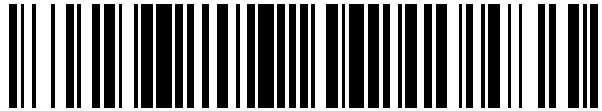


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 493**

51 Int. Cl.:

A61K 31/165 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/382 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2013 PCT/US2013/044828**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13185105**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2013 E 13800873 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2858636**

54 Título: **Métodos para tratar la neutropenia usando agonistas retinoides**

30 Prioridad:

07.06.2012 US 201261656815 P

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

27.11.2018

73 Titular/es:

**CHILDRENS HOSPITAL LOS ANGELES (100.0%)
4650 Sunset Boulevard MS 84
Los Angeles, CA 90027, US**

72 Inventor/es:

WU, LINGTAO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 691 493 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

Métodos para tratar la neutropenia usando agonistas retinoides

5 Derechos gubernamentales

La invención se desarrolló con apoyo del gobierno con los números de concesión CA111440, CA120512 y CA120512-02S1, otorgado cada uno por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene determinados derechos con respecto a la invención.

10

Campo de la invención

La divulgación se refiere a métodos para tratar, inhibir, reducir y/o promover la profilaxis de la neutropenia en un sujeto que la necesita y que comprende administrar un agonista retinoide, por ejemplo, tamibaroteno.

15

Antecedentes

Los neutrófilos, los granulocitos más comunes, constituyen hasta el 70 % de los leucocitos circulantes que defienden fundamentalmente frente a infecciones de patógenos. La neutropenia inducida por la quimioterapia del cáncer es un trastorno hematológico caracterizado por grandes reducciones del número de neutrófilos en el torrente sanguíneo. Hace ya más de dos décadas desde que se usó el G-CSF por primera vez para tratar la neutropenia adquirida y congénita^{1,2} promoviendo la granulocitopoyesis de las HSC. Debido al bajo índice terapéutico del G-CSF, sus efectos adversos de administración, y el riesgo de transformación maligna,² la neutropenia inducida por la quimioterapia en oncología sigue siendo una fuente principal de morbilidad, mortalidad y gastos sanitarios.^{3,4} Estudios recientes muestran que, al contrario que los PBN, la deficiente destrucción bacteriana en neutrófilos inducida por el G-CSF de las células CD34+ se asocia a una ausencia de gránulos maduros, debido a una granulocitopoyesis anómala al inicio del proceso de diferenciación.⁵ Por tanto, el éxito en diseñar terapias más eficaces para la neutropenia puede depender de la determinación de cómo se coordina la granulocitopoyesis con el desarrollo inmunitario basada en los neutrófilos.

30

El agonista retinoide Am80⁶⁻⁸ se ha diseñado para mejorar los efectos secundarios del ácido retinoico (RA) todo trans mediante su unión selectiva a un receptor del ácido retinoico alfa (RAR α),^{6,9,10} un factor de transcripción activado por el RA^{11,12} para regular la diferenciación granulocítica de los mieloblastos leucémicos y las HSC.¹³⁻¹⁷ El RA, una forma de origen natural de la vitamina A, desempeña un papel clave en el desarrollo del plano corporal e induce la diferenciación de muchos tipos de células normales y malignas.¹⁸⁻²⁰ Hasta la fecha, el tratamiento con RA de la leucemia promielocítica aguda (APL) representa el mejor ejemplo de terapia de inducción de la diferenciación exitosa en oncología clínica,²¹ sin embargo, los efectos secundarios asociados a la terapia con RA son generalmente graves y la resistencia al RA es un hecho común.²²⁻²⁴ Diversos estudios han demostrado que el RAR α regula diferenciación granulocítica inducida por el Am80.²⁵⁻²⁷ Además, el Am80 es aproximadamente 10 veces más eficaz, con menor toxicidad, que el RA u otros retinoides usados como terapia de diferenciación en pacientes con APL.^{7,8,28} Actualmente, el Am80 ha sido aprobado para el tratamiento de la APL en Japón^{7,8} y se ha ensayado clínicamente para diversos cánceres/enfermedades diferentes en EE.UU. y Europa (<http://www.cytrx.com/tamibarotene.html>; <http://clinicaltrials.gov>). Los avances en el uso del Am80 para inducir la diferenciación granulocítica han llevado a los presentes autores a ensayar este agente como medio para potenciar la actividad bactericida de los neutrófilos que proceden de la granulocitopoyesis durante el desarrollo inmunológico. Los presentes autores han comunicado que el Am80 posee una actividad significativamente mayor que el G-CSF como inductor de la diferenciación de los neutrófilos y del desarrollo inmunológico, posiblemente a través de su promoción de la granulocitopoyesis derivada de las HSC por la mediación de los efectos diferenciales del CD66 sobre la activación del CD18.

50 Sumario de la invención

La invención proporciona agonistas retinoides para su uso en métodos para tratar, inhibir y/o reducir la gravedad de la neutropenia, infecciones bacterianas agudas, la neutropenia inducida por la quimioterapia del cáncer y/o diversas formas de neutropenia congénita en sujetos que lo necesitan. Los métodos incluyen proporcionar una composición que incluye un agonista retinoide y administrar una cantidad eficaz de la composición al sujeto a fin de tratar, inhibir y/o reducir la gravedad de la neutropenia en el sujeto. Los métodos comprenden además administrar agentes terapéuticos adicionales simultáneamente o secuencialmente con las composiciones de la invención a fin de tratar, inhibir y/o reducir la gravedad de la neutropenia, infecciones bacterianas agudas, la neutropenia inducida por la quimioterapia del cáncer y/o diversas formas de neutropenia congénita en los sujetos. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos.

La invención proporciona también composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento, la inhibición y/o la reducción de la gravedad de la neutropenia, la neutropenia inducida por la quimioterapia del cáncer y/o diversas formas de neutropenia congénita en sujetos que lo necesitan. Las composiciones farmacéuticas incluyen cantidades

65

de agonistas retinoides. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA01115) o una combinación de los mismos.

Breve descripción de las figuras

5 En las figuras de referencia se ilustran realizaciones ejemplares.

10 La Figura 1 muestra, de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, que el Am80 promueve la diferenciación de los neutrófilos más eficazmente que el G-CSF, al tiempo que exhibe una toxicidad similarmente baja. (A) Mejor inducción granulocítica asociada a una menor inducción de monocitos en células CD34+ tratadas con G-CSF durante 6 frente a 9 o 12 días. (B & C) La concentración reducida de Am80 (2,5 nM) lleva a una inducción más eficaz de la diferenciación granulocítica que la conseguida con el G-CSF (cuadro B), al tiempo que exhibe menos toxicidad (cuadro C). (D) Comparación global del Am80 y el G-CSF en condiciones que se consideran óptimas para la diferenciación granulocítica.

15 La Figura 2 muestra, de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, que los neutrófilos inducidos por el Am80 (AIN) producen y segregan gránulos más eficazmente que los neutrófilos inducidos por el G-CSF (GIN). (A) Secreción eficaz de lactoferrina por los AIN frente a los GIN tras estímulo con *E. coli*. (B) Mayor producción y desgranulación del LL-37 por los AIN frente a los GIN. (C) Abundancia incrementada de la MMP9 intracelular tras estímulo con *E. coli* aunque insuficiente desgranulación tanto en los GIN como en los AIN.

20 La Figura 3 muestra, de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, que los AIN tanto no separados como separados con anticuerpo anti-CD15 muestran una capacidad mayor para la eliminación de bacterias que los GIN no separados y separados. (A) muestra la cuantificación de monocitos (GIN). (B) muestra la cuantificación de neutrófilos GIN frente a AIN en banda/segmentados. (C & D) Comparación del efecto de los GIN y los AIN no separados y separados sobre la eliminación de bacterias intracelulares. La eficacia de eliminación se determinó a partir del número de bacterias viables recuperadas del compartimento intracelular tras la infección.

25 La Figura 4 muestra, de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, que los AIN poseen actividades fagocíticas y bactericidas significativamente más elevadas que los GIN. (A-D) Actividades fagocíticas y bactericidas determinadas mediante el número de bacterias extracelulares (cuadro A), bacterias fagocitadas (cuadro B), bacterias intracelulares recuperadas (cuadro C) y bacterias destruidas (cuadro D). Hubo un aumento de $1,26 \pm 0,01$ veces del número de bacterias a lo largo de los 45 min del experimento. *:GIN frente a AIN, $P < 0,03$ al menos. (E) Cuantificación de las bacterias extracelulares tras la infección y de las bacterias destruidas *in situ* en GIN; AIN y neutrófilos de sangre periférica humana (PBN). *: GIN frente a AIN o PBN, $P < 0,003$ al menos.

30 La Figura 5 muestra, de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, las estructuras de ATRA (RA) y los agonistas retinoides recientemente sintetizados Am80, CH55, e IT-YA01115 (IT-YA).

35 La Figura 6 muestra, de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, que el Am80 induce la diferenciación morfológica de los granulocitos de las células CD34+ más eficazmente que el G-CSF y otros compuestos retinoides. (A-B) La mayor eficacia del RA en la inducción de la diferenciación granulocítica respecto al G-CSF (cuadro A) estaba asociada a una muerte celular significativa (cuadro B). La menor eficacia en la inducción de la diferenciación de las células CD34+ a granulocitos por el G-CSF estaba asociada a una mayor inducción de monocitos el día 12 (cuadros A). (C-D) El Am80 (10 nM) presentaba una eficacia similar en la inducción de la diferenciación granulocítica en comparación con el RA y el CH55 (cuadros A y C), al tiempo que mostraba menos inducción de monocitos que el G-CSF o el ITYA o el CH55 (cuadros A, C) y una menor tasa de muerte celular que el RA o el CH55 (cuadros B, D).

40 La Figura 7 muestra, de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, que el Am80 induce una recuperación de neutrófilos competitiva en ratones neutropénicos en comparación con los tratados con G-CSF. (A) Ilustración del diseño experimental para el análisis de la recuperación de neutrófilos medida el día 3 tras la administración de CPA con diferentes dosis de Am80 y G-CSF. (B) Se extrajo sangre periférica (PB) de ratones de control sacrificados el día 3 y los neutrófilos de PB se purificaron usando Ficoll-paque (1,084). (C) Análisis de recuperación de leucocitos (WBC) y neutrófilos en ratones neutropénicos tratados con diferentes dosis de Am80 o G-CSF el día 3.

