mismo significa (i) la capacidad de inducir la diferenciación mieloide de una célula madre hematopoyética (CMH) (más en particular la diferenciación mielo-monocítica como se describe en la Sección de Ejemplos; es decir, la capacidad de inducir la producción incrementada de GMP mediante CMH); y/o (ii) la capacidad de inducir la expresión del factor de transcripción PU.1 (como se describe en la Sección de Ejemplos); y/o (iii) la capacidad de tratar o prevenir la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas (tales como infecciones).

35 El experto en la técnica puede determinar fácilmente si un fragmento del polipéptido de M-CSF es biológicamente activo. Para comprobar si los polipéptidos recién generados inducen la diferenciación mieloide *in vitro* o *in vivo* de CMH y/o inducen la expresión del factor de transcripción PU.1, se puede llevar a cabo un análisis FACS, un análisis mediante qRT-PCR o una determinación del perfil de la expresión génica de células individuales (véase en la sección de Ejemplos) para cada polipéptido. Además, para comprobar si los polipéptidos recién generados tratan o

previenen la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas (tales como infecciones), se puede usar un modelo en ratón de trasplante de médula ósea (TMO) y de la enfermedad del injerto contra el huésped. Además, un ensayo del curso temporal y un ensayo dosis-respuesta llevados a cabo *in vitro* o *in vivo* (p.ej. mediante el uso de un modelo murino de TMO y EICH) determinarán las condiciones óptimas para cada polipéptido.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "agonista del receptor de M-CSF" se refiere a cualquier compuesto sintético o natural (por ejemplo un polipéptido) capaz de unirse al receptor de M-CSF (también conocido como CD115, que es una proteína de la superficie celular codificada, en seres humanos, por el gen *CSF1R*) presente en las células madre hematopoyéticas y las células precursoras hematopoyéticas y que estimula la producción de células mieloides, monocitos, macrófagos o células relacionadas del sistema fagocítico mononuclear, tales como la microglía y las células de Langerhans. En una realización, el ligando del receptor de M-CSF es un polipéptido humano.

En una realización preferida, el agonista del receptor de M-CSF es el polipéptido IL34.

- 15 Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "polipéptido de Interleucina-34" o "polipéptido IL-34" son muy conocidas en la técnica, y se refieren a una citocina que estimula la proliferación, supervivencia y diferenciación de los monocitos y macrófagos. La proteína IL-34 humana natural tiene una secuencia de 242 aminoácidos proporcionada en la base de datos UniProt con el número de acceso Q6ZMJ4, y se muestra a continuación (SEQ ID N°: 6) o un polipéptido que tiene una secuencia al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia SEQ ID N°: 6:

MPRGFTWLRYLGI FLGVALGNEPLEMWPLTQNEECTVTGFLRDKLQYRSRLQ
 YMKHYFPINYKISVPYEGVFRIANVTRLQRAQVSERELRYLWVLVSLSATSVQDVL
 LEGHPSWKYLQEVETLLLN VQQGLTDVEVSPKVESVLSLLNAPGNLKLVRPKALLD
 NCFRVMELLYCSCCKQSSVLNWQDCEVPSQSCSPEPSLQYAATQLYPPPPWSPSSPP
 HSTGSVRPVRAQGEGLLP

- 20 Como se describió previamente para el polipéptido de M-CSF, la expresión polipéptido IL-34 pretende abarcar los equivalentes funcionales del polipéptido IL-34 codificado por la secuencia SEQ ID N°: 6.

- En una realización, los polipéptidos de la presente descripción pueden comprender un marcador. Un marcador es una secuencia que contiene un epítipo que puede ser útil para la purificación de los polipéptidos. Se une mediante una diversidad de técnicas, tales como cromatografía de afinidad, para la localización de dicho polipéptido dentro de una célula o una muestra de tejido mediante el uso de técnicas de inmunomarcaje, la detección de dicho polipéptido mediante inmunotransferencia, etc. Los ejemplos de marcadores empleados habitualmente en la técnica son el marcador GST (glutathion-S-transferasa), el marcador FLAG™, el marcador Strep™, el marcador V5, el marcador myc, el marcador His (que consiste en general en seis residuos de histidina), etc.

- 30 En otra realización, los polipéptidos de la presente descripción pueden comprender modificaciones químicas que mejoran su estabilidad y/o su biodisponibilidad. Tales modificaciones químicas están dirigidas a obtener polipéptidos con una protección incrementada de los polipéptidos contra la degradación enzimática *in vivo*, y/o una capacidad incrementada de atravesar barreras de membranas, por lo que se incrementa su semivida y se mantiene o mejora su actividad biológica. Se puede emplear cualquier modificación química conocida en la técnica según la presente descripción. Tales modificaciones químicas incluyen, pero sin limitación:

- 35 - sustitución(es) de un aminoácido con un aminoácido modificado y/o poco habitual, p.ej. una sustitución de un aminoácido con un aminoácido poco habitual como Nle, Nva u Orn; y/o
- modificaciones en los extremos N-terminales y/o C-terminales de los péptidos tales como, p.ej., la acilación N-terminal (preferiblemente acetilación) o desaminación, o la modificación del grupo carboxilo C-terminal hasta un grupo amida o alcohol;
- 40 - modificaciones del enlace amida entre dos aminoácidos: acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación (preferiblemente metilación) en el átomo de nitrógeno o el carbono alfa del enlace amida que une dos aminoácidos;
- modificaciones en el carbono alfa del enlace amida que une dos aminoácidos, tales como, p.ej., acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación (preferiblemente metilación) en el carbono alfa del enlace amida que une dos aminoácidos.
- 45 - cambios de quiralidad tales como, p.ej., la sustitución de uno o más aminoácidos naturales (enantiómero L) con los enantiómeros D correspondientes;
- retro-inversiones en las que uno o más aminoácidos naturales (enantiómero L) se sustituyen con los enantiómeros

D correspondientes, junto con una inversión de la cadena del aminoácido (desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal);

- azapéptidos, en los que uno o más carbonos alfa se sustituyen con átomos de nitrógeno; y/o

5 - betapéptidos, en los que el grupo amino de uno o más aminoácidos está unido al carbono β en vez de al carbono α .

Otra estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros hidrosolubles. Se ha demostrado que diversos polímeros hidrosolubles modifican la biodistribución, mejoran el modo de absorción celular, cambian la permeabilidad a través de las barreras fisiológicas, y modifican la velocidad de aclaramiento del organismo. Para llevar a cabo un efecto selectivo o de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros hidrosolubles que contienen
10 restos del fármaco en forma de grupos terminales, como parte del esqueleto, o como grupos que cuelgan de la cadena de polímero.

Se ha usado de manera generalizada polietileno glicol (PEG) como vehículo de fármacos, dado su elevado grado de biocompatibilidad y su facilidad de modificación. Se ha demostrado que la unión a diversos fármacos, proteínas, y liposomas mejora el tiempo de permanencia y disminuye la toxicidad. PEG se puede acoplar a agentes activos por
15 medio de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y por medio de otros métodos químicos; sin embargo, el propio PEG está limitado a dos agentes activos como máximo por molécula. En una aproximación diferente, se exploraron los copolímeros de PEG y aminoácidos como nuevos biomateriales que conservarían las propiedades de biocompatibilidad de PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de tener numerosos puntos de unión por molécula (lo que proporcionaría una mayor carga de fármaco), y que se podrían diseñar de manera sintética para ajustarse a
20 una diversidad de aplicaciones.

Los expertos en la técnica conocen las técnicas de PEGilación para la modificación eficaz de fármacos. Por ejemplo, se han usado polímeros de administración de fármacos que consisten en polímeros alternantes de PEG y monómeros tri-funcionales, tales como lisina, en VectraMed (Plainsboro, N.J.). Las cadenas de PEG (en general de
25 2000 daltons o menos) se unen a los grupos α - y ϵ -amino de la lisina por medio de uniones uretano estables. Tales copolímeros conservan las propiedades deseables de PEG, a la vez que proporcionan grupos colgantes reactivos (los grupos de ácido carboxílico de la lisina) a intervalos estrictamente controlados y predeterminados a lo largo de la cadena del polímero. Los grupos colgantes reactivos se pueden usar para la derivatización, el entrecruzamiento, o la conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles para producir profármacos estables, de larga circulación, variando el peso molecular del polímero, el peso molecular de los segmentos de PEG, y la unión escindible entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta al espaciado del complejo fármaco/grupo de unión y la cantidad de fármaco por peso molecular de conjugado (los segmentos de PEG más pequeños proporcionan una mayor carga de fármaco). En general, el incremento del peso molecular total del conjugado de copolímero en bloque incrementará la semivida circulatoria del conjugado. Sin embargo, el conjugado debe ser fácilmente degradable o tener un peso molecular por debajo del umbral limitante de la filtración glomerular
30 (p.ej., menor de 60 kDa).

Además, para que el esqueleto de polímero sea importante en el mantenimiento de la semivida circulatoria y la biodistribución, se pueden usar ligadores para mantener el agente terapéutico en una forma de profármaco hasta que se libere del polímero del esqueleto mediante un desencadenante específico, en general la actividad enzimática en el tejido selectivo. Por ejemplo, este tipo de administración de fármaco con activación tisular es especialmente útil
40 cuando es necesaria la administración en un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico se libera en o cerca del sitio de la patología. Las bibliotecas de grupos de unión para el uso en la administración de fármacos activados son conocidas para los expertos en la técnica, y se pueden basar en la cinética enzimática, la prevalencia de enzima activa, y la especificidad de escisión de las enzimas específicas de la enfermedad seleccionada. Tales ligadores se pueden usar para modificar los polipéptidos descritos en la presente memoria para la administración terapéutica.
45

En otra realización, los polipéptidos de la presente descripción se pueden fusionar a un polipéptido heterólogo (es decir, polipéptido derivado de una proteína no relacionada, por ejemplo, de una proteína inmunoglobulina).

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "fusionado" y "fusión" se usan de manera intercambiable. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes, mediante cualquier medio que incluye
50 la conjugación química o los medios recombinantes. Una "fusión en el marco de lectura" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos de polinucleótidos (ORFs) para formar un ORF continuo más largo, de manera que se mantiene el marco de lectura traduccional correcto de los ORFs originales. Por ejemplo, una proteína de fusión recombinante puede ser una única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORFs originales (cuyos segmentos normalmente no están unidos así en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace así continuo a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden estar físicamente o espacialmente separados, por ejemplo, por una secuencia ligadora en el marco de lectura.
55

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "proteína de fusión de M-CSF" se refiere a un polipéptido que comprende el polipéptido de M-CSF o un equivalente funcional del mismo fusionado a un polipéptido heterólogo. La

proteína de fusión de M-CSF compartirá en general al menos una propiedad biológica en común con el polipéptido de M-CSF (como se describió anteriormente).

Un ejemplo de una proteína de fusión de M-CSF es una M-CSF-inmunoadhesina.

5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de las inmunoglobulinas. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del reconocimiento del antígeno y el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de un dominio constante de una inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es en general una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (que incluyen IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

10 La secuencia de inmunoglobulina, preferiblemente pero no necesariamente, es un dominio constante de una inmunoglobulina (región Fc). Las inmunoadhesinas pueden poseer muchas de las valiosas propiedades químicas y biológicas de los anticuerpos humanos. Debido a que las inmunoadhesinas se pueden construir a partir de una secuencia proteica humana con una especificidad deseada unida a una bisagra de inmunoglobulina humana adecuada y una secuencia de un dominio constante (Fc), la especificidad de unión de interés se puede conseguir mediante el uso de componentes completamente humanos. Tales inmunoadhesinas son mínimamente inmunógenas para el paciente, y son seguras para un uso crónico o repetido. En una realización, la región Fc es una región Fc de secuencia nativa. En otra realización, la región Fc es una región Fc variante. En otra realización, la región Fc es una región Fc funcional. La porción de secuencia de M-CSF y la porción de secuencia de inmunoglobulina de la M-CSF-inmunoadhesina se pueden unir mediante un ligador mínimo. La secuencia de inmunoglobulina preferiblemente, pero no necesariamente, es un dominio constante de una inmunoglobulina. El resto de inmunoglobulina en las quimeras de la presente descripción se puede obtener de los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM, pero preferiblemente IgG1 o IgG3.

20 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "región Fc" se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye las regiones Fc de una secuencia nativa y las regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, se define normalmente que la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la misma.

30 Otro ejemplo de una proteína de fusión de M-CSF es una fusión del polipéptido de M-CSF con anticuerpos de un dominio de unión a albúmina de suero humano (AlbudAbs) según la AlbuAb™ Technology Platform como se describe en Konterman *et al.* 2012 AlbuAb™ Technology Platform-Versatile Albumin Binding Domains for the Development of Therapeutics with Tunable Half-Lives.

35 Los polipéptidos de la presente descripción se pueden producir mediante cualquier medio adecuado, como será evidente para los expertos en la técnica. Para producir cantidades suficientes de polipéptidos de M-CSF para el uso de acuerdo con la presente descripción, la expresión se puede conseguir de manera conveniente cultivando en condiciones adecuadas las células hospedadoras recombinantes que contienen el polipéptido de la presente descripción. Preferiblemente, el polipéptido se produce mediante medios recombinantes, mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico codificante. Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de diferentes células hospedadoras son muy conocidos.

40 Cuando se expresan en forma recombinante, el polipéptido se genera preferiblemente mediante la expresión de un ácido nucleico codificante en una célula hospedadora. Se puede usar cualquier célula hospedadora, dependiendo de las necesidades individuales de un sistema particular. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células mamíferas, células vegetales, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen las células de ovario de hámster chino, células HeLa, células renales de crías de hámster y muchas otras. Las bacterias también son hospedadores preferidos para la producción de una proteína recombinante, debido a la facilidad con la que se pueden manipular y cultivar las bacterias. Un hospedador bacteriano habitual y preferido es *E coli*.

45 Además, se debería indicar que la mayoría de productos biofarmacéuticos basados en proteínas conllevan cierta forma de modificación postraduccional que puede afectar profundamente a las propiedades de la proteína relevante para su aplicación terapéutica. La glicosilación de proteínas representa la modificación más habitual (alrededor del 50% de las proteínas humanas se glicosilan). La glicosilación puede introducir una heterogeneidad considerable en una composición de proteínas a través de la generación de diferentes estructuras de glicanos en las proteínas de la composición. Tales estructuras de glicanos se hacen mediante la acción de diversas enzimas de la maquinaria de glicosilación a medida que la glicoproteína se transporta por el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi (cascada de glicosilación). La naturaleza de la(s) estructura(s) de glicano de una proteína tiene impacto sobre el plegamiento de la proteína, la estabilidad, la duración, el transporte, la farmacodinámica, la farmacocinética y la inmunogenicidad. La estructura de glicano tiene un gran impacto sobre la actividad funcional principal de la proteína.

La glicosilación puede afectar a la estructura local de la proteína y puede ayudar a dirigir el plegamiento de la cadena polipeptídica. Un tipo importante de estructuras de glicano son los denominados N-glicanos. Se generan mediante la unión covalente de un oligosacárido al grupo amino (N) de los residuos de asparagina en la secuencia consenso NXS/T de la cadena polipeptídica naciente. Los N-glicanos pueden participar además en la clasificación o transporte de una proteína hacia su objetivo final: El N-glicano de un anticuerpo, por ejemplo, puede interactuar con los componentes del complemento. Los N-glicanos también sirven para estabilizar una glicoproteína, por ejemplo, aumentando su solubilidad, protegiendo zonas hidrófobas de su superficie, protegiendo de la proteólisis, y dirigiendo las interacciones estabilizantes intracatenarias. La glicosilación puede regular la semivida de la proteína, por ejemplo, en seres humanos la presencia de ácidos siálicos terminales en los N-glicanos puede incrementar la semivida de las proteínas que circulan en el torrente sanguíneo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "glicoproteína" se refiere a cualquier proteína que tiene uno o más N-glicanos unidos a ella. Así, el término se refiere tanto a proteínas que en general se reconocen en la técnica como una glicoproteína, como a proteínas que se han modificado genéticamente para que contengan uno o más sitios de N-glicosilación. Tal como se usan en la presente memoria, los términos "N-glicano" y "glicofoma" se usan de manera intercambiable y se refieren a un oligosacárido con unión en N, por ejemplo, uno que está unido mediante una unión asparagina-N-acetilglucosamina a un residuo de asparagina de un polipéptido. Las N-glicoproteínas contienen un residuo de N-acetilglucosamina unido al nitrógeno de la amida de un residuo de asparagina en la proteína. Los carbohidratos predominantes hallados en las glicoproteínas son glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico (p.ej., ácido N-acetil-neuramínico (NANA)). El procesamiento de los grupos carbohidrato se da de manera cotraduccional en la luz del RE y continúa de manera postraduccional en el aparato de Golgi para las N-glicoproteínas.