45 La Figura 8 muestra, de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, que los neutrófilos movilizados por el Am80 en ratones neutropénicos muestran mayor actividad bactericida que los movilizados por el G-CSF. (A) El G-CSF inducía una recuperación de neutrófilos notablemente acelerada en comparación con los ratones tratados con Am80 o vehículo el día 5. (B) Análisis de neutrófilos de PB el día 5. *G-CSF frente a Am80, $P < 1,2 \times 10^{-6}$; G-CSF frente al control, $P < 4,0 \times 10^{-5}$; G-CSF frente al vehículo, $P < 8,2 \times 10^{-8}$; Am80 frente al vehículo, $P < 1,3 \times 10^{-6}$; Am80 frente al control, $P < 0,016$. (C) Las actividades fagocíticas y bactericidas de los neutrófilos, aislados de PB de diferentes ratones, se reflejaron por el número de bacterias extracelulares,

bacterias fagocitadas y bacterias destruidas tras la exposición *in vitro* de los neutrófilos aislados a *S. aureus*. *Extracelular: AIN frente a GIN, $P < 0,043$; AIN frente a C-MPBN, $P < 1,1 \times 10^{-4}$; MPBN frente a C-MPBN, $P < 3,7 \times 10^{-4}$; GIN frente a C-MPBN, $P < 0,049$. *Fagocitosis: AIN frente a GIN, $P < 0,026$; AIN frente a C-MPBN, $P < 0,02$; MPBN frente a GIN, $P < 0,042$; MPBN frente a C-MPBN, $P < 0,003$; GIN frente a C-MPBN, $P < 0,009$. *Destrucción: AIN frente a GIN, $P < 0,026$; AIN frente a C-MPBN, $P < 0,005$; MPBN frente a GIN, $P < 0,015$; MPBN frente a C-MPBN, $P < 0,003$; GIN frente a C-MPBN, $P < 0,009$. (D) Las recuperaciones aceleradas de WBC y neutrófilos cesaron el día 7 tras 96 horas de estímulo con G-CSF o Am80 o vehículo. (E) Análisis de neutrófilos de PB el día 9. *G-CSF frente al control, $P < 0,005$; Am80 frente al control, $P < 3,9 \times 10^{-4}$; Am80 frente al vehículo, $P < 0,03$; Vehículo frente al control, $P < 0,03$. (F) Los AIN presentaban actividades fagocíticas y bactericidas significativamente más elevadas que los GIN el día 9, 48 horas después de que cesara la recuperación de neutrófilos acelerada. *Extracelular: AIN frente a GIN, $P < 0,02$; AIN frente a C-MPBN, $P < 0,007$; MPBN frente a GIN, $P < 0,04$; MPBN frente a C-MPBN, $P < 0,02$. *Fagocitosis: AIN frente a C-MPBN, $P < 0,034$; MPBN frente a C-MPBN, $P < 0,043$. *Destrucción: AIN frente a C-MPBN, $P < 0,034$; MPBN frente a C-MPBN, $P < 0,043$. (G) Datos *in vivo* que demuestran que, en ratones neutropénicos, el Am80 induce suficientes neutrófilos eficaces que muestran una mayor actividad bactericida que los inducidos por el G-CSF. Se dividieron aleatoriamente veinte ratones C57BL6/J en 4 grupos para los experimentos. Se administró una única dosis de inyección intraperitoneal de ciclofosfamida (CPA) de 200 mg/kg el día 0. Se administró Am80 o G-CSF o vehículo 4 h después de la inyección de CPA durante 3 días consecutivos. La neutropenia de ratón se indujo 48-60 h después de la inyección de CPA. Después de 16 h desde la inyección intraperitoneal de 3×10^7 *S. aureus*, el experimento se efectuó el día 3. Los neutrófilos purificados se analizaron para determinar sus actividades bactericidas determinando el número de bacterias extracelulares viables en la cavidad peritoneal (cuadro G-i) y en la PB (cuadro G-ii). Se efectuó el recuento de bacterias viables en 3 ml de líquido peritoneal lavado con PBS así como con un estimado de 1,5 ml de plasma sanguíneo total. Valor P de bacterias viables en la cavidad peritoneal: Am80 frente a G-CSF, $P < 2,4 \times 10^{-8}$; control frente a GCSF, $P < 4,7 \times 10^{-9}$; vehículo frente a G-CSF, $P < 8,3 \times 10^{-3}$; Am80 frente al vehículo, $P < 3,1 \times 10^{-9}$; Am80 frente al control, $P < 0,038$. *Bacterias extracelulares viables totales del cuadro G-iii: Am80 frente a G-CSF, $P < 1,9 \times 10^{-6}$; control frente a G-CSF, $P < 9,4 \times 10^{-9}$; vehículo frente a G-CSF, $P < 6,5 \times 10^{-4}$; Am80 frente al vehículo, $P < 6,8 \times 10^{-7}$; control frente a Am80, $P < 3,8 \times 10^{-5}$. Los cambios en veces de las bacterias viables se dan en el cuadro G-iv. Las bacterias viables del grupo de control se usaron como patrón de 1 vez.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de otra manera, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los significados comúnmente entendidos por el experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Los documentos Singleton et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 3ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); March, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure* 5ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); y Sambrook y Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001), proporcionan una guía general al experto en la técnica para muchos de los términos usados en la presente solicitud.

El experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que se podrían usar en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no está limitada de ningún modo a los métodos y materiales descritos. Para los fines de la presente invención, los términos siguientes se definen a continuación.

La expresión "resultados beneficiosos" puede incluir, si bien no se limita en absoluto a los mismos, reducir o aliviar la gravedad de la patología, prevenir el empeoramiento de la patología, curar la patología, prevenir el desarrollo de la patología, reducir las posibilidades de un paciente de desarrollar la patología y prolongar la vida de un paciente o su esperanza de vida.

El término "mamífero", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de la clase *Mammalia* que incluye, si bien sin limitación, humanos y primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; animales domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no indica una edad o un sexo particular. Así pues, se pretende que estén incluidos sujetos adultos y recién nacidos, al igual que fetos, ya sea de sexo masculino o femenino, dentro del alcance de este término.

El término "neutropenia", tal como se usa en el presente documento, se refiere a niveles anormalmente bajos de neutrófilos en la sangre. La neutropenia puede ser debida a una producción reducida de leucocitos (por ejemplo debida a, incluyendo pero no limitándose a los mismos, agentes terapéuticos que afectan a la médula ósea, trastornos hereditarios/congénitos que afectan a la médula ósea, anemia aplásica, cáncer, radioterapia, deficiencia de vitamina B₁₂, folato o cobre y/o exposición a pesticidas). La neutropenia puede ser debida también a la destrucción de leucocitos (por ejemplo debida a, incluyendo pero no limitándose a los mismos, infecciones bacterianas agudas, determinadas enfermedades autoinmunitarias, tratamientos de quimioterapia y/o agentes terapéuticos). La neutropenia puede ser debida también al secuestro y/o la migración de leucocitos (por ejemplo

debidos a, incluyendo pero no limitándose a los mismos, hemodiálisis, malaria y/o infecciones bacterianas). Determinadas medicaciones tales como flecainida, fenitoína, indometacina, propiltiouracilo, carbimazol, clorpromazina, trimetoprim/sulfametoxazol (cotrimoxazol), clozapina, ticlodipina pueden dar como resultado una neutropenia. Los métodos y composiciones de la invención se pueden usar para tratar, inhibir, reducir la gravedad de la neutropenia y/o promover la profilaxis de la neutropenia, debida a cualquiera de las causas anteriores. Los métodos y composiciones de la invención se pueden usar también para tratar, inhibir, reducir la gravedad de las patologías debidas a cualquiera de las causas anteriores de neutropenia, y/o para promover la profilaxis de las mismas, mediante el tratamiento, la inhibición, la reducción de los síntomas de la neutropenia y/o la promoción de la profilaxis de la neutropenia.

Los términos "tratamiento" y "tratar", tal como se usan en el presente documento, se refieren tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en los que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) la patología objetivo, prevenir la patología, buscar u obtener resultados beneficiosos, o reducir las posibilidades del sujeto de desarrollar la patología incluso si el tratamiento finalmente no tiene éxito. Los sujetos que necesitan el tratamiento incluyen los que ya padecen la patología así como aquellos proclives a padecer la patología o aquellos en los que se ha de prevenir la patología.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que es capaz de conseguir resultados beneficiosos en un sujeto mamífero con neutropenia. Se puede determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de forma individual y se basará, al menos en parte, en la consideración de las características fisiológicas del mamífero, el tipo de sistema de administración o técnica terapéutica empleados y el momento de administración con respecto a la progresión de la enfermedad.

A pesar de los avances en el uso terapéutico del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) recombinante para promover la granulocitopoyesis de células madre hematopoyéticas (HSC) humanas, la neutropenia sigue siendo una de las complicaciones más graves de la quimioterapia del cáncer. Usando un modelo *ex vivo* para inducir la diferenciación granulocítica de células hematopoyéticas primitivas CD34+, los presentes autores han descubierto que el Am80 (tamibaroteno), un nuevo agonista retinoide, es más potente que el G-CSF en la coordinación de la diferenciación de los neutrófilos y el desarrollo inmunitario. El análisis funcional y la formación de imágenes *in situ* de la producción de gránulos, la infección por *E. coli*, y la destrucción de bacterias demostraron que análogamente a los neutrófilos de sangre periférica (PBN) humanos, los neutrófilos inducidos por el Am80 (AIN) presentaban actividades bactericidas mayores que los neutrófilos inducidos por el G-CSF (GIN). A diferencia de los GIN pero de forma similar a los PBN, la destrucción bacteriana potenciada por los AIN se asociaba a una mayor coexpresión del antígeno CD66 con la subunidad CD18 de la integrina $\beta 2$. De forma consistente, el anticuerpo anti-CD18 neutralizaba las actividades bactericidas de los AIN inducidas por el Am80. Por tanto, los AIN parece que proporcionan un medio más eficaz para promover la diferenciación de los neutrófilos y actividades bactericidas en comparación con el G-CSF, posiblemente mediante la coordinación de la interacción funcional del CD66 con el CD18 para promover el desarrollo de la inmunidad basada en los neutrófilos durante la granulocitopoyesis. Estos descubrimientos del presente documento proporcionan una justificación molecular para diseñar un nuevo tratamiento contra la neutropenia usando el Am80 como opción de tratamiento rentable.

De acuerdo con esto, la invención proporciona agonistas retinoides para su uso en el tratamiento de la neutropenia en un sujeto mamífero que lo necesite. El método comprende proporcionar una composición que comprende un agonista retinoide y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto a fin de tratar la neutropenia en el sujeto. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. En una realización, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80), o una sal del mismo.

La invención proporciona adicionalmente agonistas retinoides para su uso en métodos para reducir la gravedad de la neutropenia en un sujeto mamífero que lo necesite. El método comprende proporcionar una composición que comprende un agonista retinoide y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto a fin de reducir la gravedad de la neutropenia en el sujeto. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. En una realización, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80), o una sal del mismo.

La invención proporciona también agonistas retinoides para su uso en métodos para inhibir la neutropenia en un sujeto mamífero que lo necesite. El método comprende proporcionar una composición que comprende un agonista retinoide y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto a fin de inhibir la neutropenia en el sujeto. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. En una realización, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80), o una sal del mismo.

Adicionalmente, la invención proporciona agonistas retinoides para su uso en métodos para promover la profilaxis de la neutropenia en un sujeto que lo necesite. El método comprende proporcionar una composición que comprende un agonista retinoide y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto a fin de promover la profilaxis de la neutropenia en el sujeto. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más

de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. En una realización, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80), o una sal del mismo.

5 La invención proporciona adicionalmente agonistas retinoides para su uso en un método para tratar, inhibir y/o reducir la gravedad de la neutropenia inducida por la quimioterapia del cáncer en un sujeto que lo necesite. El método comprende proporcionar una composición que comprende un agonista retinoide y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto a fin de tratar, inhibir y/o reducir la gravedad de la neutropenia inducida por la quimioterapia del cáncer. El método comprende adicionalmente administrar un agente quimioterapéutico. En una realización, el agente quimioterapéutico y la composición que comprende un agonista retinoide se administran simultáneamente. En otra realización, el agente quimioterapéutico y la composición que comprende un agonista retinoide se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. En una realización, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80), o una sal del mismo.