Recientemente se están desarrollando varias levaduras, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Saccharomyces cerevisiae* para usar las ventajas de tales sistemas, a la vez que se eliminan las desventajas con respecto a la glicosilación. Se están desarrollando genéticamente varias cepas para producir estructuras de glicanos definidas, similares a las humanas, en una proteína. Los métodos para modificar genéticamente levaduras para producir N-glicanos similares a los humanos se describen en las patentes de EE.UU. N°s 7.029.872 y 7.449.308, junto con los métodos descritos en las solicitudes publicadas de EE.UU. N°s 20040230042, 20050208617, 20040171826, 20050208617, y 20060286637. Estos métodos se han usado para construir levaduras recombinantes que pueden producir glicoproteínas terapéuticas que tienen de manera predominante N-glicanos complejos o híbridos similares a los humanos sobre ellas, en vez de N-glicanos del tipo de las levaduras. Como se describió previamente, la glicosilación similar a la humana se caracteriza principalmente por estructuras de N-glicanos "complejas" que contienen N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa y/o ácido N-acetilneuramínico. Así, se han modificado genéticamente varias cepas de levaduras para producir glicoproteínas que comprenden uno o más N-glicanos complejos similares a los humanos o híbridos similares a los humanos, tales como GlcNAcMan3GlcNAc2.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "citopenia mieloide" se refiere a un trastorno hematológico caracterizado por un número anormalmente bajo de células mieloides. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión incluye la neutropenia y monocitopenia, y excluye la trombocitopenia y eritropenia.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "monocitopenia" se refiere a un trastorno hematológico caracterizado por un número anormalmente bajo de monocitos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "neutropenia" se refiere a un trastorno hematológico caracterizado por un número anormalmente bajo de neutrófilos, por ejemplo menos de 1500 neutrófilos/ μ L de sangre, preferiblemente menos de 1000 neutrófilos/ μ L de sangre, y lo más preferiblemente menos de 500 neutrófilos/ μ L de sangre.

Tal como se usa en la presente memoria, este término incluye la neutropenia crónica, cíclica y aguda. La neutropenia puede corresponder, por ejemplo, a una neutropenia idiopática crónica, una neutropenia congénita o una neutropenia secundaria tal como una neutropenia inducida por infección, una neutropenia inducida por fármacos, una neutropenia inducida por alcoholismo, una neutropenia autoinmunitaria, una neutropenia secundaria crónica en el SIDA, una neutropenia provocada por la sustitución de la médula ósea, una neutropenia provocada por la quimioterapia citotóxica, una neutropenia provocada por la radioterapia, una neutropenia provocada por deficiencia de folato o vitamina B12, una neutropenia provocada por esplenomegalia, o una neutropenia provocada por una enfermedad γ -linfoproliferativa T.

Un "paciente que lo necesita" quiere decir un individuo que padece o es susceptible a padecer una citopenia mieloide o complicaciones relacionadas a tratar. Los individuos a tratar en el marco de la presente descripción son preferiblemente seres humanos.

En una realización particular, el paciente que lo necesita es un paciente sometido a trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH).

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "paciente sometido a trasplante de células madre hematopoyéticas" (o TCMH) se refiere a un ser humano que se tiene que someter a un injerto de CMH. En general,

dicho paciente está afectado por un trastorno que se puede curar mediante TCMH.

En una realización, el paciente sometido a TCMH está afectado por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en leucemia, linfoma, trastornos mieloproliferativos, síndrome mielodisplásico (SMD), síndromes de insuficiencia de médula ósea (MO), inmunodeficiencias congénitas, deficiencias enzimáticas y hemoglobinopatías.

- 5 Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "trasplante de células madre hematopoyéticas" o "TCMH" se refieren a un componente del tratamiento de una amplia diversidad de trastornos hematológicos. En general, existen dos tipos de TCMHs: trasplante autólogo y alogénico.

10 En una realización, el TCMH es un TCMH alogénico. Tal como se usa en la presente memoria, el término "alogénico" se refiere a derivar de, originarse en, o ser miembros de la misma especie, en los que los miembros están genéticamente relacionados o no están genéticamente relacionados, pero son genéticamente similares. Un "trasplante alogénico" se refiere a la transferencia de células u órganos de un donante a un receptor, en el que el receptor es de la misma especie que el donante. El trasplante alogénico implica la infusión de células madre del donante, en general mediante el uso de un donante que coincide con el MHC del receptor. Sin embargo, los trasplantes de donantes compatibles no emparentados (MUD) también están asociados a una reacción más intensa del injerto contra el huésped, y así dan como resultado mayores tasas de mortalidad.

15 En otra realización, el TCMH es un TCMH autólogo. Tal como se usa en la presente memoria, el término "autólogo" se refiere a derivar u originarse del mismo sujeto o paciente. Un "trasplante autólogo" se refiere a la recogida y al trasplante de las propias células u órganos de un sujeto. El trasplante autólogo implica la infusión de las propias células de un receptor tras el tratamiento mieloablato. Los trasplantes de células autólogas minimizan el riesgo de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) y dan como resultado menos complicaciones.

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "mieloablato" o "mieloablación" se refiere al deterioro o la destrucción del sistema hematopoyético, en general mediante la exposición a un agente citotóxico o radiación. La mieloablación abarca la mieloablación completa provocada por dosis elevadas de un agente citotóxico o la irradiación de todo el cuerpo que destruye el sistema hematopoyético. También incluye un estado de mieloablación menor que el total, provocado mediante un acondicionamiento no mieloablato (tratamiento mielosupresor). Así, un acondicionamiento no mieloablato es un tratamiento que no destruye completamente el sistema hematopoyético del sujeto.

En una realización, las complicaciones relacionadas con la citopenia mieloide son infecciones virales, bacterianas y/o fúngicas.

- 30 Los ejemplos no limitantes de infecciones virales incluyen infecciones por el virus *Herpes simplex* (HSV), infecciones por *Citomegalovirus* (CMV), infecciones por el virus *Varicella-zoster* (VZV), infecciones por *herpes virus 6 humano* (HHV6), infecciones por el virus de *Epstein-Barr* (EBV), infecciones virales respiratorias (tales como por el virus sincitial respiratorio (RSV), infección por el virus parainfluenza, rinovirus, y virus de la gripe) e infecciones por adenovirus.

- 35 Los ejemplos no limitantes de infecciones bacterianas incluyen las infecciones por bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia* (p.ej. *Escherichia coli*), *Salmonella*, *Shigella*, y otras Enterobacteriaceae, infecciones por *Pseudomonas* (p.ej. *Pseudomonas aeruginosa*), *Moraxella*, *Helicobacter*, y *Legionella*.

40 Los ejemplos no limitantes de infecciones fúngicas incluyen la infección por *Aspergillus* (p.ej. *Aspergillus fumigatus*), infección por *Candida* (p.ej. *Candida albicans* y *Candida no albicans*) y otras infecciones fúngicas emergentes que incluyen las infecciones por *Trichosporon*, *Alternaria*, *Fusarium*, y *Mucorales*.

En una realización particular, dichas complicaciones son infecciones tempranas que se dan entre 0-100 días tras el TCMH.

En otra realización particular, dichas complicaciones son infecciones tardías que se dan desde al menos 100 días hasta al menos un año tras el TCMH.

- 45 Tal como se usa en la presente memoria, el término "prevenir" pretende caracterizar un método o proceso profiláctico que se dirige a retrasar o prevenir el inicio de un trastorno o afección al que se aplica tal término.

50 Tal como se usa en la presente memoria, el término "tratar" pretende caracterizar un método o proceso terapéutico que se dirige a (1) frenar o detener la progresión, agravamiento, o deterioro de los síntomas de la enfermedad o afección a la que se aplica tal término; (2) aliviar o provocar mejoras de los síntomas de la enfermedad o afección a la que se aplica tal término; y/o (3) invertir o curar la enfermedad o afección a la que se aplica tal término.

Composiciones farmacéuticas:

La presente descripción también se refiere a comprender un polipéptido como se define en la presente memoria y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para el uso en un método para proporcionar de manera transitoria células progenitoras de granulocitos/monocitos (GMP) en un paciente que lo necesita.

La presente descripción se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se define en la presente memoria y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para el uso en el tratamiento de la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas en un paciente que lo necesita.

5 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de la presente descripción incluyen todas las composiciones en las que el polipéptido está contenido en una cantidad eficaz para conseguir el propósito deseado. Además, las composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos fisiológicamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y agentes auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos hasta preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente.

10 La expresión "vehículo fisiológicamente aceptable" pretende abarcar cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo, y que sea atóxico para el hospedador al que se administra. Los vehículos fisiológicamente aceptables adecuados son muy conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Easton, EE.UU., 1985), que es un texto de referencia habitual en este campo. Por ejemplo, para la administración parenteral, los ingredientes activos anteriores se pueden formular en formas farmacéuticas unitarias para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, solución de albúmina sérica y solución de Ringer.

Además del vehículo fisiológicamente aceptable, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden comprender cantidades menores de aditivos, tales como estabilizantes, excipientes, tampones y conservantes. La composición farmacéutica de la presente descripción puede comprender además al menos un compuesto adicional.

20 En una realización, dicho al menos un compuesto adicional se selecciona del grupo que consiste en un compuesto antiviral, un compuesto anti-fúngico, un compuesto anti-bacteriano, una citocina o un factor de crecimiento.

Los compuestos anti-virales pueden ser los adecuados para los virus afrontados por el paciente. Los compuestos antivirales útiles incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, aciclovir, cidofovir, ganciclovir, idoxuridina, penciclovir, valganciclovir, valaciclovir, vidarabina, amantadina, rimantadina, zanamivir, fomivirsen, imiquimod, y ribavirina. Los agentes terapéuticos dirigidos contra retrovirus incluyen, entre otros, inhibidores de transcriptasas inversas de nucleósidos (p.ej., zidovudina, didanosina, estavudina, zalcitabina, lamivudina), inhibidores de transcriptasas inversas que no son nucleósidos (p.ej., nevirapina, efavirenz, delavirudina), e inhibidores de proteasas (p.ej., saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, y lopinavir).

30 Los compuestos anti-fúngicos pueden ser un agente antifúngico sistémico. Un compuesto antifúngico útil de este tipo es la anfotericina B de la familia de antibióticos de macrólidos poliénicos. Otro compuesto antifúngico es flucitosina, una pirimidina fluorada. La desaminación de flucitosina por el hongo genera 5-fluorouracilo, un anti-metabolito e inhibidor de la síntesis de ADN. La flucitosina se usa en general para las infecciones por *Cryptococcus* y las candidiasis. Aunque se usa sola, la flucitosina se usa en general en combinación con anfotericina B. Los imidazoles y triazoles representan una amplia clase de compuestos antifúngicos basados en azoles. Los antifúngicos de azoles ejemplares incluyen, entre otros, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, econazol, voriconazol, y terconazol.

Los compuestos anti-bacterianos pueden ser antibióticos adecuados para el patógeno bacteriano particular. Estos incluyen tanto antibióticos de amplio espectro como compuestos anti-bacterianos más selectivos. Las diversas clases de compuestos anti-bacterianos son, a modo de ejemplo y no de limitación, quinolonas y fluoroquinolonas, antibióticos de [beta]-lactamas, aminoglicósidos, tetraciclinas, macrólidos, y diversos congéneres de los mismos. Los compuestos de quinolona ejemplares incluyen ciprofloxacino, ofloxacino, esparfloxacino, lomefloxacino, y moxifloxacino. Los antibióticos de [beta]-lactamas ejemplares incluyen penicilinas (p.ej., penicilina G, penicilina V), ampicilina, carbenicilina, meticilina, carbapenem, y cefalosporinas (p.ej., cefalotina, cefamandol, cefaclor, cefonicid, cefotetan, cefatoxima, ceftazidima, ceftizoxima, cefepima). Los aminoglicósidos ejemplares incluyen neomicina, estreptomina, kanamicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, y netilmicina. Los macrólidos ejemplares incluyen eritromicina, claritromicina, y azitromicina.

50 Los polipéptidos de la presente descripción se pueden administrar por cualquier medio que consiga el propósito deseado. Por ejemplo, la administración se puede realizar mediante varias vías diferentes que incluyen, pero sin limitación, el uso subcutáneo, intravenoso, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intratecal, intranasal, oral, rectal, transdérmico, bucal, tópico, local, por inhalación o subcutáneo. Se prefieren especialmente las vías parenterales y tópicas.

Las dosis a administrar dependen de las necesidades del individuo, del efecto deseado y de la vía de administración elegida. Se entiende que la dosis administrada dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor, el tratamiento concurrente, si existe, la frecuencia del tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado. La dosis total necesaria para cada tratamiento se puede administrar mediante dosis múltiples o en una única dosis.

55 Las dosis usadas para la administración se pueden adaptar en función de diversos parámetros, y en particular en función del modo de administración usado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento. Por ejemplo, la experiencia en la técnica permite comenzar con dosis de los compuestos a niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado, e incrementar gradualmente la dosis hasta

- alcanzar el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los polipéptidos se puede variar a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto al día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto a tratar. Un medicamento contiene en general de alrededor de 0,01 mg a alrededor de 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a alrededor de 100 mg del ingrediente activo. Se suministra una cantidad eficaz del fármaco generalmente a un nivel de dosis de 0,0002 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de alrededor de 0,001 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal al día.
- En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método para proporcionar de manera transitoria células GMP a un paciente que lo necesita, que comprende una etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de M-CSF o un agonista del receptor de M-CSF.
- En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas en un paciente que lo necesita, que comprende una etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de M-CSF o un agonista del receptor de M-CSF.
- Una "cantidad terapéuticamente eficaz" quiere decir una cantidad suficiente para conseguir una concentración de polipéptido que es capaz de prevenir, tratar o frenar la enfermedad a tratar. Los expertos en la técnica pueden determinar de manera rutinaria tales concentraciones. La cantidad del polipéptido realmente administrada será determinada generalmente por un médico o un veterinario, a la luz de las circunstancias relevantes, que incluyen la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto concreto administrado, la edad, el peso, y la respuesta del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y similares. Los expertos en la técnica también apreciarán que la dosis puede depender de la estabilidad del polipéptido administrado.
- En una realización particular, la presente descripción se refiere a un método para proporcionar de manera transitoria células GMP a un paciente sometido a un trasplante de CMH, que comprende una etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de M-CSF o un agonista del receptor de M-CSF de manera simultánea y/o posteriormente al TCMH.
- En otro aspecto, la presente descripción se refiere además a un método para la prevención o el tratamiento de la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas en un paciente sometido a un trasplante de CMH, que comprende una etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de M-CSF o un agonista del receptor de M-CSF de manera simultánea y/o posteriormente al TCMH.
- Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "de manera simultánea" significa que el polipéptido de interés se administra al paciente receptor el mismo día que el trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH).
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "posteriormente" significa que el polipéptido de interés se administra al paciente receptor después del TCMH, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después del TCMH.
- En una realización, el tratamiento con un polipéptido de M-CSF o un agonista del receptor de M-CSF se administra en más de un ciclo, es decir, la administración de un polipéptido de M-CSF o un agonista del M-CSF se repite al menos una vez.
- Por ejemplo, se pueden administrar de 2 a 10 ciclos o incluso más, dependiendo del estado del paciente específico y de la respuesta. Los intervalos, es decir, el tiempo entre el inicio de dos ciclos subsiguientes, son en general de varios días.
- El tratamiento *ex vivo* con un polipéptido de M-CSF o un agonista del receptor de M-CSF mejora la recuperación mieloide del paciente tras regímenes de terapia citorrreductora mieloablativa o mielosupresora para prevenir o tratar la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas en un paciente sometido a TCMH.
- Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "injerto de células madre hematopoyéticas" se refiere a un número óptimo de células madre hematopoyéticas/kg del paciente para realizar con éxito un trasplante de células madre. El injerto de células madre hematopoyéticas puede variar de manera generalizada en función de la edad, el peso y el estado de salud del paciente, la naturaleza y la gravedad de la indicación. Los intervalos de dosis adecuados para las CMHs varían según estas consideraciones.
- Existen tres fuentes principales de células madre hematopoyéticas (CMH) útiles como injerto de células madre hematopoyéticas: médula ósea (MO), sangre periférica, y sangre de cordón umbilical. La sangre de cordón umbilical (SCU) es una fuente alternativa práctica a otras fuentes de progenitores hematopoyéticos (p.ej., médula ósea y sangre periférica movilizada) para el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas de donantes emparentados y no emparentados.
- Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "célula madre hematopoyética" o "CMH" se refieren a una célula multipotente clonogénica, auto-renovable, capaz de diferenciarse finalmente en todos los tipos de células del sistema hematopoyético, lo que incluye las células B, células T, células NK, células dendríticas linfoides, células

dendríticas mieloides, granulocitos, macrófagos, megacariocitos, y células eritroides. Como las otras células del sistema hematopoyético, las CMHs se definen en general por la presencia de un grupo característico de marcadores celulares. Los fenotipos de marcadores útiles para identificar las CMHs son los conocidos habitualmente en la técnica. Para las CMHs humanas, los fenotipos de marcadores celulares incluyen preferiblemente CD34⁺ CD90(Thyl)⁺ Lin⁻. Las CMHs humanas se pueden caracterizar adicionalmente como positivas para AC133; negativas/bajas para CD38; y negativas para los marcadores específicos de linaje CD2, CD3, CD19, CD16, CD14, CD15, y Glicoforina A. Normalmente, las poblaciones de células usadas en la presente descripción tienen al menos alrededor de un 50% de las células presentes con el fenotipo de células madre hematopoyéticas, más normalmente al menos alrededor del 75% de las células presentes, preferiblemente al menos alrededor del 85% de las células presentes, y el valor puede ser tan alto como alrededor del 95% de las células presentes.

"Fenotipado de marcadores" se refiere a la identificación de marcadores o antígenos en las células para determinar su fenotipo (p.ej., estado de diferenciación y/o tipo celular). Esto se puede realizar mediante inmunofenotipado, que usa anticuerpos que reconocen los antígenos presentes en una célula. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, pero en general se eligen para que tengan una reactividad cruzada mínima con otros marcadores celulares. Se debe entender que ciertos marcadores de diferenciación celular o de superficie celular son exclusivos de la especie animal de la que se obtienen las células, mientras otros marcadores celulares serán comunes entre especies. A estos marcadores que definen tipos celulares equivalentes entre especies se les da la misma identificación de marcador, aunque existen diferencias entre especies en la estructura (p.ej., la secuencia de aminoácidos). Los marcadores celulares incluyen moléculas de la superficie celular, también denominadas en ciertas situaciones como marcadores de diferenciación celular (CD), y marcadores de expresión génica. Los marcadores de expresión génica son los grupos de genes expresados indicativos del tipo celular o estado de diferenciación. En parte, el perfil de expresión génica reflejará los marcadores de la superficie celular, aunque pueden incluir moléculas que no son de la superficie celular.

En una realización, el injerto de células madre hematopoyéticas se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre periférica movilizada o una médula ósea (MO) obtenida de un donante (injerto alogénico o autólogo), o una muestra de sangre de cordón umbilical (SCU).

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión injerto "estimulado" se refiere a un injerto que se ha activado o cambiado para que exprese ciertos genes para proporcionar de manera específica y transitoria una cantidad incrementada de células progenitoras de granulocitos/monocitos (GMP) sin comprometer la actividad de las células madre. La estimulación de un injerto de células progenitoras hematopoyéticas obtenido de sangre periférica, médula ósea, o sangre de cordón umbilical permite además reducir el riesgo de infección en el paciente.

La estimulación se puede dar incubando las células durante un periodo de al menos 1 hr, preferiblemente de 1 hr a dos semanas; de 1 a 10 días, de 5 a 10 días o 5 a 7 días, con el polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF como se describió anteriormente, y después opcionalmente separando la citocina de las células e infundiendo las células estimuladas en el paciente receptor.

El polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF de la presente descripción pueden estar presentes en la mezcla de incubación en una cantidad de al menos alrededor de 1 ng/ml, de alrededor de 1 a 1000 ng/ml, de alrededor de 10 a 500 ng/ml, de alrededor de 20 a 250 ng/ml.

La presente descripción se refiere además a un método para la prevención o el tratamiento de la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas en un paciente sometido a trasplante de CMH, que comprende una etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un injerto de células madre hematopoyéticas estimuladas en presencia de un polipéptido de M-CSF o un agonista del receptor de M-CSF.

El injerto de células madre hematopoyéticas, estimuladas o no, y el polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF se pueden combinar en una formulación y administrarlos de manera simultánea. Sin embargo, también se pueden administrar por separado, mediante el uso de diferentes composiciones. Además, se indica que se pueden administrar en diferentes momentos.

La presente descripción se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deberían interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras:

Figura 1: M-CSF activa el regulador principal mieloide PU.1 en CMH.

a-c) Perfil de FACS representativo (a) y cuantificación de la expresión de GFP en CMH (b) o CMH CD150^{hi} (c) de ratones PU.1-indicador de GFP 16 h tras la inyección de control (PBS) o de M-CSF. ***p = 0,009; **p = 0,03.

d) Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de la expresión de PU.1 normalizada respecto de la expresión de GAPDH (U.R.) en CMH clasificadas tras 16 h de cultivo en ausencia o presencia de M-CSF, GM-CSF o G-CSF. Las barras de error muestran la desviación estándar de los duplicados.

Figura 2: Formación continua de imágenes de vídeo de la generación de células PU.1+ a partir de CMH individuales negativas para PU.1.

- 5 a) Intensidad de fluorescencia de GFP a intervalos de 10 minutos (puntos) y mediana deslizando (líneas) a lo largo de un tiempo de observación de 12 h de 3 CMH individuales clasificadas negativas para GFP de ratones PU.1- indicador de GFP después de 18 h en cultivo con M-CSF, representativa de las células cuantificadas en la Fig. 2e (n = 39). Verde: células que activan GFP, negro: células que permanecen negativas para GFP.
- b) Fotos fijas tomadas en los tiempos indicados mediante símbolos en a) de campos con 2 CMH representativas (células A,B) que muestran la activación de PU.1 en diferentes puntos de tiempo. La célula C estuvo fuera del campo mostrado.
- 10 c) Fotos fijas tomadas a intervalos de 40 min a lo largo de 8 h de 3 CMH representativas en cultivo con M-CSF sin (célula C) o con activación de PU.1 (células A,D), representativas de las células cuantificadas en la Figura 2e (n = 39).
- d) Cuantificación de las células PU.1+ derivadas de CMH negativas para PU.1 (células asignadas) con (n=39) o sin M-CSF (n=42) como porcentaje de las células totales después de un periodo de observación de 24 h. * p<0,1.
- 15 e) Transcurso en el tiempo de la activación de PU.1 en CMH negativas para PU.1 de las células mostradas en d) a lo largo de un periodo de observación de 24 h.

Figura 3: M-CSF activa PU.1 y ordena la identidad mieloide en CMH individuales.

- a) Células PU.1+ individuales con un perfil de expresión génica mieloide (azul) o que expresan genes de otro linaje (blanco) como porcentaje de las células totales. *** p=0,009 (0h), y 0,005 (-M-CSF).
- 20 b) Diseño experimental para el trasplante de CMH PU.1- y PU.1+ clasificadas de ratones CD45.2 PU.1-GFP estimulados con M-CSF in vivo en receptores CD45.1 irradiados de manera sub-lethal y análisis de las células de la progenie después de 2 semanas en el bazo.
- c,d) Perfiles de FACS representativos (c) y cuantificación de la proporción (d) de progenitores GMP y MEP del donante derivados de CMH PU.1- o PU.1+ trasplantados antes o después de la estimulación con M-CSF in vivo. **p = 0,05, ***p = 0,01, n = 4, 8, 4.
- 25

Figura 4: M-CSF estimula una preferencia de diferenciación mieloide reversible, dependiente de PU.1 en CMH individuales in vivo.

- a) Proporción de progenitores GMP respecto de MEP del donante en los bazos de receptores irradiados de manera sub-lethal 2 semanas después del trasplante de CMH sensibilizadas con M-CSF in vivo o de control. El diseño experimental se muestra en la Figura 6. ***p = 0,003, n = 8, 9.
- 30 b) Contribución del donante a la sangre de ratones reconstituidos competitivamente 4 semanas y 6 semanas después del trasplante de CMH estimuladas con M-CSF o de control, expresadas en forma de una proporción de células mieloides CD11b+ respecto de plaquetas o células linfoides CD19+. ***p = 0,01, n = 10,6, *p = 0,07, n = 6, 4.
- c) Contribución del donante a células mieloides Mac+ en el bazo de receptores irradiados de forma sub-lethal 2 semanas después del trasplante de control o de CMH estimuladas con M-CSF con alelos de PU.1 de control (fl/fl) o delecionados (Δ/Δ). **p = 0,05, n = 6, 4, 5.
- 35

Figura 5: Potencial de diferenciación de células PU.1+ inducidas con M-CSF.

- a) Diseño experimental para el trasplante de CMH clasificadas CD45.2 PU.1- antes y después de la inducción de células PU.1+ en cultivo con M-CSF en receptores CD45.1 irradiados de manera sub-lethal y análisis de las células de la progenie después de 2 semanas en el bazo.
- 40 b,c) Cuantificación de la proporción de progenitores GMP respecto de MEP del donante (b) y GMP totales (c) derivadas de CMH PU.1- trasplantadas antes o de células PU.1+ trasplantadas después del cultivo con M-CSF. **p = 0,02, *p = 0,07, n = 6, 7.

Figura 6: Potencial de diferenciación de CMH estimuladas con M-CSF.

- a) Diseño experimental para el trasplante de CMH CD45.2 estimuladas con M-CSF in vivo en receptores CD45.1 irradiados de manera sub-lethal y análisis de las células de la progenie después de 2 semanas en el bazo o 4 semanas en la sangre.
- b) Porcentaje de progenitores de GMP y MEP en células donantes totales derivadas de CMH tratadas con control (PBS) o CMH estimuladas con M-CSF en el bazo 2 semanas después del trasplante.
- 50 *p = 0,1, **p = 0,04, n = 4, 4

c) Cuantificación de la proporción de monocitos CD11b+ SSClo donantes respecto de células B CD19+ en la sangre 4 semanas después del trasplante. ***p = 0,009, n = 8, 4.

Figura 7: Trasplante competitivo de CMH estimuladas con M-CSF

5 a) Diseño experimental para el trasplante competitivo de CMH (CD150+CD34-CD135-KSL) estimuladas con M-CSF in vivo clasificadas mediante FACS de ratones actina-GFP CD45.2 junto con CMH competitivas CD45.2 en receptores CD45.1 irradiados de manera letal y análisis de la contribución de las células sanguíneas.

b) Estrategia de clasificación para la cuantificación de plaquetas derivadas de CMH actina-GFP+, células sanguíneas linfoides y mieloides.

10 c) Contribución del donante a la sangre de ratones reconstituidos competitivamente 4, 6 y 14 semanas después del trasplante de CMH estimuladas con M-CSF o de control, expresada como el porcentaje de células del donante GFP+ en células mieloides Mac+, células B CD19+, plaquetas CD61+ (4, 6 y 14 semanas) y células T CD3e (14 semanas) y normalizado respecto de la contribución de GFP total en el compartimento donante CD45.2. ** p = 0,03, n = 6, 4.

15 Figura 8: La estimulación con MCSF tras el trasplante de células madre hematopoyéticas y progenitoras (HS/PC) protege contra la infección por *Pseudomonas aeruginosa* (p<0,01).

a) Tratamiento con rhMCSF

b) Tratamiento con mMCSF de Baculovirus

Figura 9: La estimulación con MCSF después de trasplante de HS/PC redujo la carga tisular bacteriana (***P<0,01).

20 Figura 10: La estimulación con MCSF tras el trasplante de HS/PC protege contra la infección por *Aspergillus fumigatus* (p<0,01).

a) Tratamiento con rhMCSF

b) Tratamiento con mMCSF de Baculovirus

EJEMPLO 1: M-CSF ORDENA EL DESTINO DE LINAJE MIELOIDE EN CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS INDIVIDUALES.

25 Materiales y Métodos

Resumen de los métodos: Se llevó a cabo la citometría de flujo, el trasplante de médula ósea y la inmunofluorescencia *in vivo* de CMH básicamente como se describió³. Se llevó a cabo una PCR en tiempo real basada en procesos nanofluídicos con células individuales mediante el uso de un sistema BioMark HD y matrices dinámicas 48.48 (Fluidigm, CA, EE.UU.) y análisis de videomicroscopía según las normas propuestas²⁴. Los detalles de los procedimientos y los reactivos se describen en los Métodos Suplementarios.

30 *Ratones:* Los ratones CD45.1 y C57B1/6 se obtuvieron de Charles River. Se han descrito ratones *PU.1-GFP*³¹ M-CSFR^{-/-27} y PD.1^{fl/fl}³². Se usaron receptores CD45.1 de la misma edad y sexo que se reconstituyeron como se describió³ con hígado fetal CD45.2 de embriones de t.n. o M-CSFR^{-/-27} y médula ósea PU.1^{fl/fl} o PU.1^{fl/fl}::MxCre, para aislar CMH KSLF CD150+ CD34- no antes de 8 semanas tras la reconstitución. Para las inyecciones *in vivo*, se inyectaron 10 µg/M-CSF de ratón, 5 mg/kg de LPS (*E. coli* 055:B5) o células clasificadas en 100 µl de PBS en el seno retro-orbital. Para el trasplante de CMH, se clasificaron 400 CMH KSLF CD150+ CD34- de ratones CD45.2 y se mezclaron con 100.000 células portadoras Lin⁺ Sca⁻ CD45.1 antes de inyectarlas en ratones receptores CD45.1 irradiados de manera sub-letal (4,5 Gy). Para los trasplantes competitivos, se aislaron 1300 CMH KSLF CD150+, CD34 16 h después de la inyección de control o de 10 µg de M-CSF de ratones actina-GFP CD45.2³³, mezcladas con un número igual de CMH competitivas CD45.2, y se inyectaron con 300.000 células portadoras Lin⁺ Sca⁻ RC CD45.1 en receptores CD45.1 irradiados de manera sub-letal (4,5 Gy). La contribución de plaquetas, células B CD19+ y células mieloides CD11b+ se analizó después de 4 y 6 semanas en la sangre de los ratones con al menos un 5% de células donantes GFP+. Para la delección de PU.1, se inyectaron de manera intraperitoneal a ratones reconstituidos PU.1^{fl/fl} o PU.1^{fl/fl}::MxCre 5 µg/g de ácido poliinosínico:policitídílico 7 y 9 días antes de la inyección de control (PBS) o de 10 µg de M-CSF. Todos los experimentos en ratones se llevaron a cabo en condiciones específicas exentas de patógenos de acuerdo con las directrices institucionales.

35 *Análisis FACS:* Para la clasificación y el análisis mediante FACS, se usaron protocolos de tinción descritos³ y definiciones de células madre y progenitoras publicadas³⁴, el equipo FACSCanto, LSRII y FACSARIAIII y el programa informático DIVA™ (Becton-Dickinson), analizando solamente las poblaciones con al menos 200 eventos. Para el análisis de CMH, se usaron anticuerpos anti-CD34-FITC (clon RAM34, BD Biosciences), anti-CD135-PE (clon A2F10.1, BD Biosciences), anti-CD150-Pe-Cy7 (clon TC15-12F12.2, BioLegend), anti-CD117-APC-H7 (clon 2B8, BD Biosciences), anti-Sca-1-Pe-Cy5 (clon D7, BioLegend), anti-CD48-APC (clon HM48-1, BioLegend). Desviándose de esto, o adicionalmente, se usaron anticuerpos anti-CD34 Alexa 700 (clon RAM34, BD Biosciences), anti-CD16/32 PE

(clon 2.4G2, BD biosciences), anti-CD11b PE-CF594 (clon M1/70, BD biosciences), anti-CD19PE-Cy7 (clon 1D3, BD biosciences), anti CD45.2 APC (clon 104, BD biosciences) y anti CD45.1 Pacific Blue (clon A20, BD biosciences) para el análisis de las células progenitoras y sanguíneas. Se usó un colorante de células muertas LIVE/DEAD Fixable Violet (Invitrogen) como marcador de viabilidad.

- 5 *Inyección intraesplénica de CMH clasificadas y microscopía de fluorescencia:* Para el análisis de CMH *in vivo*, se tiñeron 1500 a 7000 CMH KSLF CD150⁺ CD34⁻ clasificadas mediante FACS 10 min a 37 °C con 3 μM de CFSE (Invitrogen) en PBS / 0,5% de BSA, se lavaron 3x en PBS / 0,5% de BSA y se inyectaron en 30 μl de PBS (que contenía o no 1 μg de anticuerpo de control de isotipo o AFS98 α-M-CSFR²⁶ o 2 μM de inhibidores GW2580, 10 μM de Ly29400, 10 μM de PD98059 o 2 μM de SU6656 en un 0,9% de DMSO) en el bazo de los ratones anestesiados.
- 10 Después de 24 h, los bazos se incrustaron en OCT (Tissue-Tek, Sakura) y se congelaron a -80 °C. Se prepararon cortes en Cryostat (5 μm) del órgano completo, se secaron y se fijaron 10 min en un 4% de PFA/PBS a temperatura ambiente (TA), y cada 10^o corte se procesó adicionalmente. Después de lavados en PBS, los portaobjetos se bloquearon durante 1 hora a TA en PBS / 2% de BSA / 1% de suero de asno / 1% de FCS / 0,1% de saponina, se incubaron durante 36 h a 4 °C con anticuerpo policlonal anti-PU.1 (Santa Cruz) en PBS / 0,05% de saponina (1:50),
- 15 se lavaron y se incubaron con anticuerpo secundario de asno anti-conejo Alexa 546 (Molecular probes) en PBS / 0,05% de saponina (1:500). Todas las muestras de inmunofluorescencia se montaron con reactivo antiapagamiento ProLong Gold DAPI (Molecular probes) y se analizaron mediante microscopía multifuorescente con un equipo Zeiss Axioplan 2. Todas las células CFSE⁺ se analizaron con respecto a la expresión de PU.1 hasta ≥30 o ≥ 50 células, tal como se indica. Los recuentos celulares y la tinción los verificó un segundo técnico de microscopía cualificado con enmascaramiento de la identidad de las muestras. Se obtuvieron fotografías de alta resolución mediante microscopía confocal con un equipo Leica SP5X.

- Cultivo in vitro de CMH:* Se clasificaron CMH KSLF CD150⁺ CD34⁻ o CMH KSLF CD150⁺ CD34⁻ CD48⁻ (células individuales) en medio S-clone SF-03 (Sanko Jyunyaku) con un 10% de FBS complementado con 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin (ambas de Invitrogen) y se cultivaron en placas de 96 pocillos en forma de U sin revestir (Greiner) en 100 μl de SCM, 20 ng/ml de rSCF, 50 ng/ml de rTPO +/- 100 ng/ml de rM-CSF o 100 ng/ml de rGM-CSF o 100 ng/ml de rG-CSF. Todas las citocinas fueron murinas y de PeproTech. La viabilidad celular se analizó mediante Anexina V y tinción FACS con yoduro de propidio³⁵.
- 25

- PCR cuantitativa en tiempo real:* Se aisló el ARN total y se sometió a transcripción inversa con kit μMACS One-step T7 Template (Miltenyi Biotec) y se analizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real mediante el uso de TaqMan PCR Universal Master Mix y un sistema de detección de secuencias 7500 Fast Real Time PCR System (ambos de Applied Biosystem), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.
- 30

- Determinación del perfil de expresión génica de células individuales:* Se clasificaron células individuales mediante el uso del módulo Autoclone en un clasificador AriaIII (Becton-Dickinson) directamente en una placa de 96 pocillos en la mezcla de reacción CellsDirect (Invitrogen). La lisis de células individuales, la síntesis de cADN y la amplificación se llevaron a cabo según el protocolo de desarrollo avanzado de Fluidigm, y la PCR en tiempo real microfluidica de células individuales con el uso de Dynamic Array IFCs (Biomark Fluidigm) la llevó a cabo un técnico cualificado de Fluidigm Inc. Los productos preamplificados (22 ciclos) se diluyeron 5 veces antes del análisis con Universal PCR Master Mix y ensayos de expresión génica TaqMan inventariados (ABI) en 96.96 Dynamic Arrays en un sistema BioMark (Fluidigm). Se calcularon los valores Ct con el programa informático del sistema (BioMark Real-time PCR Analysis; Fluidigm) y se filtraron según un grupo de reglas de control de calidad resumidas a continuación.
- 35
- 40

Filtro de genes:

- (a) Para cada gen, lo que incluye los controles, se eliminaron los datos con CtCall = FAILED y CtQuality < umbral.
- (b) Para cada gen, lo que incluye los controles, se eliminaron los CtValues > = 32,0 para eliminar los genes con una expresión muy baja.
- 45 (c) Para cada gen, lo que incluye los controles, los genes con una diferencia de CtValues duplicados > = 2,0 se consideraron incoherentes y se eliminaron.