15 Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, actinomicina, alitretinoína, ácido retinoico todo trans, azacitidina, azatioprina, bevacizumab, bexatoteno, bleomicina, bortezomib, carboplatino, capecitabina, cetuximab, cisplatino, clorambucil, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, epirubicina, epotilona, erlotinib, etopósido, fluorouracilo, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, idarrubicina, imatinib, ipilimumab, irinotecán, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, ocrelizumab, ofatumumab, oxaliplatino, paclitaxel, panitumab, pemetrexed, rituximab, taflupósido, tenipósido, tioguanina, topotecán, tretinoína, valrubicina, vemurafenib, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, vorinostat, romidepsina, 5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), cladribina, clofarabina, floxuridina, fludarabina, pentostatina, mitomicina, ixabepilona, estramustina, prednisona, metilprednisolona, dexametasona o una combinación de los mismos.

25 La divulgación proporciona también un método para tratar, inhibir, reducir la gravedad de una infección bacteriana aguda y/o promover la profilaxis de la misma en un sujeto que lo necesite. El método comprende proporcionar una composición que comprende un agonista retinoide, proporcionar una composición que comprende un agente terapéutico antibacteriano y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cada una de las composiciones al sujeto para tratar, inhibir, reducir la gravedad de una infección bacteriana aguda y/o promover la profilaxis de la misma en el sujeto. En un aspecto de la divulgación, la composición que comprende el agonista retinoide y la composición que comprende el agente terapéutico antibacteriano se administran simultáneamente. En otro aspecto, la composición que comprende el agonista retinoide y la composición que comprende el agente terapéutico antibacteriano se administran secuencialmente. En algunos aspectos, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. En un aspecto, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80), un análogo y/o una sal del mismo.

40 La invención proporciona además métodos para tratar, inhibir, reducir la gravedad de la neutropenia congénita y/o promover la profilaxis de la misma (que incluye, si bien no se limita a los mismos, el síndrome de Kostmann, la neutropenia cíclica o el síndrome Chediak Higashi) en un sujeto mamífero que lo necesite. El método comprende proporcionar una composición que comprende un agonista retinoide y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto para tratar, inhibir, reducir la gravedad de la neutropenia congénita y/o promover la profilaxis de la misma en el sujeto. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. En una realización, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80), un análogo y/o una sal del mismo.

50 En algunas realizaciones, los sujetos mamíferos que necesitan las composiciones descritas en el presente documento son pacientes con una producción reducida de leucocitos debida a, incluyendo pero no limitándose a los mismos, una medicación que afecta a la médula ósea (tal como fármacos contra el cáncer, fármacos antipsicóticos, fármacos anticonvulsivos), trastornos hereditarios y/o congénitos que afectan a la médula ósea, un tratamiento de radioterapia al que están sometidos los pacientes, una deficiencia de vitamina B₁₂, una deficiencia de ácido fólico o una combinación de los mismos.

55 En realizaciones adicionales, los sujetos mamíferos que necesitan las composiciones descritas en el presente documento son sujetos con leucocitos dañados, destruidos y/o con menores cantidades de leucocitos debido a, incluyendo pero no limitándose a los mismos, infecciones bacterianas agudas, trastornos autoinmunitarios (tales como lupus eritematoso sistémico), un uso de medicaciones de sulfonamida, o una combinación de los mismos.

60 En realizaciones adicionales, los sujetos mamíferos que necesitan las composiciones descritas en el presente documento son sujetos que padecen un secuestro y/o migración de leucocitos (tales como neutrófilos) debido a, incluyendo pero no limitándose a los mismos, hemodiálisis, malaria, infecciones bacterianas o una combinación de los mismos.

65 En varias realizaciones, la composición de la invención que comprende un agonista retinoide puede ser administrada simultáneamente o secuencialmente con otros agentes terapéuticos que incluyen, si bien no se limitan a los mismos, agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia. Los agentes quimioterapéuticos y/o la radioterapia reducen con

frecuencia el número de leucocitos dando lugar a una neutropenia. La administración de la composición de la invención simultáneamente o secuencialmente con agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia puede inhibir y/o reducir la gravedad de la neutropenia. En varias realizaciones, la composición de la invención que comprende un agonista retinoide se administra antes, durante o después de la administración de los agentes quimioterapéuticos y/o la radioterapia. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. En una realización, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80), o una sal del mismo.

Análogamente, la composición que comprende un agonista retinoide puede ser administrada simultáneamente o secuencialmente con fármacos anticonvulsionantes y/o antipsicóticos para inhibir y/o reducir la gravedad de la neutropenia resultante del uso de dichos fármacos. En varias realizaciones, la composición de la invención que comprende un agonista retinoide se administra antes, durante o después de la administración de los fármacos anticonvulsionantes y/o antipsicóticos. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. En una realización, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80), o una sal del mismo.

Adicionalmente, la composición que comprende un agonista retinoide puede ser administrada simultáneamente o secuencialmente con agentes terapéuticos usados para tratar infecciones bacterianas agudas, infecciones fúngicas y/o enfermedades autoinmunitarias para inhibir y/o reducir la gravedad de la neutropenia que puede ocurrir debido a infecciones bacterianas y fúngicas y/o enfermedades autoinmunitarias y/o debido a agentes terapéuticos que se pueden usar para tratar infecciones bacterianas, infecciones fúngicas y/o enfermedades autoinmunitarias. En varias realizaciones, la composición de la invención que comprende un agonista retinoide se administra antes, durante o después de la administración de agentes terapéuticos usados para tratar infecciones bacterianas agudas, infecciones fúngicas y/o enfermedades autoinmunitarias. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. En una realización, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80), o una sal del mismo.

En varias realizaciones, el agonista retinoide se administra por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, oral o mediante inhalación. En una realización, el agonista retinoide es tamibaroteno.

En varias realizaciones, la cantidad eficaz del agonista retinoide es una cualquiera o más de aproximadamente 0,01 a 0,05 µg/kg/día, 0,05-0,1 µg/kg/día, 0,1 a 0,5 µg/kg/día, 0,5 a 5 µg/kg/día, 5 a 10 µg/kg/día, 10 a 20 µg/kg/día, 20 a 50 µg/kg/día, 50 a 100 µg/kg/día, 100 a 150 µg/kg/día, 150 a 200 µg/kg/día, 200 a 250 µg/kg/día, 250 a 300 µg/kg/día, 300 a 350 µg/kg/día, 350 a 400 µg/kg/día, 400 a 500 µg/kg/día, 500 a 600 µg/kg/día, 600 a 700 µg/kg/día, 700 a 800 µg/kg/día, 800 a 900 µg/kg/día, 900 a 1000 µg/kg/día, 0,01 a 0,05 mg/kg/día, 0,05-0,1 mg/kg/día, 0,1 a 0,5 mg/kg/día, 0,5 a 1 mg/kg/día, 1 a 5 mg/kg/día, 5 a 10 mg/kg/día, 10 a 15 mg/kg/día, 15 a 20 mg/kg/día, 20 a 50 mg/kg/día, 50 a 100 mg/kg/día, 100 a 200 mg/kg/día, 200 a 300 mg/kg/día, 300 a 400 mg/kg/día, 400 a 500 mg/kg/día, 500 a 600 mg/kg/día, 600 a 700 mg/kg/día, 700 a 800 mg/kg/día, 800 a 900 mg/kg/día, 900 a 1000 mg/kg/día o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. En una realización, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80), o una sal del mismo. Las posologías normales de una cantidad eficaz de un agonista retinoide pueden estar en los intervalos recomendados por el fabricante, en los que se usan los compuestos terapéuticos conocidos, y también según indique el experto en la técnica por las respuestas *in vitro* o las respuestas en modelos animales. Tales posologías se pueden reducir normalmente en aproximadamente un orden de magnitud de concentración o cantidad sin perder actividad biológica relevante. La posología real puede depender del criterio del médico, el estado del paciente, y la eficacia del método terapéutico basado, por ejemplo, en el grado de respuesta *in vitro* de células cultivadas o muestras de tejido histocultivado relevantes, tales como tumores malignos biopsiados, o las respuestas observadas en modelos animales apropiados. En varias realizaciones, las composiciones de la invención que comprenden el agonista retinoide se pueden administrar una vez al día (SID/QD), dos veces al día (BID), tres veces al día (TID), cuatro veces al día (QID) o más, a fin de administrar una cantidad eficaz de agonista retinoide al sujeto, siendo la cantidad eficaz una cualquiera o más de las posologías descritas en el presente documento.

La divulgación proporciona también métodos para identificar el agonista retinoide. El método incluye poner en contacto células CD34+ con una molécula de interés, seguidamente poner en contacto las células CD34+ y la molécula de interés con un antígeno para estimular una respuesta inmunitaria y evaluar si el contacto entre las células CD34+, la molécula de interés y el antígeno lleva a un aumento de secreción de lactoferina, LL-37 o una combinación de los mismos. En un aspecto de la divulgación, el aumento de secreción de lactoferina, LL-37 o una combinación de los mismos es indicativo de que la molécula de interés es un agonista retinoide.

Ensayos que se pueden emplear para identificar compuestos que son agonistas retinoides incluyen, si bien no se limitan a los mismos, ensayo de micromatrices, PCR cuantitativa, ensayo de transferencia Northern, ensayo de transferencia Southern, ensayo de transferencia Western, ensayos inmunohistoquímicos, ensayos de unión, ensayos de retardo en gel o ensayos que usan sistemas de doble híbrido en levadura. Un experto en la técnica puede emplear con facilidad numerosas técnicas conocidas en la técnica para determinar si un agente/una molécula de interés particular es un agonista retinoide.

En varias realizaciones, el sujeto se selecciona entre el grupo que consiste en humanos, primates no humanos, monos, simios, perros, gatos, vacas, caballos, conejos, ratones y ratas.

5 Composiciones farmacéuticas

En varias realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen un excipiente farmacéuticamente aceptable junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista retinoide tal como tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. La expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es en general seguro, no tóxico y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición de aerosol, gaseosos.

En varias realizaciones, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden formular para ser administradas mediante cualquier vía de administración. La expresión "vía de administración" puede referirse a cualquier forma de administración conocida en la técnica que incluye, si bien no se limita a los mismos, de aerosol, nasal, oral, transmucosa, transdérmica, parenteral o enteral. El término "parenteral" se refiere a una vía de administración que se asocia generalmente a la inyección, incluyendo la intraorbital, de infusión, intraarterial, intracapsular, intracardíaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosa, o transtraqueal. Para la vía parenteral, las composiciones pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para infusión o para inyección, o en forma de polvos liofilizados. Para la vía parenteral, las composiciones pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para infusión o para inyección. Para la vía enteral, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas de gel, comprimidos recubiertos de azúcar, jarabes, suspensiones, soluciones, polvos, gránulos, emulsiones, microesferas o nanoesferas o vesículas de lípido o vesículas de polímero que permiten una liberación controlada.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden contener también cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un material, composición o portador farmacéuticamente aceptable que está implicado en llevar o transportar un compuesto de interés desde un tejido, órgano o porción del cuerpo a otro tejido, órgano o porción del cuerpo. Por ejemplo, el vehículo puede ser una carga, un diluyente, un excipiente, un disolvente o un material de encapsulación sólido o líquido, o cualquier combinación de los mismos. Cada componente del vehículo debe ser "farmacéuticamente aceptable" en el sentido de que debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. También debe ser adecuado para su uso en contacto con cualquier tejido u órgano con el que pueda entrar en contacto, lo que significa que no debe conllevar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere en exceso los beneficios terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también se pueden encapsular, comprimir o preparar en forma de una emulsión o jarabe para administración oral. Se pueden añadir vehículos farmacéuticamente aceptables sólidos o líquidos para mejorar o estabilizar la composición, o para facilitar la preparación de la composición. Los vehículos líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, glicerina, solución salina, alcoholes y agua. Los vehículos sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio dihidrato, terra alba, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, goma arábiga, agar o gelatina. El vehículo puede incluir también un material de liberación sostenida tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solos o combinados con una cera.