Filtro de muestras:

- (a) Si el gen de control (Gapdh) no se expresó o se eliminó según los filtros de genes (a-c), se eliminó toda la muestra.
- 50 (b) Si la media de los valores Ct de todos los genes en una fila fue >= 27,0 se eliminó toda la fila de la muestra.

- Formación de imágenes a intervalos de tiempo y análisis:* Cuando fue posible, los protocolos de videomicroscopía siguieron las directrices propuestas²⁴. En detalle, las CMH KSLF CD150⁺ CD34⁻ clasificadas mediante FACS de médula ósea de ratón C57/B16 de t.n. o CMH KSLF CD150⁺ CD34⁻ GFP-negativas de médula ósea de ratón PU.1-indicador de GFP³¹ se suspendieron en SCM complementado con 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin, 20 ng/ml de rSCF, 50 ng/ml de rTPO +/- 100 ng/ml de rM-CSF y se colocaron en placas Ibdid μ-Slides VI(0.4) (Biovalley SA, Francia). La microscopía a intervalos de tiempo se llevó a cabo mediante el uso de un sistema
- 55

Cell Observer (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemania) a 37 °C y un 5% de CO₂. Se tomaron imágenes cada 10 minutos mediante el uso de objetivos 10x (A-plan 10x/0.45 Ph1) o 40x (Plan-Apochromat 40x/0.95 Korr M27) con campo claro y fluorescencia (filtros de GFP: EX BP 470/40; a 350 ms) con una cámara monocroma CoolSNAP_{HQ2} (Photometrics) con un agrupamiento de píxeles 2x2 y una fuente de haluro metálico de 120 W para la iluminación de fluorescencia. Para el análisis de las imágenes, se obtuvo una matriz de 4x4 imágenes para cada punto de tiempo. Las imágenes se combinaron con el programa informático AxioVision (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemania) y se procesaron con el programa informático Fiji³⁶ mediante el uso de una ligera sustracción del fondo con el algoritmo Rolling Ball y un desenfoque gaussiano de 1 píxel. Para la sustracción del fondo de las imágenes de campo claro, se sustrajo la mediana de la proyección en z de la serie de imágenes a intervalos de tiempo. El seguimiento de células individuales se llevó a cabo con los comandos básicos de los programas informáticos ImageJ³⁷ y Fiji³⁶, y con el módulo adicional de seguimiento específico MTrackJ³⁸ en modo manual. Se siguió manualmente cada célula fotograma a fotograma en el canal de campo claro, y se controló de manera cruzada mediante dos especialistas en microscopía. Se rechazaron las células con una morfología o tamaño no convencional. La señal de fluorescencia se midió como la diferencia de intensidad máxima menos la mínima en una región de interés (ROI) definida alrededor de cada célula. Las propiedades y comportamiento de cada célula (división celular, muerte celular, posición, incremento de fluorescencia) se documentaron manualmente para construir curvas acumulativas. Se usaron los programas informáticos R³⁹ y Excel (Microsoft Corporation) para administrar los datos y construir gráficas.

Análisis estadístico: Se calcularon los valores P mediante una prueba de Mann-Whitney non paramétrica bilateral para las comparaciones de muestras directas o una prueba chi² de Pearson para las proporciones (alfa=0,05). Las representaciones de cajas y bigotes muestran las medianas (líneas), los cuartiles superiores e inferiores (cajas) y los valores atípicos extremos (bigotes punteados).

Resultados

Las citocinas específicas de linaje, tales como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), se pueden inducir intensamente durante el estrés fisiológico o la infección^{10,11}, e incrementan la producción de células maduras a partir de progenitores asignados a un linaje^{1,2}. Según el modelo predominante, sin embargo, en general no se cree que influyan directamente en las decisiones de diferenciación de las células madre hematopoyéticas (CMH)^{9,12,11}. La elección del destino celular de CMH se ha explicado tradicionalmente mediante modelos estocásticos¹⁴. Desde este punto de vista, el ruido transcripcional¹⁵ y las variaciones aleatorias en los factores de transcripción competitivos que determinan el linaje conducen a cambios con antagonismo cruzado que inician la elección del linaje^{4,5,6,7}, mientras se cree que las citocinas solamente actúan sobre las células de la progenie resultantes estimulando su supervivencia y proliferación^{8,9}. Un ejemplo clave de tal regulador principal es el factor de transcripción PU.1 que induce la diferenciación mielo-monocítica^{16,17}. En general se desconoce si las señales externas podrían controlar la activación inicial de tales reguladores principales intrínsecos. Debido a que las CMH deficientes en el factor de transcripción MafB están sensibilizadas a la activación de PU.1 en respuesta a M-CSF³, se ha investigado si los niveles de M-CSF sistémicos elevados podrían inducir PU.1 y ordenar el destino mielo-monocítico en CMH de t.n. sin una modificación anterior del equilibrio de factores de transcripción.

Se observó que el lipopolisacárido (LPS), una molécula mimética potente de la infección bacteriana que estimula niveles sistémicos elevados de M-CSF¹¹, indujo una estimulación de GFP en CMH a largo plazo (CD117+sca+Lin-CD135-CD34-CD150+) de ratones PU.1-indicador de GFP¹⁸. De forma coherente con la expresión del receptor de M-CSF (M-CSFR) en CMH^{3,19}, la inyección intravenosa directa de M-CSF recombinante también indujo significativamente la activación incrementada de PU.1 en CMH después de 16 h (Figura 1a,b). El tratamiento no provocó un cambio significativo en la expresión de M-CSFR o MafB, lo que contradice la selección de CMH estimuladas mieloides con niveles altos de M-CSFR o bajos de MafB. M-CSF tampoco indujo cambios en la proporción de CMH CD150^{hi}, que se informó que tuvo una tendencia al linaje mieloide²⁰, en CMH positivas o negativas para GFP y PU.1 activado en un grado similar en CMH CD150^{hi} (Figura 1c) como en CMH totales (Figura 1a,b). Finalmente, las CMH CD150^{hi} cultivadas no revelaron una proliferación o ventaja de supervivencia en presencia de M-CSF. En conjunto, estos datos contradijeron la amplificación o supervivencia selectiva de una subpoblación de CMH preexistente, e indicaron que M-CSF podría inducir la expresión de PU.1 en CMH.

Como se muestra en la Figura 1d, el efecto de M-CSF sobre las células madre fue directo y específico, ya que las CMH purificadas mediante FACS mostraron una expresión incrementada de PU.1 después de 16 h en cultivo con M-CSF, pero no con GM-CSF o G-CSF, citocinas que también se pueden liberar durante una infección²². Los cambios observados en la expresión génica no se pueden explicar por la selección dependiente de M-CSF de las células PU.1+, ya que la videomicroscopía de las CMH cultivadas no mostró una ventaja en la proliferación o supervivencia en M-CSF, y PU.1 se indujo antes del inicio de la división celular. La observación continua de CMH clasificadas negativas para GFP individuales de ratones PU.1-GFP mediante formación de imágenes de vídeo confirmó que M-CSF pudo inducir la expresión de PU.1 en las células previamente negativas para PU.1 (Figura 2a-c). Se registró el destino de CMH entre 18 horas y 42 horas de cultivo, cuando teóricamente se podía dar tanto la inducción de PU.1 en células previamente negativas como la división de células PU.1+. Al final del periodo de observación de 24 h, se desarrollaron más del doble de células PU.1+ con M-CSF que en las condiciones de control (Figura 2d) y el seguimiento del origen de estas células reveló que todas las células PU.1+ procedieron de células previamente negativas para PU.1, pero ninguna de divisiones de células PU.1+. Aunque la ausencia de división de células PU.1+ se puede deber parcialmente a los efectos fototóxicos de la excitación de GFP^{23,24}, se pudo llegar a la conclusión de

que el incremento observado en las células PU.1+ se debió completamente a la activación inducida por M-CSF del indicador de PU.1. Estos eventos de asignación de activación de PU.1 se dieron 8 horas antes y a una velocidad mayor a lo largo de todo el periodo de observación en presencia de M-CSF (Figura 2e). Los resultados indicaron que M-CSF podría incrementar directamente la activación del promotor de PU.1 en CMH individuales, previamente negativas para PU.1.

Para investigar adicionalmente si la activación de PU.1 inducida por M-CSF cambió la identidad celular de CMH individuales, se analizó el perfil de expresión de mRNA de células individuales mediante PCR en tiempo real nanoflúidica con matrices dinámicas Fluidigm™. De forma coherente con su identidad de células madre, casi todas las CMH recién aisladas expresaron genes asociados a células madre y progenitoras, y alrededor de la mitad no expresaron genes específicos de linaje (lin-) o múltiples genes específicos de linaje (mezcla). El resto mostraron principalmente una estimulación de linaje megacariocítico (Meg), megacariocítico-eritroide (MegE) o mielóide. El cultivo durante 16 h sin M-CSF condujo a un número incrementado de células con un perfil de linaje mezclado a costa de los perfiles Meg y lin-. En contraste, el cultivo en presencia de M-CSF indujo un fuerte incremento de células con un distintivo de expresión génica mielóide. De forma coherente con los resultados de microscopía de video, el incremento de la expresión génica mielóide estuvo asociado a una duplicación del número de células PU.1+. De manera interesante, este incremento se debió completamente a células PU.1+ con un distintivo mielóide que no expresó genes de ningún otro linaje. En contraste, el número de células PU.1+ que también expresaron genes no mieloides siguió siendo aproximadamente constante (Figura 3a). En conjunto, esto indicó que las células PU.1+ inducidas por M-CSF habían asumido una identidad de células mieloides. Para determinar si este cambio de la expresión génica reflejó una elección de linaje mielóide funcional *in vivo*, se comparó el potencial de diferenciación de CMH PD.1- sin estimular con CMH PU.1- y PD.1+ después de la estimulación *in vivo* con M-CSF (Figura 3b). El análisis de progenitores en el bazo 2 semanas después del trasplante de estas poblaciones reveló una proporción mayor de progenitores de granulocitos/macrófagos (GMP) respecto de progenitores megacariocíticos/eritroides (MEP) que se desarrollaron a partir de CMH PU.1+ que a partir de CMH PU.1- (Figura 3c,d). Se observó un incremento similar del potencial de diferenciación mielóide para las células PU.1+ derivadas de CMH PU.1- estimuladas con M-CSF en cultivo (Figura 5a-c). En conjunto, estos datos mostraron que PU.1 inducido por M-CSF condujo a un cambio al destino de células mieloides en CMH individuales.

Para investigar adicionalmente si M-CSF también pudo inducir un cambio del destino celular de CMH individuales *in vivo*, se trasplantaron CMH marcadas con CFSE al bazo, un sitio de hematopoyesis extra-medular con nichos adaptados de células madre^{3,25}, y se analizó la expresión de la proteína PU.1 endógena mediante inmunofluorescencia en CMH individuales después de 24 h. Mientras la gran mayoría de CMH fueron PU.1 negativas inmediatamente después del trasplante, prácticamente todas tuvieron activado PU.1 después de la transferencia a bazos de hospedadores expuestos a LPS. Este efecto dependió principalmente de la señalización de M-CSF, ya que un anticuerpo bloqueante contra el receptor de M-CSF²⁶ inhibió intensamente la activación de PU.1. Además, la inyección directa de M-CSF recombinante dio como resultado una inducción intensa similar de PU.1 en las CMH trasplantadas. Este efecto pareció ser completamente autónomo celularmente, ya que una CMH deficiente de receptores de M-CSF (M-CSFR^{-/-})²⁷ no mostró una activación mayor de PU.1 en los receptores estimulados con M-CSF que en los de control. De forma similar, los inhibidores de moléculas pequeñas del M-CSFR o quinasas PI3K, ERK y SRC que actúan como señales posteriores al receptor²⁸ también impidieron la inducción de PU.1, de forma coherente con la estimulación de los activadores transcripcionales del gen *pu.1* por estas rutas. Además, el trasplante de CMH CD45.2 estimuladas con M-CSF *in vivo* en receptores CD45.1 irradiados de forma sub-lethal reveló una proporción incrementada de progenitores GMP respecto de MEP en el bazo después de 2 semanas (Figura 4a, Figura 6a,b) y una proporción incrementada de células mieloides respecto de las linfoides en sangre periférica después de 4 semanas (Figura 6c). En los ensayos de trasplante competitivo, las CMH estimuladas con M-CSF también mostraron una ventaja mielóide en comparación con la contribución de plaquetas y células linfoides a las 4 semanas en la sangre que se reequilibró después de 6 semanas, y no se comprometió a largo plazo la contribución multi-linaje (Figura 4b, Figura 7). Finalmente, esta preferencia de diferenciación mielóide de CMH sensibilizadas con M-CSF se pudo eliminar mediante la delección de PU.1 (Figura 4c). En conjunto, estos resultados indicaron que M-CSF pudo ordenar directamente un cambio en la identidad celular de CMH individuales *in vivo*, que dio como resultado una preferencia por la diferenciación mielóide dependiente de PU.1 reversible.

Los resultados muestran que en condiciones de estrés hematopoyético de infección, los niveles sistémicos elevados de M-CSF pueden ordenar directamente una expresión génica mielóide y una preferencia de diferenciación de CMH. Esto desafía la visión actual de la acción de las citocinas, y cómo las CMH hacen la decisión de diferenciación. Mientras se creía habitualmente que las citocinas actuaban sobre progenitores de linaje asignado, en el presente documento se demuestra que las células madre son objetivos directos de la instrucción del linaje por las citocinas. Se ha demostrado que CMH proliferan en respuesta a señales características de infecciones bacterianas²⁹ o virales³⁰, pero sin cambiar la expresión génica específica del linaje o el potencial de diferenciación. En línea con el paradigma predominante de la acción selectiva de las citocinas, se ha propuesto que los diferentes subtipos de células madre podrían tener una ventaja selectiva en respuesta a diferentes estímulos²¹. Tal mecanismo es difícil de distinguir de los mecanismos instructivos que se basan en poblaciones. En la presente memoria se han empleado múltiples ensayos de análisis de células individuales en cultivo e *in vivo* en una ventana de tiempo antes del inicio de la división celular para distinguir los cambios inducidos de la especificación del linaje a partir de los mecanismos selectivos. Estos datos indican que M-CSF puede cambiar directamente la identidad de las células madre mediante

la activación del regulador principal mieloide PU.1 a nivel del promotor, el mensaje y la proteína, independientemente de la supervivencia o proliferación selectivas. La sensibilización multi-linaje de la expresión génica en las células madre hematopoyéticas se ha interpretado en general como una indicación de que las decisiones del destino celular inicial están controladas únicamente por fluctuaciones estocásticas del equilibrio de los factores de transcripción específicos del linaje^{4,5,6,12,13}. Los datos indican ahora que las citocinas no solamente pueden amplificar las elecciones aleatorias, sino también activar directamente reguladores clave de la especificación del linaje, tales como PU.1, para ordenar el destino del linaje de células madre hematopoyéticas para inducir una respuesta adaptada a una agresión de la progenie. Como el tratamiento con M-CSF puede incrementar de manera transitoria la producción de una progenie mieloide sin comprometer la actividad de las células madre, puede ser útil para mejorar las citopenias mieloides, en particular para proteger a los pacientes de la infección después de un trasplante de células madre.

EJEMPLOS 2 y 3: IMPACTO FUNCIONAL DE MCSF.

Para estudiar el impacto funcional de la asignación de CMH mediada por MCSF durante las infecciones, se llevaron a cabo dos series diferentes de experimentos. En todos los experimentos, tras la irradiación letal de los receptores, se injertaron 2500 HS/PC con 200.000 células portadoras cKit- de los donantes. Los ratones sin infectar y sin trasplante sirvieron como controles para demostrar que la irradiación fue letal (línea negra punteada; Figuras 8A, 8B y Figuras 10A, 10B; n = 12).

Los ratones sin infectar que recibieron trasplantes HS/PC sirvieron como controles para un trasplante eficaz para salvar la vida de los receptores (línea negra; Figura 8A, 8B y Fig 10A, 10B; n = 8). Otros dos grupos de ratones recibieron 3 inyecciones de MCSF (rhMCSF o mMCSF producido por Baculovirus) o PBS en el día del trasplante de HS/PC.

Una semana tras el trasplante, estos ratones se expusieron a dosis letales de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* o del hongo oportunista *Aspergillus fumigatus*.

EJEMPLO 2: LA ESTIMULACIÓN CON MCSF DESPUÉS DEL TRASPLANTE DE HS/PC PROTEGE CONTRA LA INFECCIÓN BACTERIANA.

Materiales y Métodos

Ratones: Los ratones CD45.1 y C57B1/6 se obtuvieron de Charles River. Se reconstituyeron receptores CD45.2 de 10-14 semanas de edad de sexo coincidente como se describió³ con HS/PC KSL derivadas de médula ósea (c-Kit(CD117)+, Sca+, Lin-) aisladas de CD45.1 de 6-8 semanas de edad. Para las inyecciones *in vivo*, se inyectaron las concentraciones indicadas de M-CSF y/o células clasificadas en 100-200 µl de PBS en el seno retro-orbital. Para el trasplante de HS/PC, se clasificaron 2500 HS/PC KLS de ratones CD45.1 y se mezclaron con 200.000 células portadoras cKit- CD45.2 o cKit-, Terr119+ antes de la inyección en ratones receptores CD45.2 irradiados de manera letal (160 kV, 25 mA, 6,31 Gy). Tras la irradiación, se administraron antibióticos a todos los ratones en el agua de bebida para reducir la posibilidad de infección oportunista con otros patógenos. (Todos los experimentos en ratones se llevaron a cabo en condiciones específicas exentas de patógenos de acuerdo con las directrices institucionales).

Aislamiento de células madre hematopoyéticas y progenitoras (HS/PC) y células cKit-: En las células de médula ósea totales se eliminaron las células maduras mediante tinción con cóctel de anticuerpos de rata biotinilados anti-linaje de ratón, seguido de microesferas inmuno-magnéticas de estreptavidina (Miltenyi Biotec). Las células de linaje negativo se tiñeron con marcadores de HS/PC: anti-CD 117-APC-H7 (clon 2B8, BD Biosciences), anti-Sca-1-PE-Cy5 (clon D7, BioLegend), Estreptavidina-APC (eBioscience) y colorante de células muertas LIVE/DEAD Fixable Violet (Invitrogen) como marcador de viabilidad. Las HS/PC se clasificaron mediante el uso del equipo FACSAriaIII. Para aislar las células portadoras cKit-, en las células de médula ósea completa se eliminaron las células cKit+ mediante tinción con anti-CD117 de ratón biotinilado (clon 2B8, BioLegend), seguido de microesferas inmuno-magnéticas de estreptavidina (Miltenyi Biotec), y las células negativas se clasificaron mediante el uso de autoMACS. Para las células portadoras Terr119+, las células cKit- se incubaron con anti-Ter119 biotinilado, seguido de microesferas anti-biotina, y se clasificaron positivamente mediante el uso de autoMACS.

Tratamiento con M-CSF: Cada ratón recibió tres inyecciones de 10 µg de M-CSF: 1 h antes del trasplante de HS/PC; 6 h y 18 h tras el trasplante. Se usó M-CSF humano (rhMCSF, Chiron Corporation Inc., EE.UU., ahora parte de Novartis AG) y M-CSF de ratón expresados en baculovirus (mMCSF de Baculovirus⁵⁶) para el estudio.

Infección con *Pseudomonas aeruginosa*: Se marcó la cepa PA14 de *P. aeruginosa* con proteína fluorescente verde (GFP), como se describió en otra parte^{53,54}. La cepa PA14 marcada con GFP se cultivó durante la noche a 37 °C en LB, se diluyó 1:100 en LB y se cultivó durante 3 hrs hasta alcanzar la fase exponencial bacteriana (3 a 4 de DO a 600 nm). Posteriormente se usó un volumen de 100 µl de una disolución bacteriana de 5x 10³ UFC/ml diluida en PBS para los estudios de infección. Una semana tras el trasplante de HS/PC, los ratones se expusieron mediante inoculación intra-peritoneal a 500 unidades formadoras de colonias (UFCs) de bacterias en 100 µL de PBS estéril.

Cuantificación de la carga tisular bacteriana: Los ratones infectados se sacrificaron; los órganos (bazo, pulmones, hígado y corazón) se recogieron y se pesaron. Para determinar las UFCs por gramo de diluciones en serie de

tejidos, se prepararon homogeneizados de tejidos en PBS y se colocaron en placas en medio de agar de aislamiento de *Pseudomonas* (PIA) (Difco laboratories) complementado con antibióticos adecuados, y se incubaron durante la noche a 37 °C. Las colonias se contaron tras 16-24 h.

Resultados

- 5 La estimulación con MCSF tras el trasplante de HS/PC protege contra la infección por *Pseudomonas aeruginosa*, y reduce la carga tisular bacteriana.

Tras la irradiación y el trasplante de HS/PC, los ratones se infectaron con *P. aeruginosa* en el Día 8 (D8). Los ratones que se trataron con MCSF humano mostraron una supervivencia mejorada (línea de triángulos; Figura 8A; n=10) del 15,3% en ratones sin tratar (línea de cuadrados) al 50% en ratones tratados con MCSF (línea de triángulos, Figuras 8A y B; n = 13). Los ratones que se trataron con MCSF de ratón mostraron una supervivencia incrementada adicional del 87,5% (línea de triángulos; Figura 8B; n = 8).

Además, en los ratones que sucumbieron a la infección, la muerte se retrasó en los ratones tratados con M-CSF (Figuras 8A y B).

15 Para el análisis de la carga bacteriana, los ratones se sacrificaron a las 18 h tras la infección, se prepararon homogeneizados de tejido de bazo, pulmones, hígado y corazón, y se colocaron en placas para determinar las UFC. De ocho a diez de los 13 ratones del grupo sin tratar estaban moribundos, en comparación con dos a tres de los 10 ratones del grupo tratado con rhMCSF. En este momento anterior, los ratones tratados con rhMCSF mostraron una disminución significativa de la carga tisular de bacterias en comparación con los ratones sin tratar (Figura 9), lo que sugiere que la supervivencia incrementada fue debida a una reducción de la carga bacteriana.

- 20 EJEMPLO 3: LA ESTIMULACIÓN CON MCSF DESPUÉS DEL TRASPLANTE DE HS/PC PROTEGE CONTRA LA INFECCIÓN FÚNGICA.

Materiales y Métodos

Ratones; Aislamiento de células madre hematopoyéticas y progenitoras (HS/PC) y células cKit- y tratamiento con M-CSF: Como se describió anteriormente en el EJEMPLO 2.

25 *Infección con Aspergillus fumigatus:* El *Aspergillus fumigatus* FGSC 1100 fue proporcionado por el Centre International de Ressources Microbiennes - Champignons Filamenteux (CIRM-CF, Marsella, Francia). Para cada experimento, se realizaron cultivos en medio de agar-malta (2% de extracto de malta, 2% de Bacto-agar DIFCO) durante 5 días a 25 °C. Se preparó una suspensión conidial en solución salina estéril según Bitmansour *et al.* (2002)⁵⁵. Una semana tras el trasplante de HS/PC, los ratones se infectaron mediante inoculación intranasal de 2-4 x 10⁶ conidios en 20-40 µL de PBS estéril.

Cultivo fúngico de órganos infectados: Los órganos (pulmones, hígado, corazón y bazo) se recogieron, se pesaron y se prepararon homogeneizados de tejido en PBS. Los homogeneizados se diluyeron en serie, y se colocaron 200 µL de cada dilución en placas de agar dextrosa Sabouraud (DIFCO). Las placas se incubaron a 25 °C y se tomaron fotografías después de 3-5 días.

35 Resultados

La estimulación con MCSF tras el trasplante de HS/PC protege contra la infección por *Aspergillus fumigatus* y reduce la carga tisular fúngica.

40 Tras la irradiación y el trasplante de HS/PC, los ratones se infectaron con *A. fumigatus* en D8. Los ratones tratados con MCSF humano mostraron un 40% de supervivencia (línea de triángulos; Figura 10A; n=10) en comparación con los ratones sin tratar, que mostraron solamente un 10% de supervivencia (línea de cuadrados; Figuras 10A y B; n = 10). De manera interesante, los ratones que se trataron con MCSF de ratón estuvieron protegidos adicionalmente, y mostraron un 60% de supervivencia (línea de triángulos; Figura 10B; n = 10). Uno de los 10 ratones del grupo sin tratar que sobrevivió durante 6 días tras la infección siguió vivo durante el periodo de observación total de 35 días.

45 Además, en los ratones que sucumbieron a la infección, la muerte se retrasó ligeramente de D9-D14 en los ratones sin tratar a D10-D15 en el grupo tratado con rhMCSF. Para el análisis de la carga fúngica, los ratones se sacrificaron a las 48 h tras la infección, y se prepararon homogeneizados de tejido de los pulmones, hígado y corazón. Los homogeneizados diluidos (1/10 de pulmón, hígado y corazón; 1/100 de corazón) se colocaron en placas de agar dextrosa Sabouraud para observar el crecimiento de colonias fúngicas. Los ratones tratados con rhMCSF mostraron una disminución significativa de la carga tisular de colonias fúngicas en comparación con los ratones sin tratar. Los cultivos tisulares fúngicos se incubaron más de 96 h para verificar la morfología típica de las colonias de *A. fumigatus*.

Referencias:

A lo largo de esta solicitud, las diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta

descripción.

- 1 Metcalf, D. Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 485-491 (2008).
- 2 Rieger, M. A., Hoppe, P. S., Smejkal, B. M., Eitelhuber, A. C. y Schroeder, T. Hematopoietic cytokines can instruct lineage choice. *Science* 325, 217-218 (2009).
- 5 3 Sarrazin, S. *et al.* MafB restricts M-CSF dependent myeloid commitment divisions of hematopoietic stem cells *Cell* 138, 1-14 (2009).
- 4 Orkin, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1, 57-64 (2000).
- 5 Cantor, A. B. y Orkin, S. H. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* 11, 513-519 (2001).
- 10 6 Enver, T., Pera, M., Peterson, C. y Andrews, P. W. Stem cell states, fates, and the rules of attraction. *Cell Stem Cell* 4, 387-397(2009).
- 7 Graf, T. y Enver, T. Forcing cells to change lineages. *Nature* 462, 587-594 (2009).
- 8 Socolovsky, M., Lodish, H. F. y Daley, G. Q. Control of hematopoietic differentiation: lack of specificity in signaling by cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6573-6575 (1998).
- 15 9 Metcalf, D. On hematopoietic stem cell fate. *Immunity* 26, 669-673 (2007).
- 10 Cheers, C. y Stanley, E. R. Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and CSF-1-binding cells in genetically resistant and susceptible mice. *Infect Immun* 56, 2972-2978 (1988).
- 11 Roth, P., Bartocci, A. y Stanley, E. R. Lipopolysaccharide induces synthesis of mouse colony-stimulating factor-1 in vivo. *J Immunol* 158, 3874-3880 (1997).
- 20 12 Cross, M. A. y Enver, T. The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells. *Curr Opin Genet Dev* 7, 609-613(1997).
- 13 Enver, T., Heyworth, C. M. y Dexter, T. M. Do stem cells play dice? *Blood* 92, 348-351(1998).
- 14 Till, J. E., McCulloch, E. A. y Siminovitch, L. A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 51, 29-36 (1964).
- 25 15 Chang, H. H., Hemberg, M., Barahona, M., Ingber, D. E. y Huang, S. Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature* 453, 544-547 (2008).
- 16 Laiosa, C. V., Stadtfeld, M. y Graf, T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* 24, 705-738 (2006).
- 17 Orkin, S. H. y Zon, L. I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644 (2008).
- 30 18 Back, J., Allman, D., Chan, S. y Kastner, P. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp Hematol* 33, 395-402 (2005).
- 19 Miyamoto, T. *et al.* Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell* 3, 137-147 (2002).
- 20 Morita, Y., Ema, H. y Nakauchi, H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med* 207, 1173-1182 (2010).
- 35 21 King, K. Y. y Goodell, M. A. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nat Rev Immunol* 11, 685-692 (2011).
- 22 Cheers, C. *et al.* Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. *Infect Immun* 56, 247-251 (1988).
- 40 23 Hoebe, R. A. *et al.* Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging. *Nat Biotechnol* 25, 249-253 (2007).
- 24 Schroeder, T. Long-term single-cell imaging of mammalian stem cells. *Nat Methods* 8, S30-35 (2011).
- 25 Kiel, M. J. y Morrison, S. J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 8, 290-301 (2008).
- 45 26 Sudo, T. *et al.* Functional hierarchy of c-kit and c-fms in intramarrow production of CFU-M. *Oncogene* 11, 2469-

- 2476 (1995).
- 27 Dai, X. M. *et al.* Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111-120 (2002).
- 5 28 Pixley, F. J. y Stanley, E. R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* 14, 628-638 (2004).
- 29 Baldrige, M. T., King, K. Y., Boles, N. C., Weksberg, D. C. y Goodell, M. A. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature* 465, 793-797(2010).
- 30 Essers, M. A. *et al.* IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458, 904-908 (2009).
- 10 31 Back, J., Dierich, A., Bronn, C., Kastner, P. y Chan, S. PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells. *Blood* 103, 3615-3623 (2004).
- 32 Dakic, A. *et al.* PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J Exp Med* 201, 1487-1502 (2005).
- 15 33 Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. y Nishimune, Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407, 313-319 (1997).
- 34 Bryder, D., Rossi, D. J. y Weissman, I. L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169, 338-346 (2006).
- 35 Niu, C. *et al.* c-Myc is a target of RNA-binding motif protein 15 in the regulation of adult hematopoietic stem cell and megakaryocyte development. *Blood* 114, 2087-2096(2009).
- 20 36 Schindelin, J., Proceedings of the ImageJ conference (2008).
- 37 Rasband, W.S., ImageJ, <http://imagej.nih.gov/ij/> (Bethesda, ML, EE.UU., 1997-2012).
- 38 Meijering, E., Dzyubachyk, O. y Smal, I. Methods for cell and particle tracking. *Methods Enzymol* 504, 183-200 (2012).
- 39 R: A language and environment for statistical computing (Viena, Austria, 2012).
- 25 40 Laslo, P. *et al.* Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* 126, 755-766 (2006).
- 41 Pronk, C. J. *et al.* Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell* 1, 428-442 (2007).
- 42 McCubrey, J. A. *et al.* Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 46, 249-279, (2006).
- 30 43 Jack, G. D., Zhang, L. y Friedman, A. D. M-CSF elevates c-Fos and phospho-C/EBPalpha(S21) via ERK whereas G-CSF stimulates SHP2 phosphorylation in marrow progenitors to contribute to myeloid lineage specification. *Blood* 114, 2172-2180, (2009).
- 44 Bae, S. C. y Lee, Y. H. Phosphorylation, acetylation and ubiquitination: the molecular basis of RUNX regulation. *Gene* 366, 58-66, (2006).
- 35 45 Buitenhuis, M. y Coffey, P. J. The role of the PI3K-PKB signaling module in regulation of hematopoiesis. *Cell Cycle* 8, 560-566, (2009).
- 46 Lichtinger, M. *et al.* RUNX1 reshapes the epigenetic landscape at the onset of haematopoiesis. *EMBO J* 31, 4318-4333, (2012).
- 40 47 Yeamans, C. *et al.* C/EBPalpha binds and activates the PU.1 distal enhancer to induce monocyte lineage commitment. *Blood* 110, 3136-3142, (2007).
- 48 Huang, G. *et al.* PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nat Genet* 40, 51-60, (2008).
- 49 Bonadies, N. *et al.* PU.1 is regulated by NF-kappaB through a novel binding site in a 17 kb upstream enhancer element. *Oncogene* 29, 1062-1072, (2010).
- 45 50 Leddin, M. *et al.* Two distinct auto-regulatory loops operate at the PU.1 locus in B cells and myeloid cells. *Blood*

117, 2827-2838, (2011).

- 51 Zhang, P. *et al.* Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity* 21, 853-863 (2004).
- 52 Steidl, U. *et al.* Essential role of Jun family transcription factors in PU.1 knockdown-induced leukemic stem cells. *Nat Genet* 38, 1269-1277, (2006).
- 53 B. Koch, L. E. Jensen, O. Nybroe, A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J Microbiol Methods* 45, 187 (julio, 2001).
- 54 C. Giraud *et al.*, The PprA-PprB two-component system activates CupE, the first non-archetypal *Pseudomonas aeruginosa* chaperone-usher pathway system assembling fimbriae. *Environmental microbiology* 13, 666 (Mar, 2011).
- 55 A. Bitmansour *et al.*, Myeloid progenitors protect against invasive aspergillosis and *Pseudomonas aeruginosa* infection following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 100(13): 4660-7 (dic., 2002).
- 56 Z.E. Wang *et al.*, Identification of the ligand-binding regions in the macrophage colony-stimulating factor receptor extracellular domain. *Mol Cell Biol.*;13(9):5348-59 (sep. de 1993).