Las preparaciones farmacéuticas se preparan siguiendo las técnicas convencionales en farmacia que incluyen molienda, mezcla, granulación y compresión, cuando sea necesario, para formas de comprimido; o molienda, mezcla y llenado para formas de cápsula de gelatina dura. Cuando se usa un vehículo líquido, la preparación puede estar en forma de un jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no acuosa. Tal formulación líquida se puede administrar directamente por vía oral o bien se puede rellenar con ella una cápsula de gelatina blanda.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz exacta es la cantidad de la composición que dará los resultados más efectivos en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto dado. Esta cantidad variará dependiendo de una serie de factores que incluyen, si bien no se limitan a los mismos, las características del compuesto terapéutico (incluyendo actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluyendo edad, sexo, tipo y estadio de la enfermedad, estado físico general, grado de respuesta a una posología dada, y tipo de medicación), la naturaleza del vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables de la formulación, y la vía de administración. Un experto en las técnicas clínica y farmacológica será capaz de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz mediante experimentación habitual, por ejemplo, mediante el control de la respuesta del sujeto a la administración de un compuesto y el correspondiente ajuste de la posología. Para una guía adicional, véase Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (Gennaro Ed. 20^a edición, Williams & Wilkins PA, EE.UU.) (2000).

Kits de la divulgación

5 La divulgación proporciona también un kit para el tratamiento de la neutropenia, la inhibición de la neutropenia, la
 reducción de la neutropenia o la promoción de la profilaxis de la neutropenia en un sujeto que lo necesite. El kit
 comprende una composición que comprende un agonista retinoide e instrucciones para el uso de la composición
 para tratar, inhibir y/o reducir la gravedad de la neutropenia, infecciones bacterianas agudas, la neutropenia inducida
 10 por la quimioterapia del cáncer y/o diversas formas de neutropenia congénita en sujetos que lo necesitan. En
 algunos aspectos, el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (ITYA-01115)
 o una combinación de los mismos. En un aspecto de la divulgación, el agonista retinoide es tamibaroteno (AM80).

15 El kit es una colección de materiales o componentes que incluyen al menos una de las composiciones de la
 invención. Así pues, en algunos aspectos el kit contiene una composición que incluye un agonista retinoide tal como
 uno cualquiera o más de los siguientes: tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (ITYA-01115) o una combinación de los
 mismos, tal como se ha descrito anteriormente.

20 La naturaleza exacta de los componentes configurados en el kit de la invención depende del fin previsto. En un
 aspecto, el kit se configura particularmente para sujetos humanos. En aspectos adicionales, el kit se configura
 particularmente para aplicaciones veterinarias, para tratar sujetos que incluyen, si bien no se limitan a los mismos,
 animales de granja, animales domésticos y animales de laboratorio.

25 En el kit se deben incluir las instrucciones para su uso. La expresión "instrucciones para su uso" incluye
 normalmente una expresión tangible que describe la técnica que se ha de emplear en el uso de los componentes del
 kit para obtener un resultado deseado, tal como para tratar, reducir la gravedad de la neutropenia o para inhibir o
 prevenir la neutropenia en un sujeto. Opcionalmente, el kit contiene también otros componentes útiles, tales como
 instrumentos de medida, diluyentes, tampones, vehículos farmacéuticamente aceptables, jeringas y otros elementos
 útiles fácilmente reconocibles por los expertos en la técnica.

30 Los materiales o componentes recogidos en el kit se pueden proporcionar al médico almacenados en cualquier
 forma conveniente y adecuada para conservar su funcionalidad y utilidad. Por ejemplo, los componentes pueden
 estar en forma disuelta, deshidratada o liofilizada; se pueden proporcionar a temperatura ambiente, refrigerados o
 congelados. Los componentes están contenidos normalmente en un material o materiales de envasado adecuados.
 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "material de envasado" se refiere a una o más estructuras
 35 físicas usadas para albergar el contenido del kit, tal como las composiciones de la invención y similares. El material
 de envasado se fabrica mediante métodos bien conocidos, preferentemente para proporcionar un entorno estéril y
 sin contaminantes. Tal como se usa en el presente documento, el término "envase" se refiere a una matriz o material
 sólido adecuado tal como vidrio, plástico, papel, papel de aluminio y similares, capaz de contener los componentes
 individuales del kit. Así, por ejemplo, un envase puede ser una botella usada para contener cantidades adecuadas
 40 de una composición de la invención que contiene un agonista retinoide tal como uno cualquiera o más de los
 siguientes: tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos. El material de
 envasado tiene generalmente una etiqueta externa que indica el contenido y/o el fin del kit y/o de sus componentes.

Ejemplos

45 Ejemplo 1

Células y cultivo celular

50 Las células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano primitivas normales eran de AllCells (Emeryville, CA). Las
 células CD34+ se expandieron²⁹ aproximadamente 50 veces usando un medio sin suero StemSpan (StemCell
 Technologies, Vancouver, Canadá) durante 6 días de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para inducir la
 granulocitopoyesis, se cultivaron las células CD34+ con medio mielóide complementado con 25 ng/ml de G-CSF^{17,29}
 durante 6-12 días. Las células linfoides y eritroides se bloquearon durante la granulocitopoyesis mediante adición de
 55 hidrocortisona y la exclusión de eritropoyetina.^{17,29} El ácido retinoico (RA) todo trans era de Sigma (San Luis, MO),
 mientras que los agonistas retinoides Am80, CH55, y ITYA-01115 (ITYA) eran de Research Foundation ITSUU
 Laboratory (Tokio, Japón). Cada compuesto retinoide se disolvió en etanol. En los estudios se aplicaron las
 condiciones determinadas experimentalmente, usando 25 ng/ml de G-CSF^{17,29} o Am80 2,5 nM para la inducción
 granulocítica durante 6 días (Figura 1).

60 *PBN humanos*

65 Se extrajo sangre venosa periférica de voluntarios sanos de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité de
 investigaciones clínicas del Hospital de Niños de Los Ángeles/Facultad de Medicina de Keck de la Universidad del
 Sur de California (CHLA/USC). Cada muestra de 20 ml de sangre se recogió en tubos de coagulación Vacutainer
 (BD Biosciences, San José, CA) y se diluyó con 1 volumen de HBSS a temperatura ambiente. La sangre diluida se
 cargó en 10 ml de Ficoll-paque Premium (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y se centrifugó a 400 x g durante 40 min.

La capa de eritrocitos-PBN se mezcló después con 15 ml de dextrano T500 (Sigma) al 3 % para su sedimentación durante 2 h a temperatura ambiente. Los eritrocitos se eliminaron mediante lisis hipotónica con agua estéril durante 18 s y la capa rica en PBN se recogió después mediante centrifugación. La pureza de los PBN recogidos era > 95 %, medida mediante análisis morfológico con tinción de Wright-Giemsa. Los PBN recién purificados se usaron en los ensayos inmediatamente después de finalizar el aislamiento de los PBN.

Proliferación celular y muerte celular

La proliferación celular se determinó mediante recuento celular con un hemocitómetro convencional, tal como se ha descrito.^{17,29} Brevemente, se contó por triplicado un número igual de células sembradas en placas durante un periodo de hasta 13 días, una vez transcurridas 72 h desde la siembra. Usando la exclusión de azul de triptano, se midieron simultáneamente en los cultivos la proliferación celular y la muerte celular asociada a la misma.

Análisis morfológico de la diferenciación granulocítica

Las suspensiones de células se sometieron a citocentrifugación en portaobjetos Micro, seguida de fijación con metanol y tinción de Wright-Giemsa (Sigma) tal como se ha descrito.^{17,29} Los indicadores morfológicos de la diferenciación se evaluaron en un microscopio Zeiss Axioplan, y las imágenes se sometieron a un balance de color con Adobe Photoshop tal como se ha descrito.¹⁷

Microscopía electrónica de transmisión

El estudio ultraestructural de los neutrófilos y de la infección bacteriana fue efectuado por los miembros del Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Patología y Medicina de Laboratorio, CHLA/USC. Los procedimientos se detallan a continuación.

Transferencia de Western

La transferencia de Western (WB) se realizó tal como se ha descrito.¹⁵ Se usaron en el análisis anticuerpos para lactoferrina (Abcam, Cambridge, GB), MMP-9 (Merck Chemicals, Darmstadt, Alemania), y LL-37 (Biolegend, San Diego, CA).

Ensayos de desgranulación

Se incubaron las células con o sin *E. coli* DH5 α (MOI de 5; proporción entre células y bacterias de 1:5) en medio DMEM sin suero durante 30 min a 37 °C. Se recogieron los sedimentos celulares y los sobrenadantes mediante centrifugación a 3000 r.p.m. durante 7 min. Los sedimentos celulares se suspendieron en 100 μ g/ml de gentamicina y se incubaron a 37 °C durante 1 h, seguido de la cosecha de las células y la extracción de las proteínas celulares. El sobrenadante se filtró con un filtro de 0,22 μ m (Pall corporation, Ann Arbor, MI) y las proteínas del sobrenadante se concentraron después usando una unidad de filtración centrífuga Amicon Ultra-4 diseñada para recoger proteínas con una masa superior a 3000 daltons (Millipore, Billerica, MA). Se midió la cantidad de proteínas usando un ensayo de proteínas Bio-Rad DC (Hercules, CA).²⁹ El cambio de niveles de las proteínas granulares con o sin estímulo de *E. coli* se analizó en paralelo mediante WB.

Ensayos de fagocitosis y destrucción bacteriana

Se suspendieron de 5×10^5 a 2×10^6 de PBN recién purificados así como GIN y AIN inducidos *ex-vivo* con 500 μ l de medio de cultivo (DMEM con un 10 % de FBS) en tubos de 1,5 ml. Las células se incubaron con *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α en fase exponencial (proporcionada por un colaborador) o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*; ATCC) a una MOI de 5 o 10 a 37 °C durante 15, 30 y/o 60 min, mientras que se usaron bacterias en ausencia de células para determinar el crecimiento. Las muestras con o sin células se centrifugaron a 1000 r.p.m. en cada punto de tiempo. Se recogieron las bacterias extracelulares en presencia de células a partir de los sobrenadantes, y se contaron sembrando en placa diferentes diluciones (20 μ l cada una) sobre agar sangre. Los sedimentos celulares recogidos a partir de las muestras infectadas con bacterias se incubaron adicionalmente con 100 μ g/ml de gentamicina (Sigma) durante 1 h a 37 °C para destruir las bacterias externas. Las células se lavaron después dos veces y se lisaron con 100 μ l de Triton X-100 al 0,5 %. Alícuotas con diferentes diluciones (20 μ l para cada una) de bacterias intracelulares viables recuperadas de los lisados celulares se sembraron en placa sobre agar sangre. Se determinó el número de bacterias extracelulares e intracelulares viables en cada punto de tiempo mediante recuento de las UFC tal como se ha descrito,^{5,30} mientras que el número de bacterias fagocitadas y destruidas se basó en los recuentos de bacterias extracelulares e intracelulares viables con respecto al número de bacterias de control relevantes en la condición de ausencia de neutrófilos.^{5,30}

Separación magnética de neutrófilos D15+

Se mezclaron células suspendidas en PBS que contenía un 0,5 % de BSA y EDTA 2 nM con anticuerpos anti-CD15 conjugados a microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemania) para su incubación durante

30 min a 4 °C. La subpoblación de CD15+ se purificó después usando un clasificador magnético (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Análisis estadístico

5 La estadística descriptiva, que incluía medias, desviaciones típicas y rangos, se computerizó cuando fue necesario y se analizó mediante una prueba t de Student bilateral para muestras independientes. Los valores p de 0,05 o inferiores se consideraron estadísticamente significativos.