Lista de secuencias

- <110> INSERM
- 20 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA PREVENIR O TRATAR LA CITOPENIA MIELOIDE Y LAS COMPLICACIONES RELACIONADAS
- <130> BIO13024
- 25 <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 30 <211> 256
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 686 851 T3

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
 50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
 85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
 100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
 115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
 130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
 145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
 165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Gly His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Phe Ser
 180 185 190

Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile
 195 200 205

Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg
 210 215 220

Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro
 225 230 235 240

Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
 245 250 255

5 <210> 2
 <211> 554
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10 <400> 2

ES 2 686 851 T3

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
 50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
 85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
 100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
 115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
 130 135 140

ES 2 686 851 T3

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
 145 150 155 160
 Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
 165 170 175
 Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
 180 185 190
 Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
 195 200 205
 Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
 210 215 220
 Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
 225 230 235 240
 Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
 245 250 255
 Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
 260 265 270
 Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
 275 280 285
 Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
 290 295 300
 Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
 305 310 315 320
 Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
 325 330 335
 Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
 340 345 350
 Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro
 355 360 365
 Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro
 370 375 380
 Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
 385 390 395 400

ES 2 686 851 T3

Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro
 405 410 415

Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
 420 425 430

Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp
 435 440 445

Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala
 450 455 460

Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
 465 470 475 480

His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
 485 490 495

Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
 500 505 510

Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
 515 520 525

Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr
 530 535 540

Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
 545 550

<210> 3
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3
 Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
 50 55 60

ES 2 686 851 T3

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
180 185 190

Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
195 200 205

Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
210 215 220

Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225 230 235 240

Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
245 250 255

Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
260 265 270

Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
275 280 285

Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
290 295 300

Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly

ES 2 686 851 T3

Leu Gln Glu Leu Ser Asn Asn Leu Asn Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr
 85 90 95

Glu Glu Gln Asn Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe His Glu Thr Pro Leu
 100 105 110

Gln Leu Leu Glu Lys Ile Lys Asn Phe Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu
 115 120 125

Leu Glu Lys Asp Trp Asn Ile Phe Thr Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe
 130 135 140

Ala Lys Cys Ser Ser Arg Asp Val Val Thr Lys Pro
 145 150 155

<210> 5
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Fragmento de M-CSF humano recombinante de 150 aminoácidos

10

<400> 5
 Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
 50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
 85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
 100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
 115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
 130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys
 145 150

15

<210> 6
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 686 851 T3

<400> 6

Met Pro Arg Gly Phe Thr Trp Leu Arg Tyr Leu Gly Ile Phe Leu Gly
1 5 10 15

Val Ala Leu Gly Asn Glu Pro Leu Glu Met Trp Pro Leu Thr Gln Asn
20 25 30

Glu Glu Cys Thr Val Thr Gly Phe Leu Arg Asp Lys Leu Gln Tyr Arg
35 40 45

Ser Arg Leu Gln Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Lys Ile
50 55 60

Ser Val Pro Tyr Glu Gly Val Phe Arg Ile Ala Asn Val Thr Arg Leu
65 70 75 80

Gln Arg Ala Gln Val Ser Glu Arg Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Leu
85 90 95

Val Ser Leu Ser Ala Thr Glu Ser Val Gln Asp Val Leu Leu Glu Gly
100 105 110

His Pro Ser Trp Lys Tyr Leu Gln Glu Val Glu Thr Leu Leu Leu Asn
115 120 125

Val Gln Gln Gly Leu Thr Asp Val Glu Val Ser Pro Lys Val Glu Ser
130 135 140

Val Leu Ser Leu Leu Asn Ala Pro Gly Pro Asn Leu Lys Leu Val Arg
145 150 155 160

Pro Lys Ala Leu Leu Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Glu Leu Leu Tyr
165 170 175

Cys Ser Cys Cys Lys Gln Ser Ser Val Leu Asn Trp Gln Asp Cys Glu
180 185 190

Val Pro Ser Pro Gln Ser Cys Ser Pro Glu Pro Ser Leu Gln Tyr Ala
195 200 205

Ala Thr Gln Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Trp Ser Pro Ser Ser Pro Pro
210 215 220

His Ser Thr Gly Ser Val Arg Pro Val Arg Ala Gln Gly Glu Gly Leu
225 230 235 240

Leu Pro

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de M-CSF o un agonista del receptor de M-CSF para el uso en la prevención o el tratamiento de la citopenia mieloide y las complicaciones relacionadas en un paciente que lo necesita, en el que el agonista del receptor de M-CSF es un polipéptido de interleucina-34.
- 5 2. El polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF para el uso según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de M-CSF tiene la secuencia que comprende o que consiste en SEQ ID N°: 5 o una secuencia que es al menos un 80% idéntica a la secuencia SEQ ID N°: 5.
3. El polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF para el uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el paciente que lo necesita es un paciente sometido a trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH).
- 10 4. El polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el paciente está afectado por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en leucemia, linfoma, trastornos mieloproliferativos, síndrome mielodisplásico (SMD), síndromes de insuficiencia de médula ósea (MO), inmunodeficiencias congénitas, deficiencias enzimáticas y hemoglobinopatías.
- 15 5. El polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la citopenia mieloide es neutropenia y/o monocitopenia.
6. El polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la citopenia mieloide se induce mediante una terapia mieloablativa.
7. El polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichas complicaciones son infecciones virales, bacterianas y/o fúngicas.
- 20 8. El polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF para el uso según la reivindicación 7, en el que la infección viral se selecciona del grupo que consiste en infecciones por el virus *Herpes simplex* (HSV), infecciones por *Citomegalovirus* (CMV), infecciones por el virus *Varicella-zoster* (VZV), infecciones por *herpes virus 6 humano* (HHV6), infecciones por el virus de *Epstein-Barr* (EBV), infecciones virales respiratorias, infección por el virus parainfluenza, infección por rinovirus, e infección por el virus de la gripe e infecciones por adenovirus.
- 25 9. El polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF para el uso según la reivindicación 7, en el que la infección bacteriana se selecciona del grupo que consiste en infecciones por bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, y otras Enterobacteriaceae, infecciones por *Pseudomonas* tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella*, *Helicobacter*, y *Legionella*.
- 30 10. El polipéptido de M-CSF o el agonista del receptor de M-CSF para el uso según la reivindicación 7, en el que la infección fúngica se selecciona del grupo que consiste en infección por *Aspergillus*, infección por *Candida* y otras infecciones fúngicas emergentes que incluyen las infecciones por *Trichosporon*, *Alternaria*, *Fusarium*, y *Mucorales*.
11. Un polipéptido de M-CSF o un agonista del receptor de M-CSF para el uso simultáneamente y/o posteriormente al TCMH en un método para mejorar el periodo de supervivencia de un paciente sometido a TCMH, en el que el agonista del receptor de M-CSF es un polipéptido de interleucina-34.