10 *Destrucción bacteriana in situ*

Se incubaron las células con *E. coli* o *S. aureus* durante 15 min y/o 60 min, y se recogieron después las células mediante centrifugación a 1000 r.p.m. durante 5 min. Los sedimentos celulares se suspendieron con 100 µg/ml de gentamicina y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Después de lavar tres veces, las células se permeabilizaron con solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) a 4 °C durante 20 min. Las células se lavaron de nuevo y se resuspendieron en PBS para marcar las bacterias intracelulares vivas y muertas, usando el kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight (Life Technologies, Grand Island, NY) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se centrifugaron sobre microportaobjetos y se examinaron en un microscopio confocal con líneas de 488 y 564 nm de láser de kriptón/argón. Las bacterias vivas teñidas con tinción fluorescente SYTO9 con membranas intactas aparecían verdes, mientras que las bacterias muertas con membranas dañadas se tiñeron de rojo con tinción fluorescente de yoduro de propidio (PI).

Detección por inmunofluorescencia de la infección bacteriana

25 Se incubaron GIN, AIN y PBN con *E. coli* o *S. aureus* a una MOI de 10 a 37 °C durante 15 min y 60 min. Las células se fijaron con un 2 % de paraformaldehído a temperatura ambiente durante 20 min, seguido del bloqueo con PBS que contenía suero de cabra normal al 5 % durante 30 min. Para bloquear los antígenos OmpA de las bacterias retenidas sobre la superficie celular tras la infección, las células se incubaron primero con anticuerpo anti-OmpA durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de la incubación con anticuerpo IgG anticonejo conjugado con HRP a temperatura ambiente durante 30 min a fin de bloquear los sitios de los anticuerpos primarios externos. Después de lavar profusamente, las células se permeabilizaron con solución de permeabilización (BD Biosciences) durante 20 min y después se incubaron con anticuerpo anti-OmpA para marcar las bacterias intracelulares a temperatura ambiente durante 1 h. Tras la incubación de las células con anticuerpo IgG cabra anticonejo conjugado con FITC durante 30 min, las células se centrifugaron después sobre portaobjetos Micro, y se montaron con solución de fijación Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se obtuvieron imágenes de las bacterias teñidas con FITC con un microscopio confocal.

Análisis mediante citometría de flujo

40 Los anticuerpos CD66-PE anti-humano (que reconocen las subunidades CD66a, CD66c, CD66d, y CD66e), CD11b-APC, CD18-FITC, y CD66b-PE así como sus isotipos correspondientes era de BD Biosciences. El CD66a-PE antihumano y su isotipo correspondiente eran de R&D systems (Minneapolis, MN). Los datos fueron adquiridos y analizados con un software FlowJo (versión 7.6.5; Tree star, Ashland, OR).

45 Ejemplo 2

El Am80 promueve la diferenciación de los neutrófilos más eficazmente que el G-CSF

50 El Am80, el CH55, y el ITYA son un grupo de agonistas retinoides que fueron sintetizados mediante la introducción de heteroátomos en estructuras de tipo RA (Figura 5). Puesto que todos estos agonistas poseen potentes actividades retinoides, las eficacias de estos compuestos se compararon con las del G-CSF y el RA en la inducción de la granulocitopoyesis en células CD34+, usando la metodología establecida de los presentes autores.^{17,29} Los inventores demostraron que el G-CSF era menos eficaz que el RA en la inducción de la diferenciación morfológica de las células CD34+ a granulocitos, acompañada de una mayor inducción de monocitos (Figuras 6A). Sin embargo, el G-CSF inducía una mayor proliferación celular y una menor tasa de muerte celular en comparación con el RA (Figura 6B). De los otros agonistas retinoides, el Am80 (10 nM) y el CH55 (5 nM) promovieron > 75 % de la diferenciación granulocítica el día 13, al contrario que el ITYA (5 nM) que produjo > 60 % de los monocitos (Figura 6C). Si bien tanto el Am80 como el CH55 inhibían la proliferación celular (Figura 6D) al igual que el RA (Figura 6B), la tasa de muerte celular asociada al tratamiento con Am80 era inferior que la observada con el CH55 o con el RA (Figura 6B, 6D). En conjunto, estos datos muestran que el G-CSF es significativamente menos eficaz como inductor de la diferenciación granulocítica que el RA, el CH55, y el Am80, mientras que el ITYA indujo principalmente la diferenciación de monocitos. Aunque el Am80, el RA y el CH55 promueven la diferenciación granulocítica con una eficacia similar, el Am80 induce una menor tasa de muerte celular.

65 Debido a que un menor nivel de diferenciación de las células CD34+ a granulocitos inducida por el G-CSF el día 12 se asociaba a un nivel mayor de inducción de monocitos, el G-CSF puede inducir una diferenciación granulocítica

más eficazmente en un corto periodo de tiempo. Por tanto, las células CD34+ se trataron con G-CSF durante 6, 9 y 12 días. Mediante análisis de la diferenciación morfológica de esas células, los inventores descubrieron una diferenciación granulocítica más eficaz con la menor tasa de inducción de monocitos el día 6, en comparación con el día 9 o el día 12 (Figura 1A). Usando estas condiciones de inducción óptima del día 6, el G-CSF y el Am80 se compararon para determinar su capacidad para inducir la diferenciación granulocítica de células CD34+. Debido a que el Am80 10 nM inducía más muertes celulares (Figura 6C), se sustituyó por un Am80 de menor concentración (2,5 nM o 5 nM) en los ensayos. Los resultados mostraron que el Am80 2,5 nM no solo inducía considerablemente una diferenciación granulocítica con una inducción de monocitos despreciable (Figura 1B), sino que también producía menos toxicidad que el Am80 5 nM (Figura 1C). Por consiguiente, estos resultados indican que el período de inducción óptima de 6 días para el G-CSF también es adecuado para el Am80 (2,5 nM), lo que llevó a los presentes autores a aplicar tal tiempo de exposición al fármaco y tal dosis de fármaco durante el resto del estudio.

Se analizó la diferenciación de los neutrófilos de células CD34+ en las etapas de promielocito, mielocito, metamielocito y neutrófilo en banda hasta la fase de neutrófilo maduro segmentado. Las células CD34+ se trataron con G-CSF o Am80 durante 6 días. El análisis morfológico de los granulocitos mostraba que el desarrollo secuencial de los neutrófilos era inducido suficientemente por el Am80. Por el contrario, el G-CSF inducía más mieloblastos así como promielocitos y mielocitos que neutrófilos en banda y segmentados (Figura 1D). Además, el G-CSF inducía monocitos de forma consistente (aproximadamente un 10 %; Figura 1A, 1D). Estos resultados demuestran que el Am80 es más eficaz que el G-CSF en la inducción de la diferenciación morfológica de los neutrófilos, con una tasa similar de toxicidad celular.

Los AIN son más eficaces que los GIN en cuanto a producir y segregar gránulos.

Durante la diferenciación de los neutrófilos, se producen poblaciones heterogéneas de proteínas granulares de forma secuencial y se almacenan en el citoplasma para una defensa de primera línea frente a diferentes patógenos.^{32,33} Los inventores investigaron si la maduración de neutrófilos potenciada por el Am80 está asociada a un aumento de la producción de gránulos. Los neutrófilos inducidos durante 6 días en células CD34+ por el G-CSF y el Am80 se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes ultraestructurales mostraban que, en el nivel de neutrófilos segmentados, los GIN poseían un número variable de vesículas que contenían con frecuencia material menos denso y amorfo, junto con unos pocos gránulos primarios y secundarios. Por el contrario, las vesículas encontradas en los AIN estaban frecuentemente llenas de material denso o de material amorfo y denso. En comparación con los GIN, los AIN contenían mayor número de gránulos primarios y secundarios, tal como se observa en los PBN. Así pues, estos datos indican diferencias marcadas en la formación de vesículas y la producción de gránulos entre los GIN y los AIN.

Los inventores verificaron si la diferenciación granulocítica inducida por el Am80 estaba asociada efectivamente a una producción suficiente de gránulos, y ensayaron la capacidad de desgranulación de los AIN en respuesta a estímulos bacterianos. Las células CD34+ se trataron con G-CSF o Am80 durante 6 días. Los GIN y AIN resultantes se incubaron después con o sin estímulo de *E. coli* durante 30 min, seguido de la extracción de proteínas de las células lisadas y de los sobrenadantes. Los análisis de WB de la producción y secreción de gránulos mostraban que lactoferrina, un gránulo secundario que tiene una potente actividad antimicrobiana de amplio espectro,^{34,35} se almacenaba en los AIN y se segregaba al medio en cantidades suficientes en respuesta al estímulo bacteriano. Por el contrario, aunque el nivel de lactoferrina aumentaba con el estímulo bacteriano en los GIN, la eficacia de la secreción de lactoferrina por los GIN era mucho menor que la observada con los AIN (Figura 2A). Análogamente, se observó un nivel elevado del gránulo secundario LL-37 en los AIN, y tras el estímulo bacteriano, los gránulos LL-37 eran liberados eficazmente en el medio. Los GIN, por otro lado, mostraban tanto una ausencia de producción como de desgranulación de LL-37 (Figura 2B). Así pues, tanto lactoferrina como el LL-37 eran producidos y segregados eficazmente por los AIN pero no por los GIN.

Incluso en ausencia de *E. coli*, los GIN segregaban MMP-9 (gránulos terciarios) al medio, y esta secreción era inhibida por el estímulo bacteriano (Figura 2C). Por otro lado, si bien la *E. coli* potenciaba la expresión de MMP-9 en los AIN, el estímulo bacteriano no logró inducir a los AIN a segregar MMP-9 (Figura 2C). Estas observaciones indican posibles defectos en la inducción o la desgranulación de MMP-9 (o ambos) en GIN y AIN inducidos *ex vivo*.

Los AIN poseen actividades fagocíticas y bactericidas significativamente más elevadas que los GIN.

Los estudios anteriores muestran que el Am80 es más eficaz que el G-CSF en promocionar tanto la diferenciación morfológica de los granulocitos como la producción/segregación de los gránulos (Figuras 1, 2). Los inventores determinaron si este mayor grado de diferenciación de los neutrófilos inducido por el Am80 se traduce en una mayor inmunidad basada en los neutrófilos frente a una infección bacteriana. Debido a que el Am80 induce más neutrófilos en banda y segmentados que el G-CSF (Figura 1), se ensayó si los neutrófilos en banda y segmentados separados de los GIN y los AIN poseían actividades bactericidas similares. Puesto que los neutrófilos son células CD15+,³⁶ los GIN y los AIN se purificaron usando anticuerpos anti-CD15 conjugados a microesferas magnéticas. Tras la purificación, la proporción de neutrófilos en banda/segmentados en GIN no separados había aumentado de un 21 % a un 63 % en GIN separados, similar a los descubrimientos en AIN separados (Figura 3B). Además, la fracción de monocitos residuales en GIN separados era solo de aproximadamente un 1 % (Figura 3A). Estos GIN y AIN no

separados y separados se ensayaron después para determinar su capacidad para destruir *E. coli* en fase exponencial, junto con PNB recién aislados/purificados que consistían en > 95 % de neutrófilos segmentados (Figura 3B). Cabe destacar que los recuentos de UFC indicaban que solamente se recuperaron unas pocas bacterias viables de los compartimentos celulares de PBN y AIN no separados en comparación con GIN no separados (Figura 3C). Al igual que con los GIN no separados, los GIN separados eran también significativamente menos capaces de destruir bacterias que los AIN separados (Figura 3D). La eliminación potenciada de bacterias en los AIN fue confirmada *in situ* marcando *E. coli* usando anticuerpos anti-OmpA que reconocen específicamente la membrana externa de *E. coli*. Estos resultados indican que los niveles de diferenciación granulocítica procedente de la granulocitopoyesis inducida por el Am80 son esenciales para una inmunidad basada en los neutrófilos eficaz frente a una infección bacteriana. Esta observación es respaldada por los datos de que los GIN con morfología de neutrófilo segmentado presentan todavía un menor nivel de moléculas de tipo gránulo y contienen un mayor número de vesículas amorfas menos densas.

La inmunidad innata frente a infecciones bacterianas se desarrolla durante la diferenciación de los neutrófilos. Para comparar esta función entre los AIN y los GIN, las células CD34+ se trataron con G-CSF o Am80 durante 6 días, seguido de análisis de fagocitosis y destrucción bacteriana. Usando la metodología descrita previamente,^{31,37} los GIN, los AIN y los PBN se incubaron con *E. coli* en fase exponencial a un MOI de 5 durante 15 o 60 min, o usando *E. coli* en ausencia de neutrófilos para controlar el crecimiento bacteriano. Tanto las bacterias extracelulares como las intracelulares viables recuperadas se cuantificaron mediante recuento de las UFC en muestras en las que los neutrófilos estaban expuestos a las bacterias. Los números de bacterias fagocitadas y destruidas se calcularon después mediante sustracción de las bacterias extracelulares solamente o de las bacterias extracelulares e intracelulares, respectivamente, del número de bacterias en la condición de ausencia de neutrófilos. Las bacterias extracelulares se redujeron significativamente tanto en las muestras de PBN como de AIN (Figura 4A, 4B). Los PBN destruían rápidamente las bacterias en 15 min, mientras que a los 60 min sólo quedaban unas pocas bacterias intracelulares viables en las muestras de PBN o en las de AIN (Figura 4C). Por el contrario, los GIN mostraban sustancialmente una destrucción deficiente de bacterias intracelulares a los 60 min de la infección, conservaban un mayor nivel de bacterias extracelulares, y eran deficientes en cuanto a la destrucción bacteriana (Figuras 4A-D). Para confirmar que los AIN poseen mayor actividad bactericida que los GIN, se examinó la destrucción bacteriana *in situ*, usando microscopía confocal tanto de bacterias viables marcadas con tinción fluorescente SYTO9 como de bacterias destruidas marcadas con tinción fluorescente de yoduro de propidio (PI). Los resultados demuestran que se conservaban significativamente más *E. coli* supervivientes en las muestras de GIN, en las que los presentes autores encontraron muchas menos bacterias muertas en contraste con las observaciones en muestras de AIN o PBN. La cuantificación tanto de bacterias extracelulares tras la infección como de bacterias muertas *in situ* confirmó que tanto los AIN como los PBN poseían mayores actividades bactericidas que los GIN (Figura 4E). Asimismo, las imágenes ultraestructurales de la infección de *E. coli* mediante microscopía electrónica mostraban que numerosas bacterias intactas/supervivientes se conservaban en los GIN que contenían vesículas menos densas; mientras que, análogamente a los PBN, se identificaron solamente unas pocas bacterias intactas/supervivientes en los AIN cuyos citoplasmas contenían vesículas densas junto con algunos gránulos de tipo primario y secundario. Teniendo en cuenta todo ello, estos datos sugieren que la diferenciación granulocítica inducida por el Am80 está asociada a una mejora de la inmunidad innata basada en los neutrófilos frente a una infección bacteriana.

Ejemplo 3

El Am80 induce una recuperación de neutrófilos competitiva en comparación con el G-CSF.

Se dividieron aleatoriamente treinta ratones C57BL6/J en seis grupos para los experimentos. El diseño experimental para el análisis de la recuperación de neutrófilos usando diferentes dosis de Am80 y G-CSF se ilustra en la Figura 7A. Se administró una única dosis de inyección intraperitoneal de ciclofosfamida (CPA) de 200 mg/kg el día 0 para inducir la neutropenia. Se administró Am80 o G-CSF o vehículo 4 h después de la inyección de CPA durante 3 días consecutivos. La neutropenia de ratón se indujo 48-60 h después de la inyección de CPA. El experimento se realizó el día 3. Se extrajo sangre periférica (PB) de ratones de control sacrificados el día 3 y los neutrófilos de PB se purificaron usando Ficoll-paque (1,084). La mayoría de los neutrófilos se identificaron en el nivel más bajo del Ficoll paque, tal como refleja el análisis de la morfología de los granulocitos (Figura 7B). El análisis de recuperación de leucocitos (WBC) y neutrófilos en ratones neutropénicos tratados con diferentes dosis de Am80 o G-CSF el día 3 se muestra en la Figura 7C. El Am80 de 5 mg/kg mostraba una recuperación de neutrófilos competitiva en el nivel más bajo del Ficoll paque, en comparación con el G-CSF de 250 µg.

Ejemplo 4

Los neutrófilos movilizados por el Am80 en ratones neutropénicos muestran mayor actividad bactericida que los movilizados por el G-CSF.

Los presentes autores descubrieron que se producía una fuerte reducción tanto de los WBC como de los neutrófilos en todos los ratones experimentales 3 días después de la inyección de CPA, en comparación con los ratones de control (Figura 8A). Rápidamente después de esto, el día 5 con una inyección de G-CSF o Am80 o vehículo durante 2 días consecutivos, el G-CSF indujo una recuperación de neutrófilos notablemente acelerada en comparación con

el Am80, mientras que los recuentos de neutrófilos en el grupo de vehículo también volvieron prácticamente al valor de control (Figura 8A-B). Estos neutrófilos se purificaron a partir de PB de diferentes grupos de ratones (20 ratones en total), tal como presenta una muestra de GIN, y se usaron para analizar actividades bactericidas frente a una infección *in vitro* de *S. aureus*. Los presentes autores descubrieron (Figura 8C) que las bacterias extracelulares fueron eliminadas significativamente por los MPBN, los AIN, o los GIN con respecto a los neutrófilos aislados de C-MPBN tratados con vehículo, mientras que los AIN eran notablemente más eficaces en la eliminación de bacterias que los GIN y los C-MPBN. De forma análoga a los MPBN, los AIN fagocitaron y destruyeron significativamente más bacterias que los GIN o los C-MPBN. Debido a que la recuperación acelerada de neutrófilos cesó el día 7 (Figura 8D), los presentes autores purificaron neutrófilos a partir de PB de diferentes ratones el día 9 (Figura 8E) para comparar sus actividades bactericidas una vez cesada la recuperación acelerada de neutrófilos. Los resultados mostraban que tanto los MPBN como los AIN seguían mostrando una actividad bactericida significativamente mayor que los C-MPBN, mientras que no había diferencia en la fagocitosis o en la destrucción bacteriana entre los GIN y los C-MPBN (Figura 8F). Estos hallazgos demuestran que, análogamente a los MPBN, los neutrófilos movilizados por el Am80 en ratones neutropénicos son significativamente más eficaces frente a una infección de *S. aureus* que los movilizados por el G-CSF, incluso si el G-CSF puede inducir considerablemente más neutrófilos que el Am80 en una etapa temprana de recuperación de los neutrófilos. Asimismo, si bien los recuentos de C-MPBN alcanzaron un nivel significativamente mayor que los valores de control en una etapa posterior de recuperación de los neutrófilos, las actividades bactericidas de los C-MPBN seguían siendo significativamente menores que las de los MPBN o los AIN.

Usando un modelo de ratón neutropénico inducido por una única dosis de CPA, tal como se ha descrito,^{31,32} los inventores ensayaron si los neutrófilos movilizados *in vivo* por el Am80 poseían efectivamente la misma mayor inmunidad basada en los neutrófilos frente a una infección bacteriana en comparación con los movilizados por el G-CSF, tal como se observó en el modelo *ex vivo* (Fig. 8A-F). Se dividieron aleatoriamente veinte ratones C57BL6/J en cuatro grupos para los experimentos *in vivo*. La CPA se administró en una cantidad de 200 mg/kg el día 0. El G-CSF, 250 µg/Kg o el Am80, 5 mg/Kg, se administraron los días 0, 1 y 2. Al cabo de 16 h desde la inoculación intraperitoneal de 3×10^7 *S. aureus* en fase de crecimiento logarítmico, se analizaron los neutrófilos purificados para determinar sus actividades bactericidas mediante determinación del número de bacterias extracelulares viables en la cavidad peritoneal (Figura 8G-i) y PB ((Figura 8G-ii). Se efectuó el recuento de bacterias viables en 3 ml de líquido peritoneal lavado con PBS así como con un estimado de 1,5 ml de plasma sanguíneo total. Valor P de bacterias viables en la cavidad peritoneal: Am80 frente a G-CSF, $P < 2,4E-8$; control frente a G-CSF, $P < 4,7E-9$; vehículo frente a G-CSF, $P < 8,3E-3$; Am80 frente al vehículo, $P < 3,1E-9$; Am80 frente al control, $P < 0,038$. La Figura 8A-iii muestra las bacterias extracelulares viables totales de las Figuras 8G-i y 8G-ii. Am80 frente a G-CSF, $P < 1,9E-6$; control frente a G-CSF, $P < 9,4E-9$; vehículo frente a G-CSF, $P < 6,5E-4$; Am80 frente al vehículo, $P < 6,8E-7$; control frente a Am80, $P < 3,8E-5$. La Figura 8G-iv muestra los cambios en veces de las bacterias viables de la Figura 8G-iii. Las bacterias viables del grupo de control se usan como patrón de 1 vez.