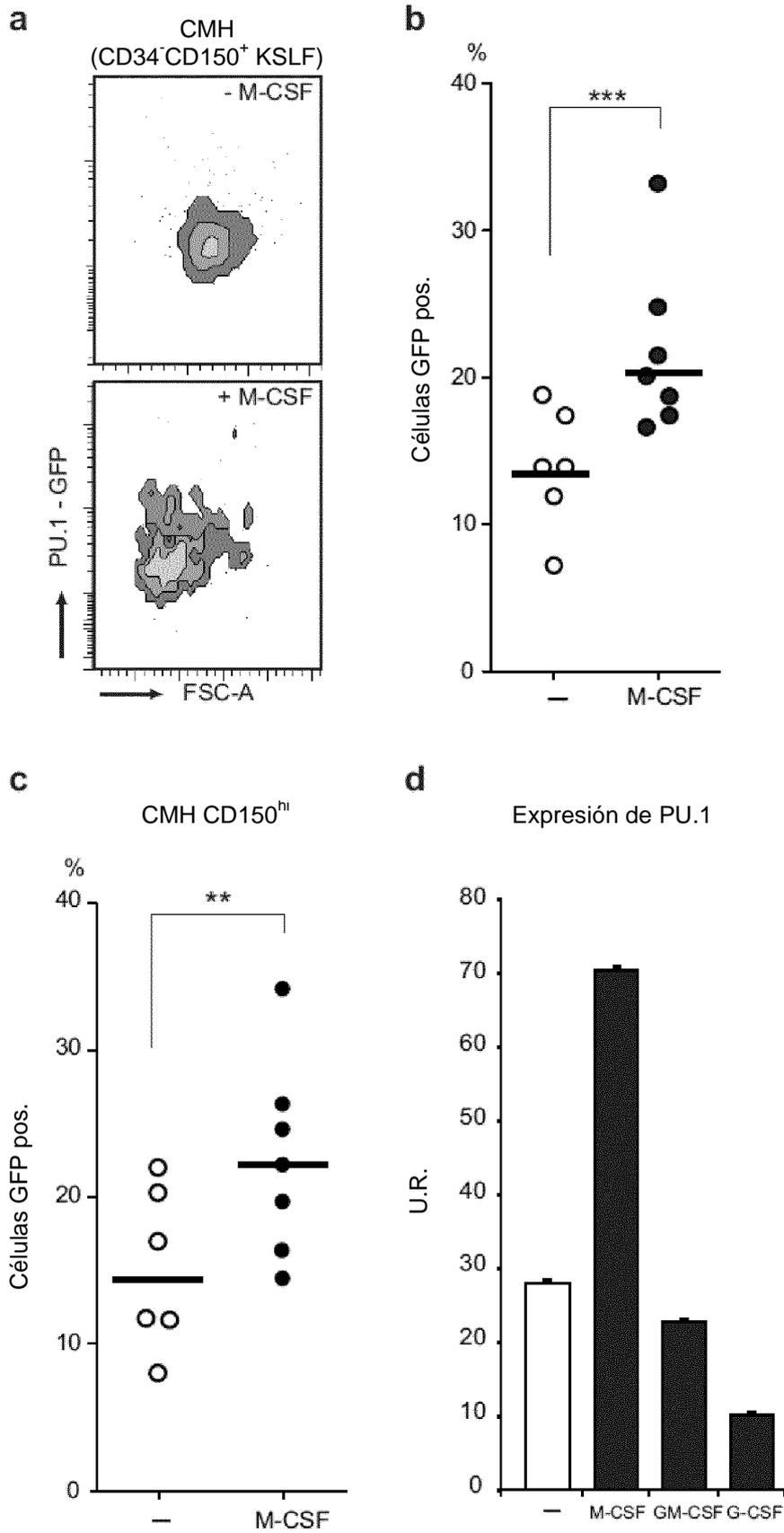


Figura 1

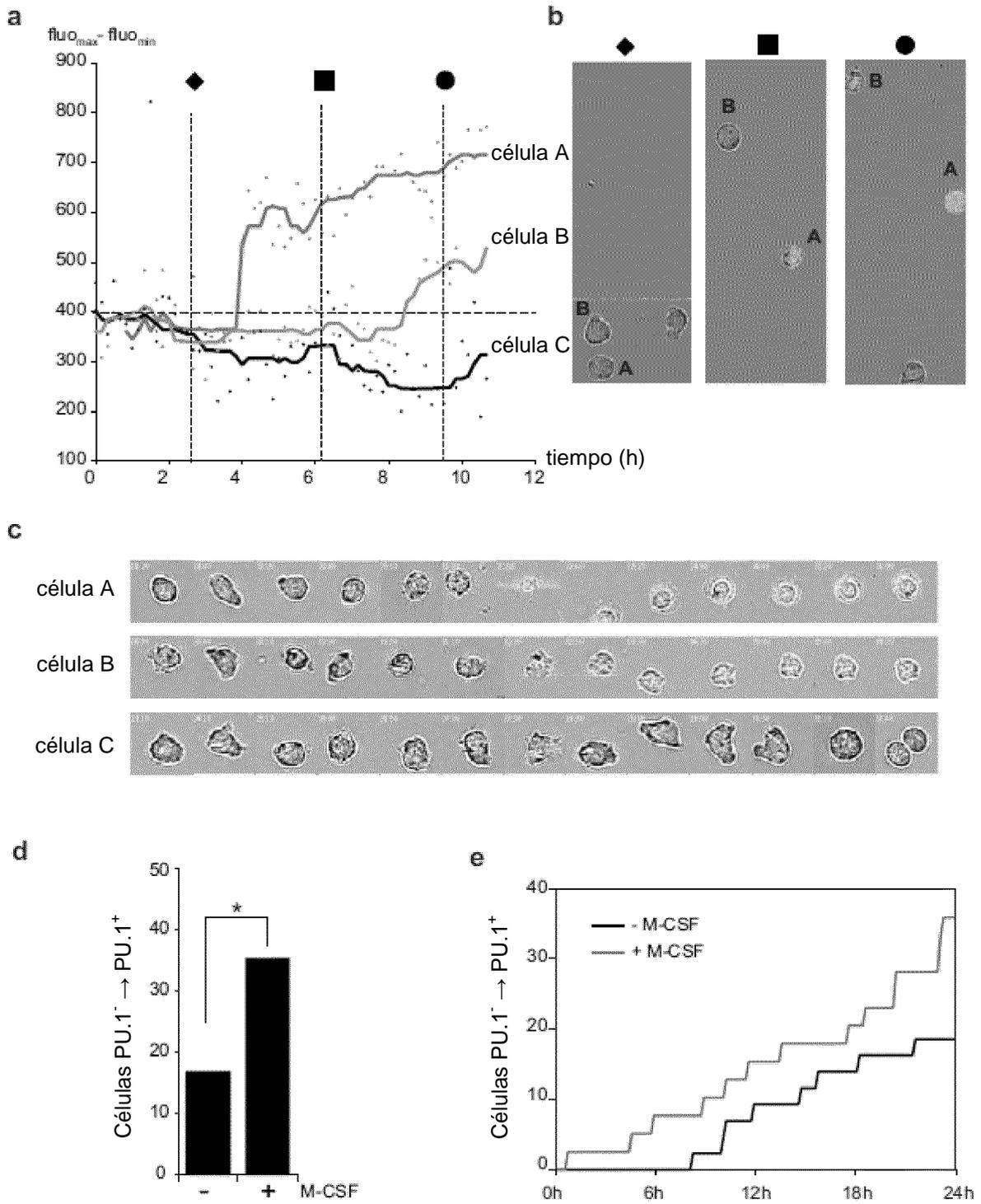


Figura 2

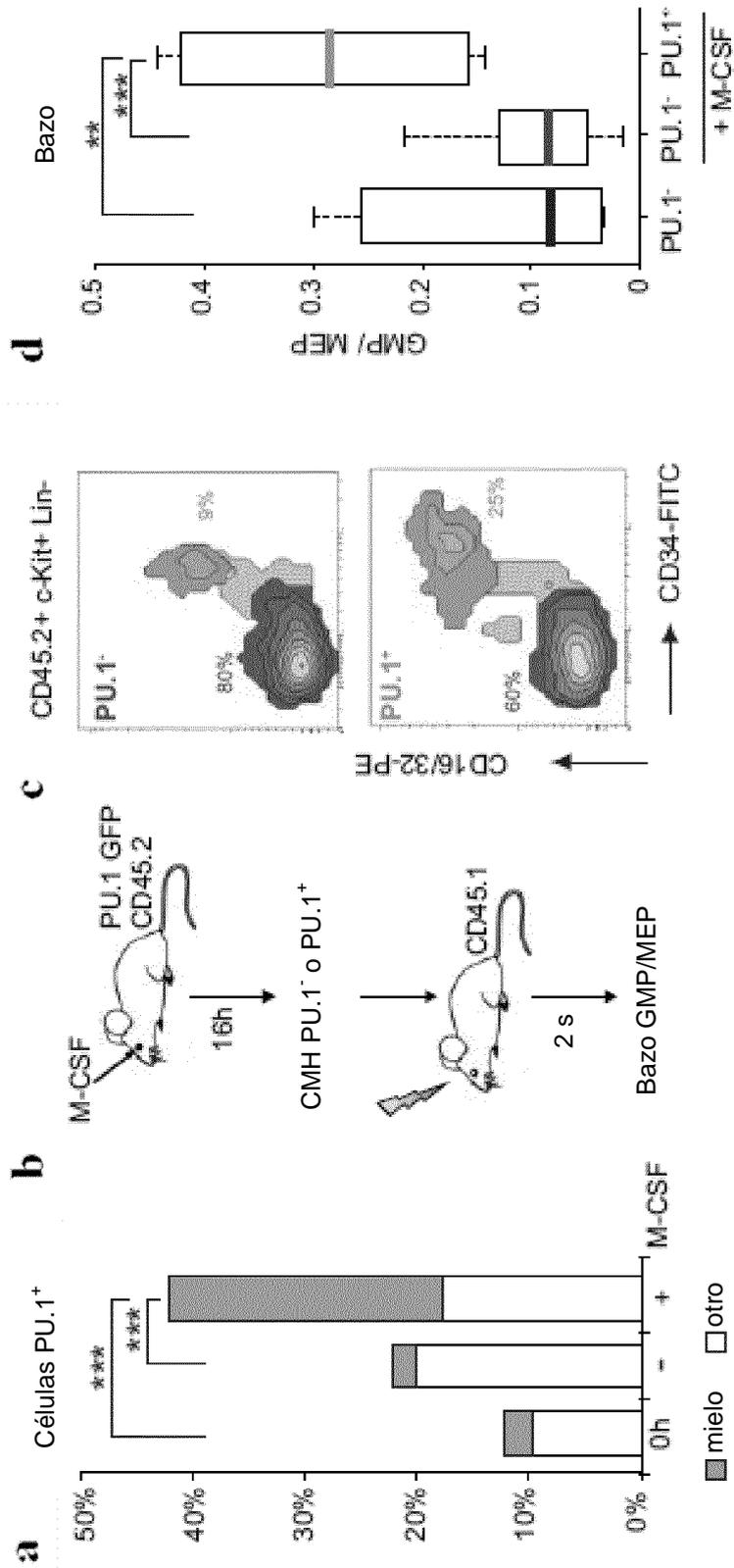


Figura 3

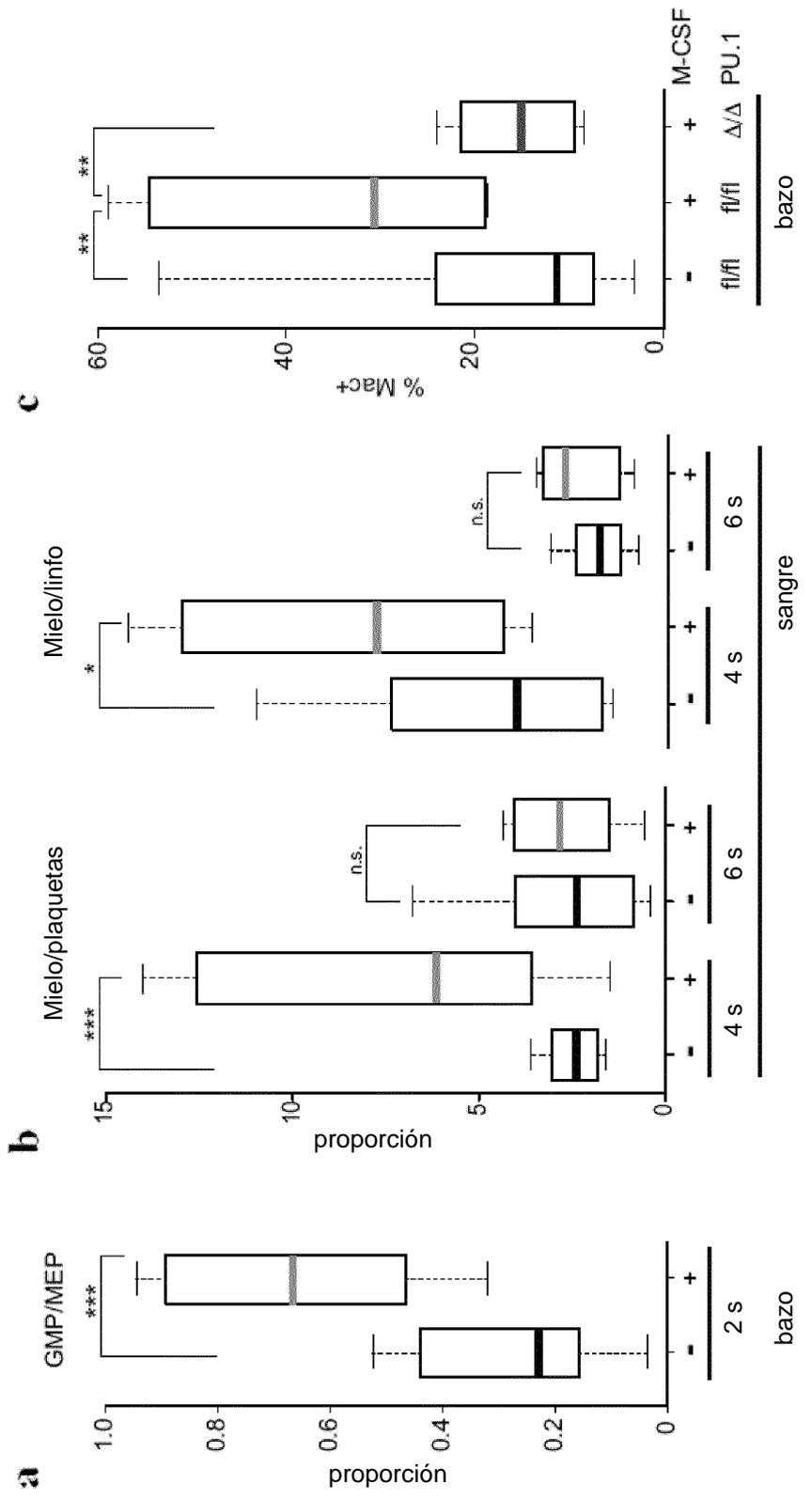
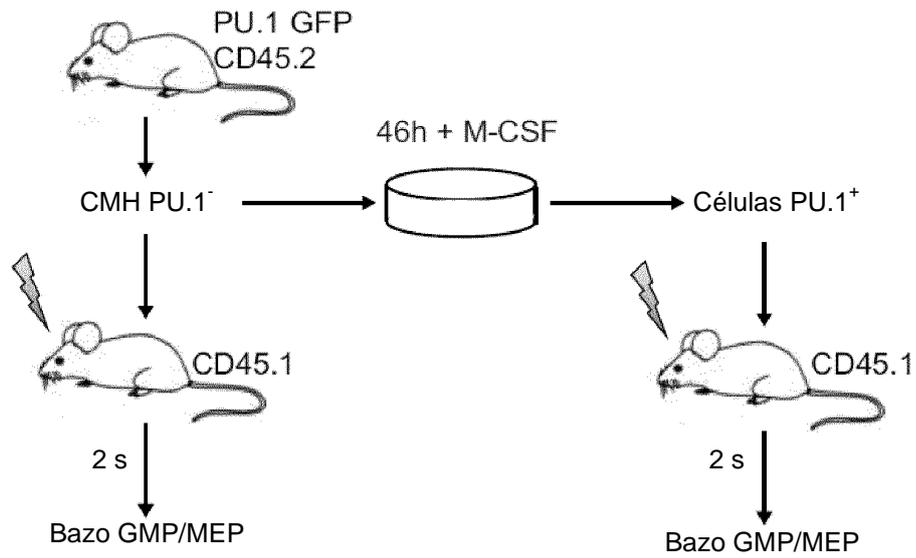
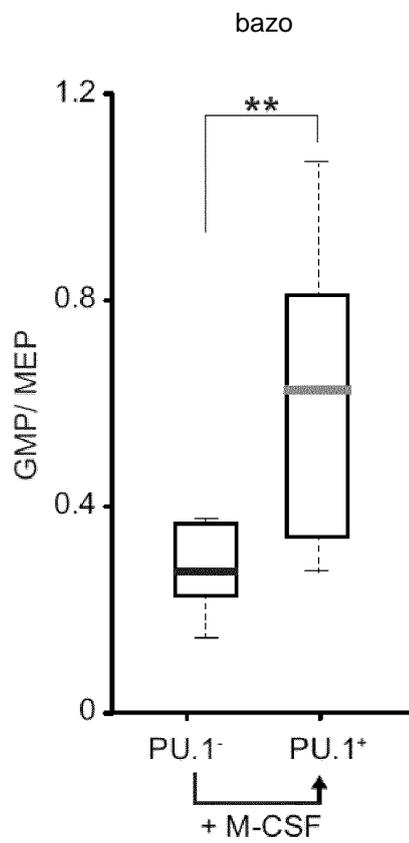


Figura 4

a



b



c

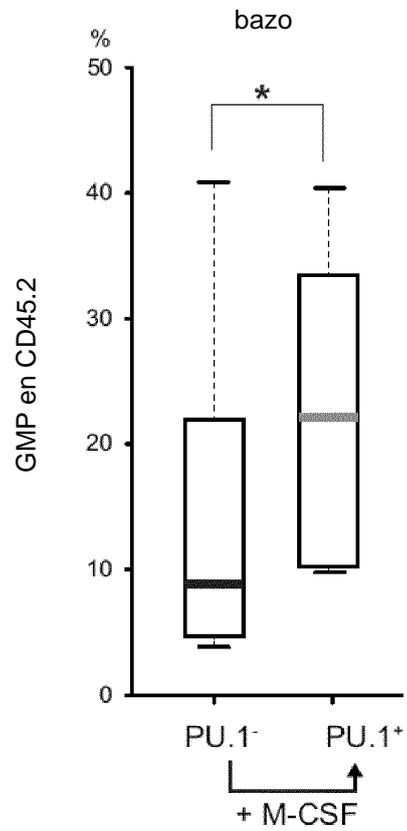
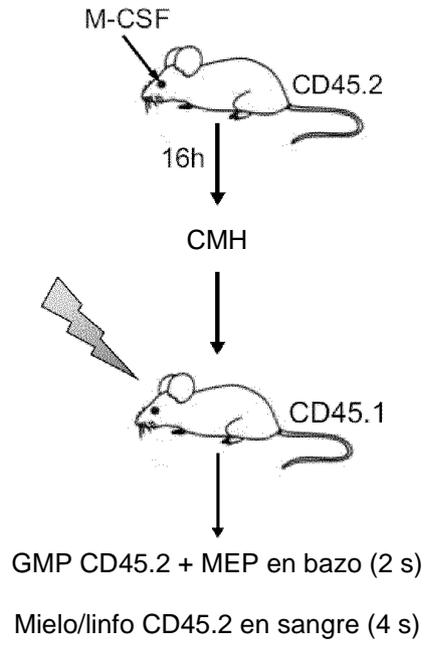
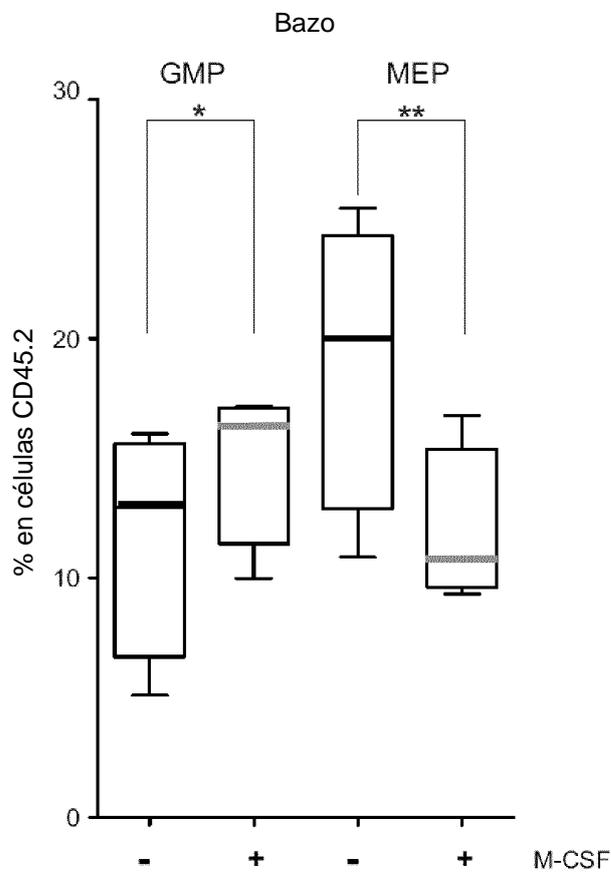


Figura 5

a



b



c

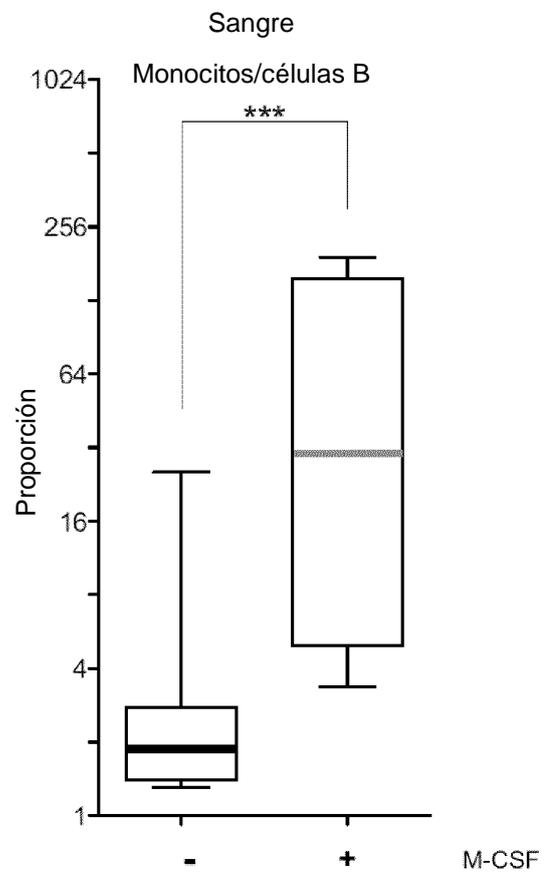


Figura 6

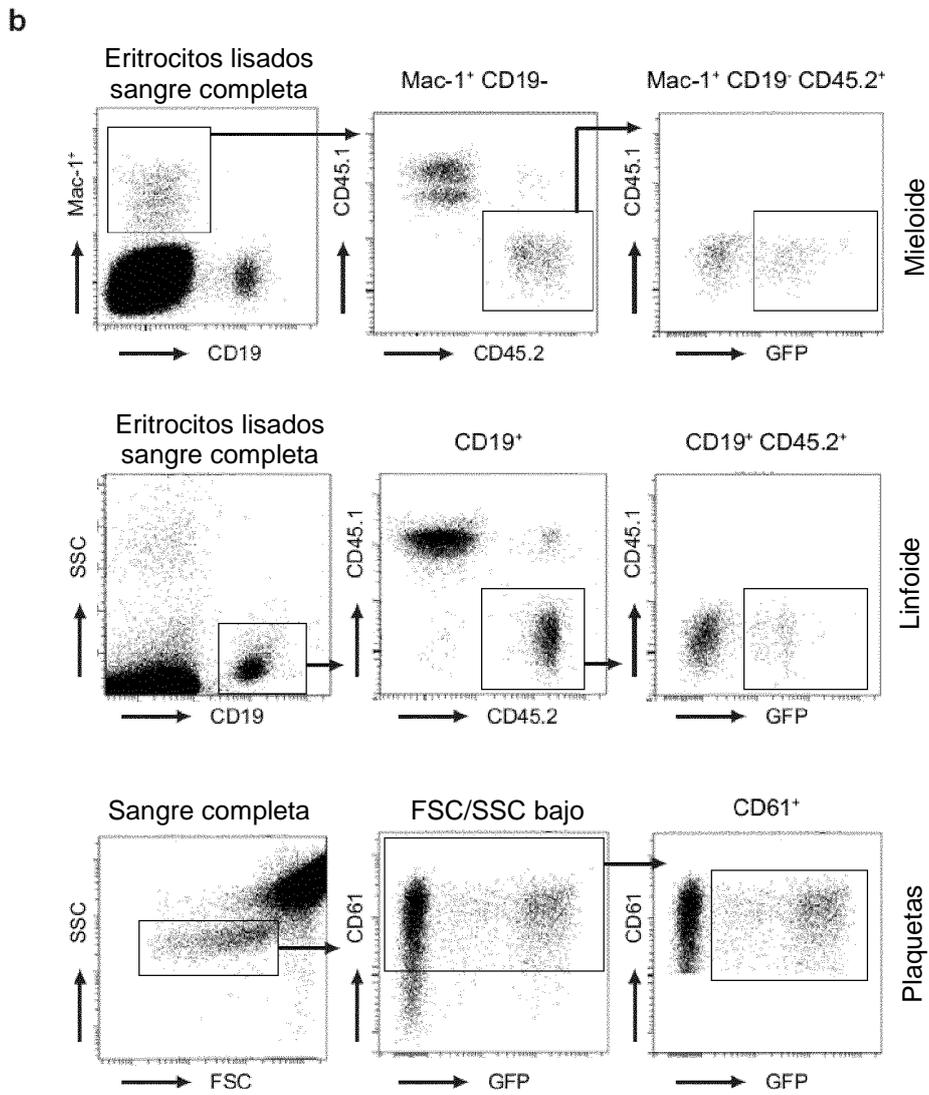
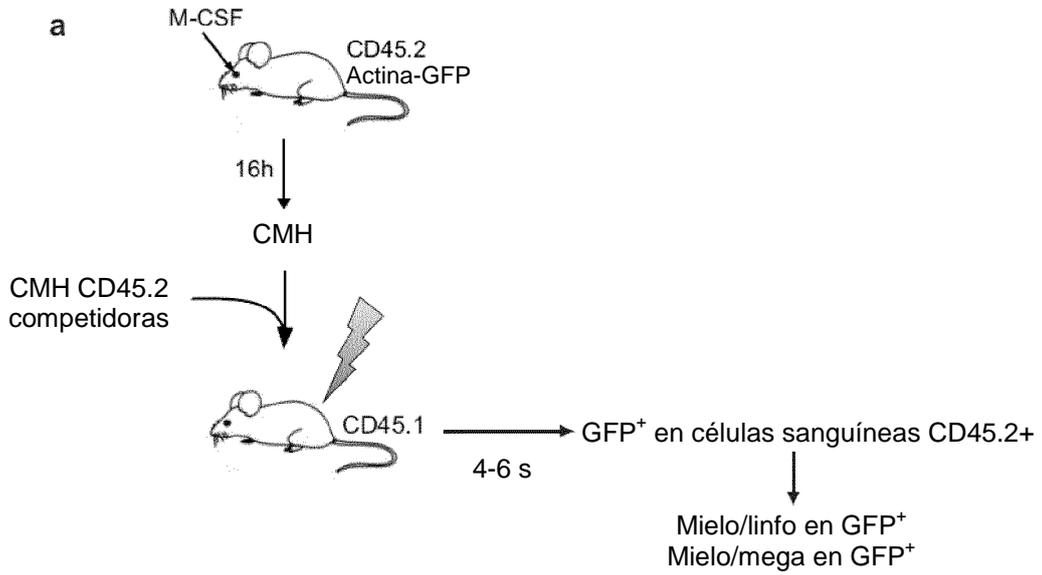