Usando un modelo de ratón neutropénico inducido por una única dosis de CPA, tal como se ha descrito,^{31,32} los inventores ensayaron si los neutrófilos movilizados *in vivo* por el Am80 poseían efectivamente la misma mayor inmunidad basada en los neutrófilos frente a una infección bacteriana en comparación con los movilizados por el G-CSF, tal como se observó en el modelo *in vivo* (Fig. 8A). Los presentes autores descubrieron que se producían una fuerte reducción tanto de los WBC como de los neutrófilos en todos los ratones experimentales 3 días después de la inyección de CPA, en comparación con los ratones de control (Figura 8B). Rápidamente después de esto, el día 5 con una inyección G-CSF o Am80 o vehículo durante 2 días consecutivos, el G-CSF indujo una recuperación de neutrófilos notablemente acelerada en comparación con el Am80, mientras que los recuentos de neutrófilos en el grupo de vehículo también volvían prácticamente al valor de control (Figura 8B-C). Estos neutrófilos se purificaron a partir de PB de diferentes ratones, tal como presenta una muestra de GIN, y se usaron para analizar actividades bactericidas frente a una infección *in vitro* de *S. aureus*. Los presentes autores descubrieron (Figura 8D) que las bacterias extracelulares fueron eliminadas significativamente por los MPBN, los AIN, o los GIN con respecto a los neutrófilos aislados de C-MPBN tratados con vehículo, mientras que los AIN eran notablemente más eficaces en la eliminación de bacterias que los GIN y los C-MPBN. De forma análoga a los MPBN, los AIN fagocitaron y destruyeron significativamente más bacterias que los GIN o los C-MPBN. Debido a que la recuperación acelerada de neutrófilos cesó el día 7 (Figura 8E), los presentes autores purificaron neutrófilos a partir de PB de diferentes ratones el día 9 (Figura 8F) para comparar sus actividades bactericidas una vez cesada la recuperación acelerada de neutrófilos. Los resultados mostraban que tanto los MPBN como los AIN seguían mostrando una actividad bactericida significativamente mayor que los C-MPBN, mientras que no había diferencia en la fagocitosis o en la destrucción bacteriana entre los GIN y los C-MPBN (Figura 8G). Estos hallazgos demuestran que, análogamente a los MPBN, los neutrófilos movilizados por el Am80 en ratones neutropénicos son significativamente más eficaces frente a una infección de *S. aureus* que los movilizados por el G-CSF, incluso si el G-CSF puede inducir considerablemente más neutrófilos que el Am80 en una etapa temprana de recuperación de los neutrófilos. Asimismo, si bien los recuentos de C-MPBN alcanzaron un nivel significativamente mayor que los valores de control en una etapa posterior de recuperación de los neutrófilos, las actividades bactericidas de los C-MPBN seguían siendo significativamente menores que las de los MPBN o los AIN.

Los estudios del presente documento demuestran que los neutrófilos generados *ex vivo* e *in vivo* por el tratamiento con Am80 de células CD34+ no solo exhiben una mayor madurez de diferenciación, sino que también poseen una

mayor eficacia frente a una infección bacteriana que con G-CSF. Esto es posiblemente mediante la coordinación de la interacción funcional del CD66 con el CD18 para promover el desarrollo de la inmunidad innata basada en los neutrófilos procedente de la granulocitopoyesis. La determinación adicional de tal mecanismo de regulación debe proporcionar nuevos elementos de comprensión de la granulocitopoyesis mediada por retinoides y la diferenciación de los neutrófilos. Esto proporcionará, a su vez, una base molecular sólida para diseñar nuevas terapias frente a la neutropenia así como para la generación *ex vivo* de granulocitos para terapias de transfusión a fin de reducir la duración de la neutropenia, usando Am80 como molécula terapéutica rentable.

Referencias

1. Huston A, Lyman GH. "Agents under investigation for the treatment and prevention of neutropenia". *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16:1831-1840.
2. Beekman R, Touw IP. "G-CSF and its receptor in myeloid malignancy". *Blood*. 2010;115:5131-5136.
3. Kuderer NM, Dale DC, Crawford J, Cosler LE, Lyman GH. "Mortality, morbidity, and cost associated with febrile neutropenia in adult cancer patients". *Cancer*. 2006;106:2258-2266.
4. Marti FM, Cullen MH, Roila F. "Management of febrile neutropenia: ESMO clinical recommendations". *Ann Oncol*. 2009;20 Suppl 4:166-169.
5. Dick EP, Prince LR, Sabroe I. "Ex vivo-expanded bone marrow CD34+ derived neutrophils have limited bactericidal ability". *Stem Cells*. 2008;26:2552-2563.
6. Kagechika H. "Novel synthetic retinoids and separation of the pleiotropic retinoidal activities". *Curr Med Chem*. 2002;9:591-608.
7. Miwako I, Kagechika H. "Tamibarotene". *Drugs Today (Barc)*. 2007;43:563-568.
8. Ohnishi K. "PML-RARalpha inhibitors (ATRA, tamibaroten, arsenic trioxide) for acute promyelocytic leukemia". *Int J Clin Oncol*. 2007;12:313-317.
9. Fukasawa H, Iijima T, Kagechika H, Hashimoto Y, Shudo K. "Expression of the ligand-binding domain-containing region of retinoic acid receptors alpha, beta and gamma in *Escherichia coli* and evaluation of ligand-binding selectivity". *Biol Pharm Bull*. 1993;16:343-348.
10. Hashimoto Y, Kagechika H, Shudo K. "Expression of retinoic acid receptor genes and the ligand-binding selectivity of retinoic acid receptors (RAR's)". *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;166:1300-1307.
11. de The H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. "Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes". *Embo J*. 1989;8:429-433.
12. Chambon P. "A decade of molecular biology of retinoic acid receptors". *Faseb J*. 1996;10:940-954.
13. Evans T. "Regulation of hematopoiesis by retinoid signaling". *Exp Hematol*. 2005;33:1055-1061.
14. Douer D, Ramezani L, Parker J, Levine AM. "All-trans-retinoic acid effects the growth, differentiation and apoptosis of normal human myeloid progenitors derived from purified CD34+ bone marrow cells". *Leukemia*. 2000;14:874-881.
15. Wang J, Barsky LW, Shum CH, et al. "Retinoid-induced G1 arrest and differentiation activation are associated with a switch to cyclin-dependent kinase-activating kinase hypophosphorylation of retinoic acid receptor alpha". *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:43369-43376.
16. Wang JG, Barsky LW, Davicioni E, et al. "Retinoic acid induces leukemia cell G1 arrest and transition into differentiation by inhibiting cyclin-dependent kinase-activating kinase binding and phosphorylation of PML/RARalpha". *Faseb J*. 2006;20:2142-2144.
17. Luo P, Wang A, Payne KJ, et al. "Intrinsic retinoic acid receptor alpha-cyclin-dependent kinase-activating kinase signaling involves coordination of the restricted proliferation and granulocytic differentiation of human hematopoietic stem cells". *Stem Cells*. 2007;25:2628-2637.
18. Gudas LJ. "Emerging roles for retinoids in regeneration and differentiation in normal and disease states". *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821:213-221.
19. Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. "Retinoic acid receptors and cancers". *Annu Rev Nutr*. 2004;24:201-221.
20. Melnick A, Licht JD. "Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia". *Blood*. 1999;93:3167-3215.
21. Collins SJ. "Retinoic acid receptors, hematopoiesis and leukemogenesis". *Curr Opin Hematol*. 2008;15:346-351.
22. Cornic M, Delva L, Castaigne S, et al. "In vitro all-trans retinoic acid (ATRA) sensitivity and cellular retinoic acid binding protein (CRABP) levels in relapse leukemic cells after remission induction by ATRA in acute promyelocytic leukemia". *Leukemia*. 1994;8 Suppl 2:S16-19.
23. Degos L, Dombret H, Chomienne C, et al. "All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia". *Blood*. 1995;85:2643-2653.
24. Delva L, Cornic M, Balitrand N, et al. "Resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) therapy in relapsing acute promyelocytic leukemia: study of in vitro ATRA sensitivity and cellular retinoic acid binding protein levels in leukemic cells". *Blood*. 1993;82:2175-2181.
25. Ishida S, Shigemoto-Mogami Y, Shinozaki Y, et al. "Differential modulation of PI3-kinase/Akt pathway during all-trans retinoic acid-and Am80-induced HL60 cell differentiation revealed by DNA microarray analysis". *Biochem Pharmacol*. 2004;68:2177-2186.
26. Jimi S, Mashima K, Matsumoto T, Hara S, Suzumiya J, Tamura K. "RARalpha is a regulatory factor for Am80-induced cell growth inhibition of hematologic malignant cells". *Int J Oncol*. 2007;31:397-404.

27. Hashimoto Y, Kagechika H, Kawachi E, Fukasawa H, Saito G, Shudo K. "Correlation of differentiation-inducing activity of retinoids on human leukemia cell lines HL-60 and NB4". *J Cancer Res Clin Oncol*. 1995;121:696-698.
- 5 28. Tobita T, Takeshita A, Kitamura K, et al. "Treatment with a new synthetic retinoid, Am80, of acute promyelocytic leukemia relapsed from complete remission induced by all-trans retinoic acid". *Blood*. 1997;90:967-973.
29. Chaudhry P, Yang X, Wagner M, Jong AY, Wu L. "Retinoid-regulated FGF8f secretion by osteoblasts bypasses retinoid stimuli to mediate granulocytic differentiation of myeloid leukemia cells". *Mol Cancer Ther*. 2012;11:267-276.
- 10 30. Mittal R, Krishnan S, Gonzalez-Gomez I, Prasadarao NV. "Deciphering the roles of outer membrane protein A extracellular loops in the pathogenesis of Escherichia coli K1 meningitis". *J Biol Chem*. 2011;286:2183-2193.
31. Mittal R, Bulgheresi S, Emami C, Prasadarao NV. "Enterobacter sakazakii targets DC-SIGN to induce immunosuppressive responses in dendritic cells by modulating MAPKs". *J Immunol*. 2009;183:6588-6599.
- 15 32. Hager M, Cowland JB, Borregaard N. "Neutrophil granules in health and disease". *J Intern Med*. 2010;268:25-34.
33. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. "Neutrophil granules a library of innate immunity proteins". *Trends Immunol*. 2007;28:340-345.
34. van der Velden WJ, Blijlevens NM, Donnelly JP. "The potential role of lactoferrin and derivatives in the management of infectious and inflammatory complications of hematology patients receiving a hematopoietic stem cell transplantation". *Transpl Infect Dis*. 2008;10:80-89.
- 20 35. Ward PP, Paz E, Conneely OM. "Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview". *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:2540-2548.
36. Kerr MA, Stocks SC. "The role of CD15-(Le(X))-related carbohydrates in neutrophil adhesion". *Histochem J*. 1992;24:811-826.
- 25 37. Mittal R, Prasadarao NV. "Outer membrane protein A expression in Escherichia coli K1 is required to prevent the maturation of myeloid dendritic cells and the induction of IL-10 and TGF-beta". *J Immunol*. 2008;181:2672-2682.
38. Groves E, Dart AE, Covarelli V, Caron E. "Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells". *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:1957-1976.
- 30 39. Kuespert K, Pils S, Hauck CR. "CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology". *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18:565-571.
- 40 40. Kuijpers TW, van der Schoot CE, Hoogerwerf M, Roos D. "Cross-linking of the carcinoembryonic antigen-like glycoproteins CD66 and CD67 induces neutrophil aggregation". *J Immunol*. 1993;151:4934-4940.
- 35 41. Lo SK, Lee S, Ramos RA, et al. "Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha m beta 2) on human neutrophils". *J Exp Med*. 1991;173:1493-1500.
42. Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP. "CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils". *J Leukoc Biol*. 1996;60:106-117.
- 40 43. Ando K, Muguruma Y, Yahata T. "Humanizing bone marrow in immune-deficient mice". *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;324:77-86.
44. Mayack SR, Wagers AJ. "Osteolineage niche cells initiate hematopoietic stem cell mobilization". *Blood*. 2008;112:519-531.
- 45 45. Kuijpers TW, Hoogerwerf M, van der Laan LJ, et al. "CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells". *J Cell Biol*. 1992;118:457-466.
46. Park DJ, Chumakov AM, Vuong PT, et al. "CCAAT/enhancer binding protein epsilon is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment". *J Clin Invest*. 1999;103: 1399-1408.
47. Bush TS, St Coeur M, Resendes KK, Rosmarin AG. "GA-binding protein (GABP) and Sp1 are required, along with retinoid receptors, to mediate retinoic acid responsiveness of CD18 (beta 2 leukocyte integrin): a novel mechanism of transcriptional regulation in myeloid cells". *Blood*. 2003;101:311-317.
- 50 48. Hickstein DD, Baker DM, Gollahon KA, Back AL. "Identification of the promoter of the myelomonocytic leukocyte integrin CD11b". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:2105-2109.
49. Chih DY, Chumakov AM, Park DJ, Silla AG, Koeffler HP. "Modulation of mRNA expression of a novel human myeloid-selective CCAAT/enhancer binding protein gene (C/EBP epsilon)". *Blood*. 1997;90:2987-2994.
- 55 50. Faurschou M, Borregaard N. "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation". *Microbes Infect*. 2003;5:1317-1327.