Figura 7A y 7B

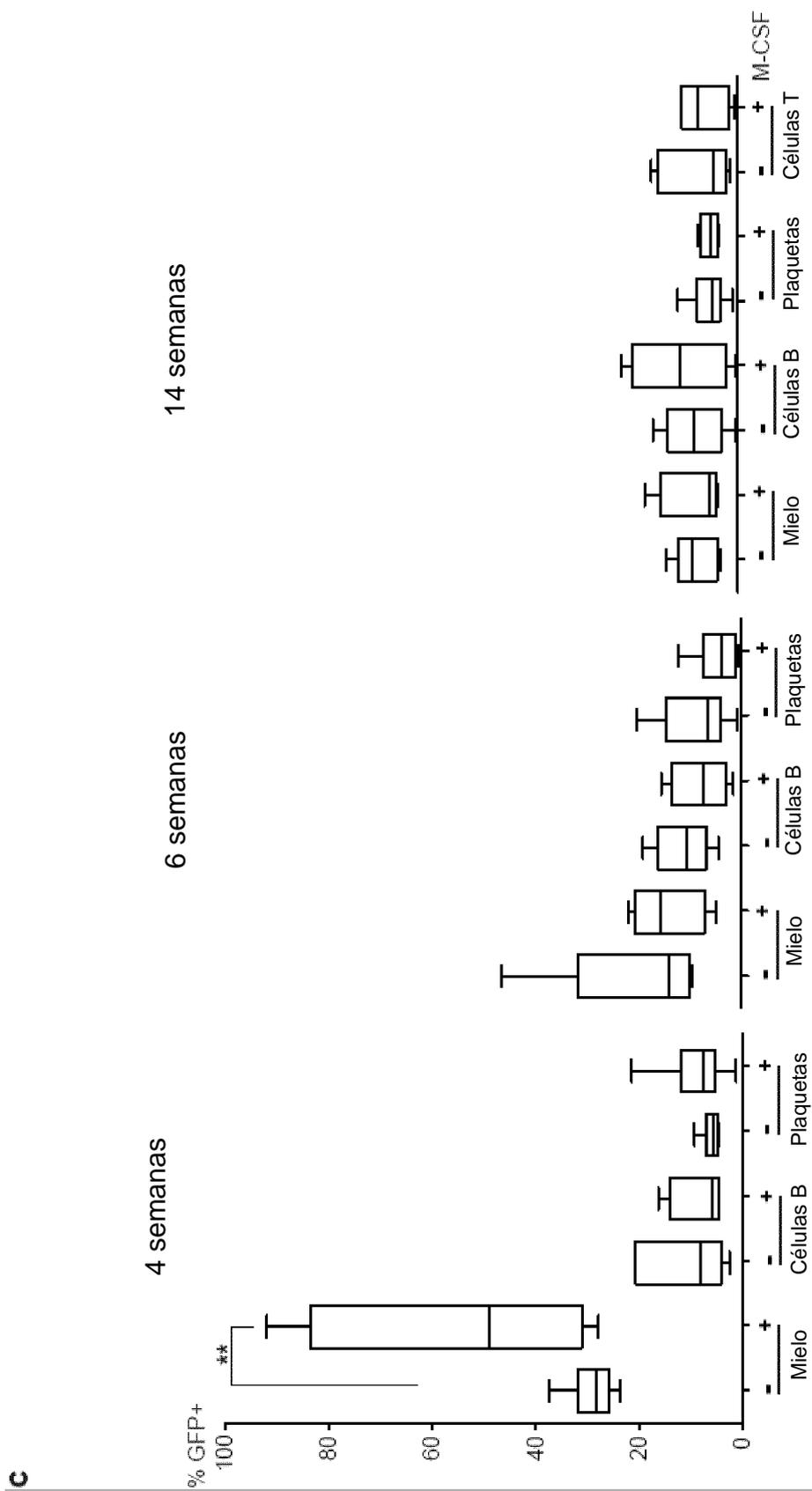


Figura 7C

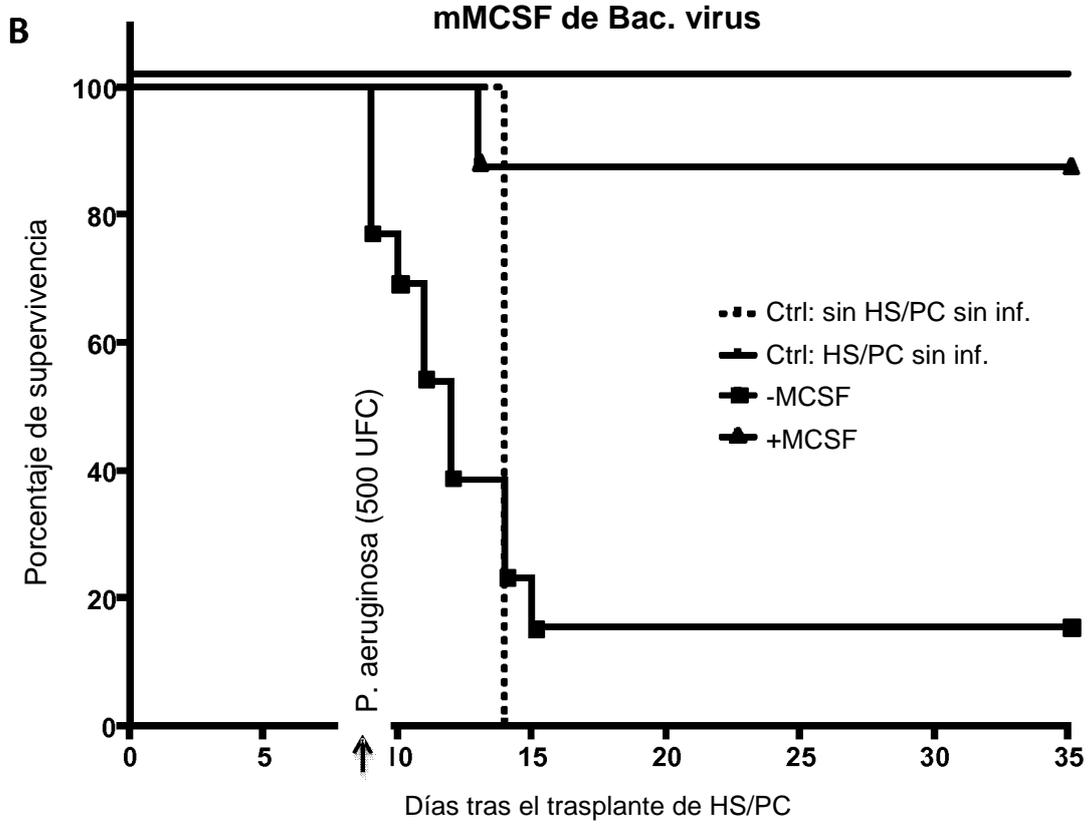
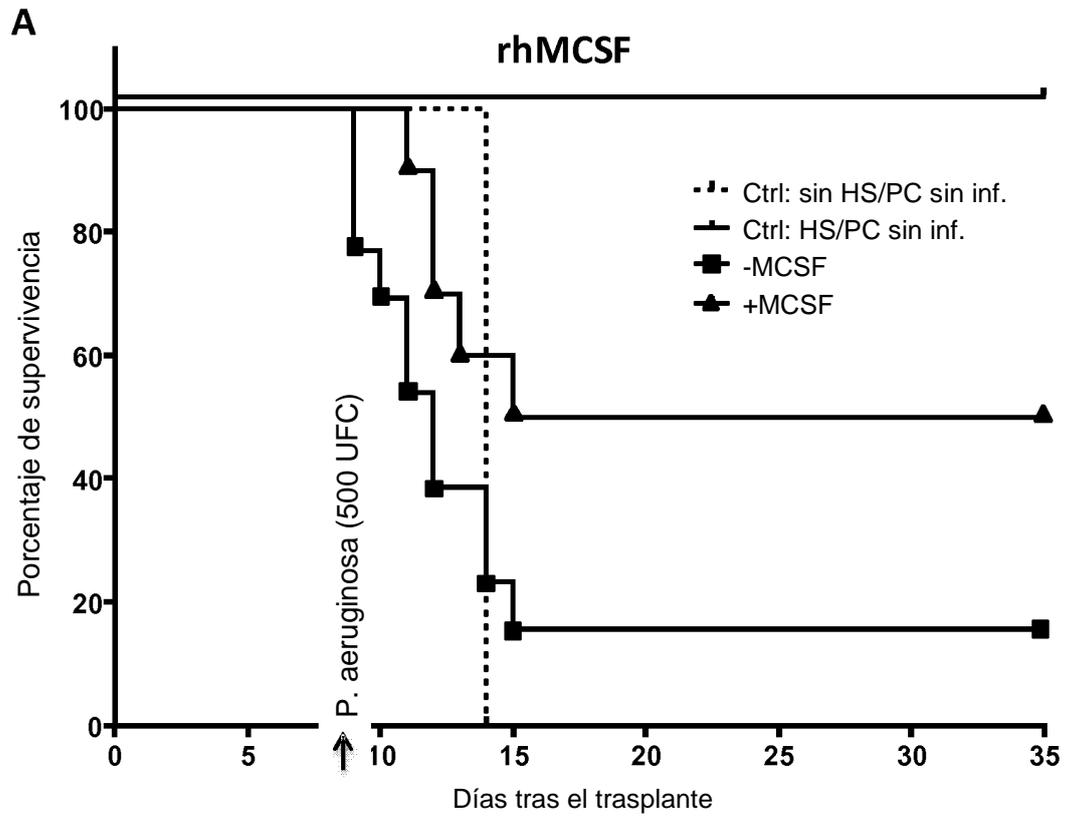


Figura 8

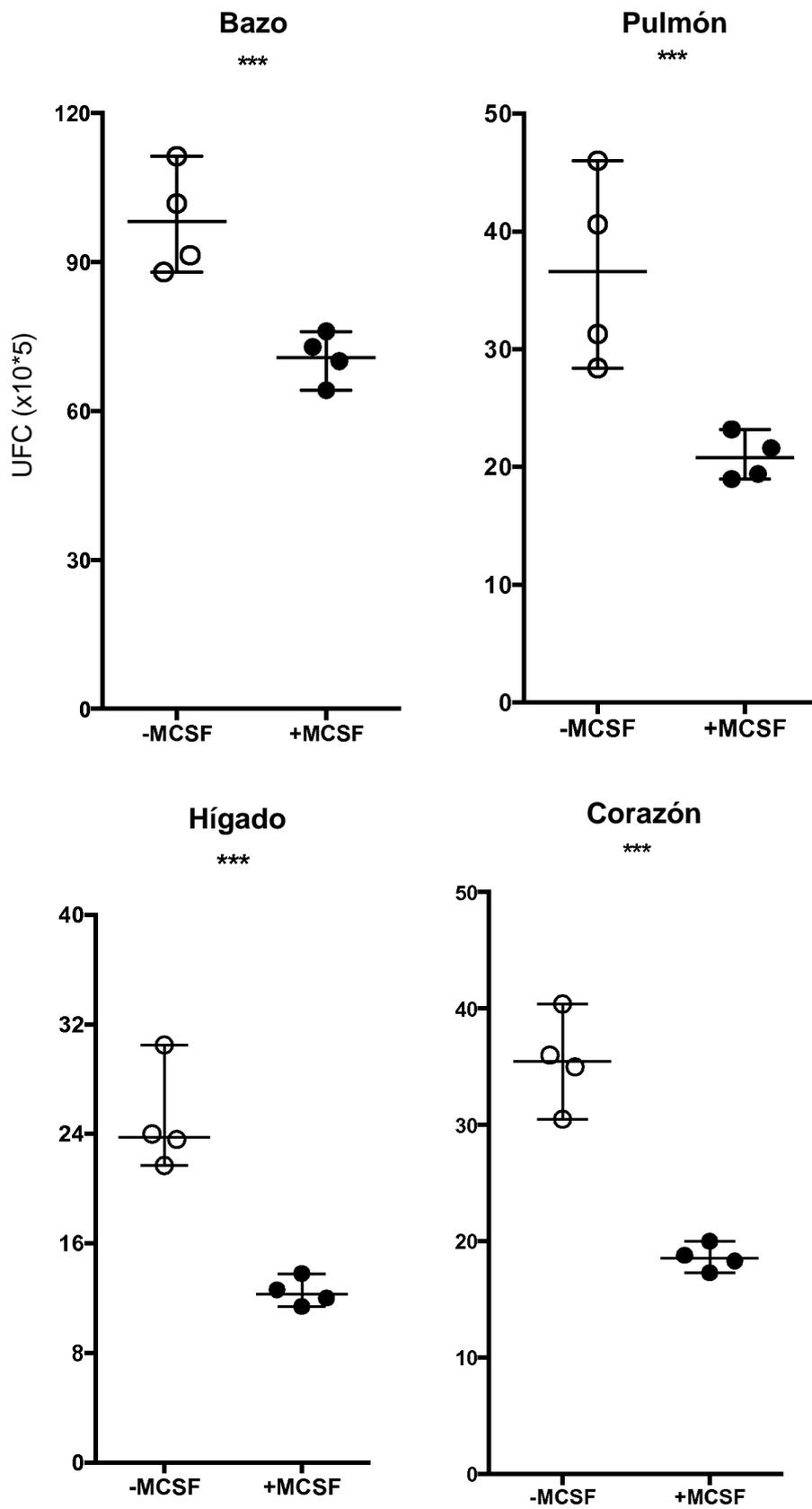


Figura 9

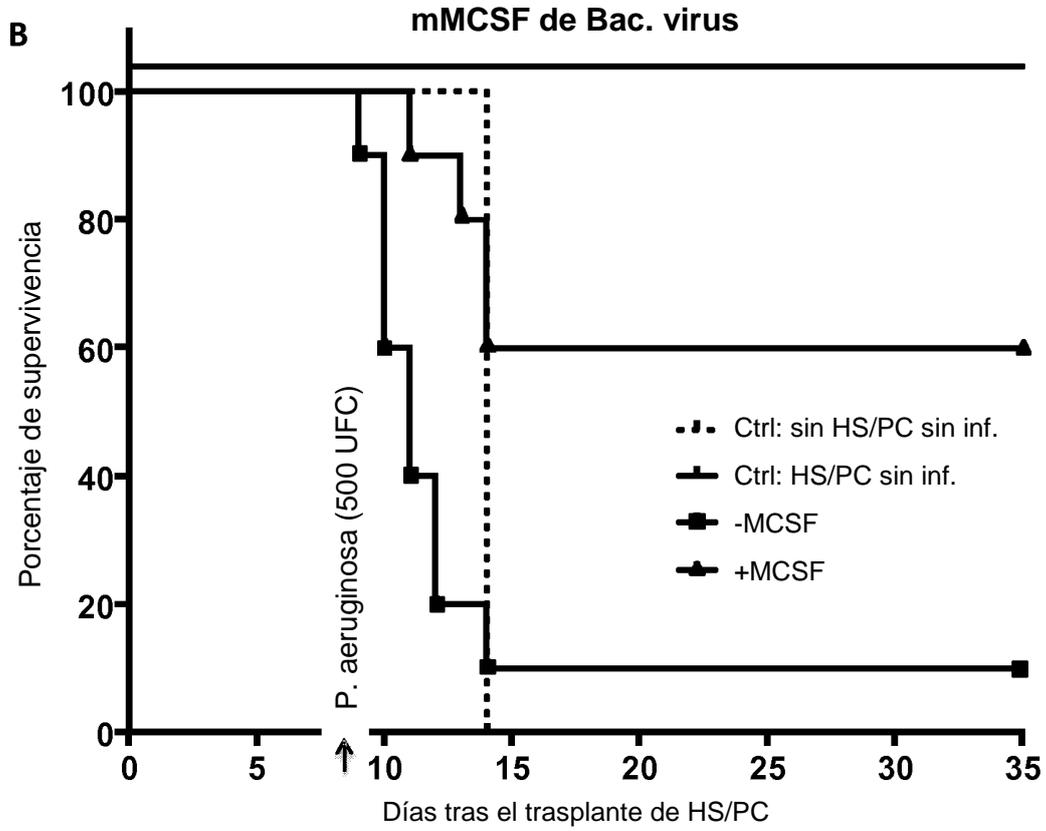
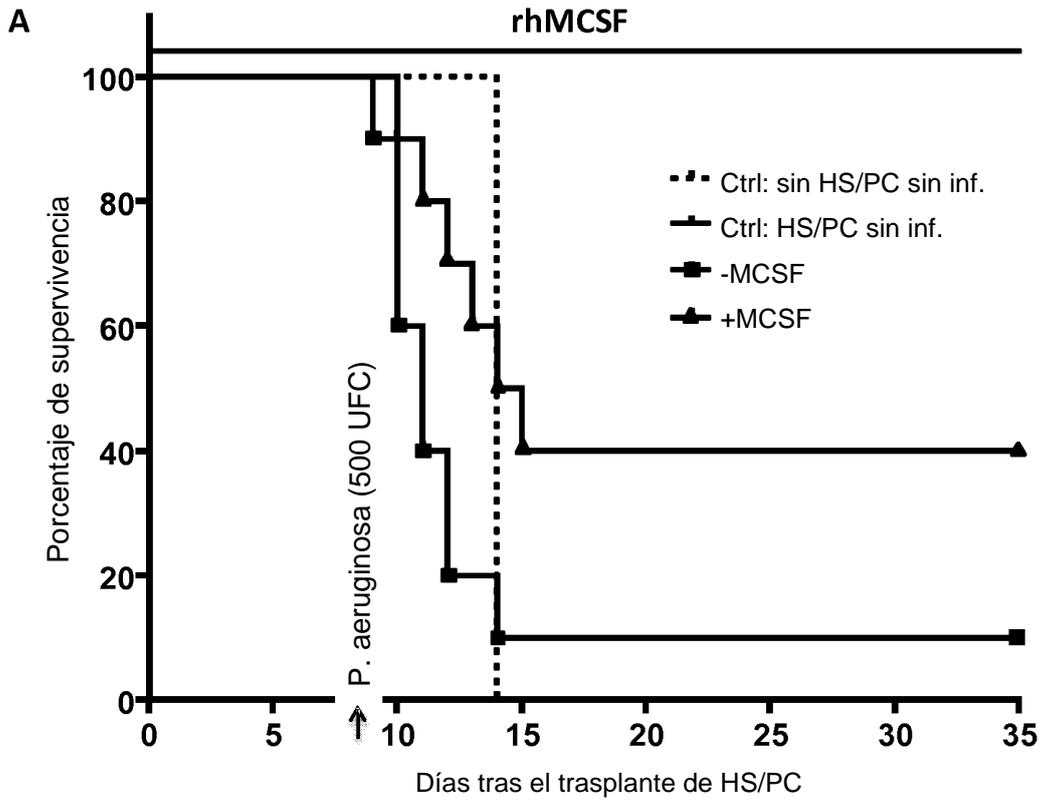


Figura 10