Los diversos métodos y técnicas descritos anteriormente proporcionan una serie de modos de realización de la solicitud. Debe entenderse, por supuesto, que no necesariamente se pueden lograr todos los objetivos o ventajas descritos de acuerdo con cualquier realización particular descrita en el presente documento. Así pues, por ejemplo, los expertos en la técnica reconocerán que se pueden llevar a cabo los métodos de forma que se consiga o se optimice una ventaja o grupo de ventajas tal como se ha enseñado en el presente documento sin conseguir necesariamente otros objetivos o ventajas enseñados o sugeridos en el presente documento. Se mencionan en el presente documento una variedad de alternativas. Debe entenderse que algunas realizaciones preferentes incluyen específicamente una, otra o varias características, mientras que otras excluyen específicamente una, otra o varias características, mientras que otras diferencian moderan una característica particular mediante la inclusión de una, otra o varias características ventajosas.

Asimismo, el experto en la materia reconocerá la aplicabilidad de diversas características de las diferentes realizaciones. Análogamente, los diversos elementos, características y etapas discutidas anteriormente, así como otros equivalentes conocidos de cada uno de tales elementos, características o etapas, pueden ser empleados en diversas combinaciones por el experto habitual en la técnica para poner en práctica los métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. Entre los diversos elementos, características y etapas algunos estarán incluidos específicamente y otros estarán excluidos específicamente en diversas realizaciones.

Aunque la solicitud se ha descrito en el contexto de determinadas realizaciones y ejemplos, los expertos en la técnica entenderán que las realizaciones de la solicitud se extienden más allá de las realizaciones específicamente descritas a otras realizaciones y/o usos alternativos y modificaciones y equivalentes de los mismos.

En algunas realizaciones, los términos "un", "uno" y "una", y "el" y "la" y referencias similares usados en el contexto de la descripción de una realización particular de la solicitud (especialmente en el contexto de determinadas reivindicaciones siguientes) se puede interpretar que cubren tanto el singular como el plural. La mención de intervalos de valores en el presente documento pretende servir simplemente como un método abreviado para referirse individualmente a cada uno de los valores separados que están dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en la misma. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario o a menos que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o del lenguaje ilustrativo (por ejemplo "tal como") proporcionado con respecto a determinadas realizaciones en el presente documento pretende simplemente ilustrar mejor la solicitud y no representa una limitación del alcance de la solicitud reivindicada de otro modo. No se debe interpretar ninguna expresión de la memoria descriptiva como indicativa de algún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la solicitud.

En el presente documento se describen realizaciones preferentes de esta solicitud, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la solicitud. Las variaciones de esas realizaciones preferentes serán evidentes para los expertos habituales en la técnica tras la lectura de la descripción anterior. Se contempla que los expertos en la técnica puedan emplear tales variaciones según sea apropiado y que la solicitud se pueda poner en práctica de otro modo que el descrito específicamente en el presente documento. De acuerdo con esto, muchas realizaciones de esta solicitud incluyen todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto enumerada en las reivindicaciones adjuntas, tal como permite la legislación pertinente. Asimismo, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las posibles variaciones de los mismos está incluida en la solicitud, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o a menos que el contexto lo contradiga claramente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un agonista retinoide para su uso en el tratamiento de la neutropenia, la inhibición de la neutropenia, la reducción de la gravedad de la neutropenia, o la promoción de la profilaxis de la neutropenia en un sujeto que lo necesite.
2. Una composición que comprende un agonista retinoide para su uso en un método para tratar la neutropenia inducida por la quimioterapia del cáncer en un sujeto que lo necesite.
- 10 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende adicionalmente el uso de un agente quimioterapéutico.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el agente quimioterapéutico y la composición que comprende un agonista retinoide se administran simultáneamente o secuencialmente.
- 15 5. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el agonista retinoide se administra por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, oral o mediante inhalación.
- 20 6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la cantidad eficaz del agonista retinoide es de aproximadamente 0,1 a 0,5 mg/kg/día, 0,5 a 5 mg/kg/día, 5 a 10 mg/kg/día, 10 a 20 mg/kg/día, 20 a 50 mg/kg/día, 50 a 100 mg/kg/día, 100 a 200 mg/kg/día, 200 a 300 mg/kg/día, 300 a 400 mg/kg/día, 400 a 500 mg/kg/día, 500 a 600 mg/kg/día, 600 a 700 mg/kg/día, 700 a 800 mg/kg/día, 800 a 900 mg/kg/día o 900 a 1000 mg/kg/día.
- 25 7. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el sujeto se selecciona entre el grupo que consiste en humanos, primates no humanos, monos, simios, perros, gatos, vacas, caballos, conejos, ratones y ratas.
- 30 8. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el agonista retinoide es uno cualquiera o más de tamibaroteno (AM80), CH55, ITYA (IT-YA-01115) o una combinación de los mismos.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la cantidad eficaz del agonista retinoide es de aproximadamente 1 a 5 mg/kg/día.
- 35 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la cantidad eficaz del agonista retinoide es de aproximadamente 1 a 10 mg/kg/día.
- 40 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el agonista retinoide se administra por vía oral.

Figura 1

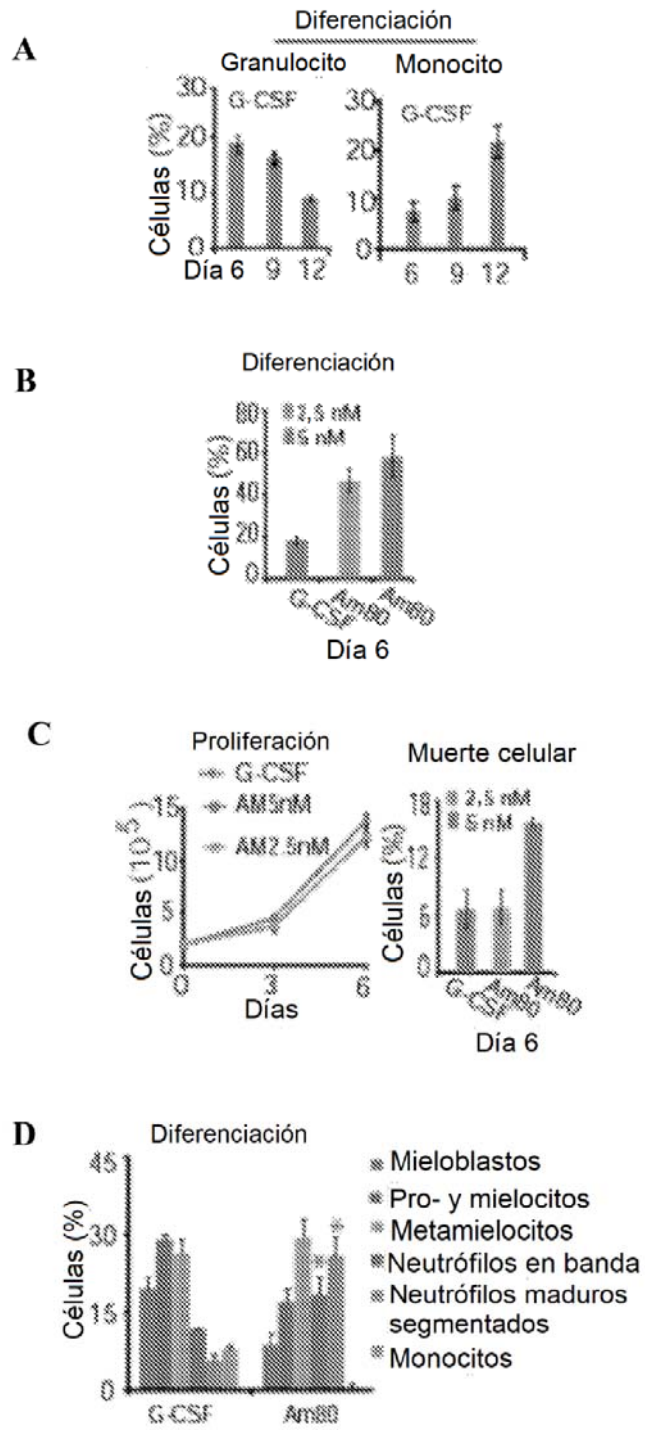


Figura 2

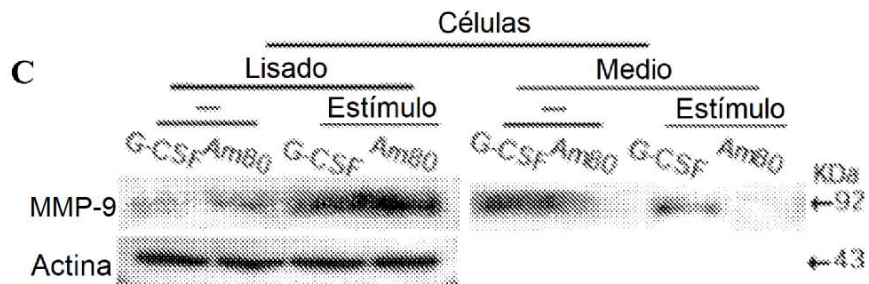
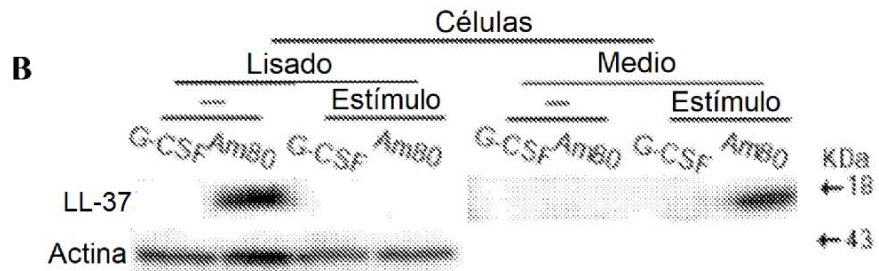
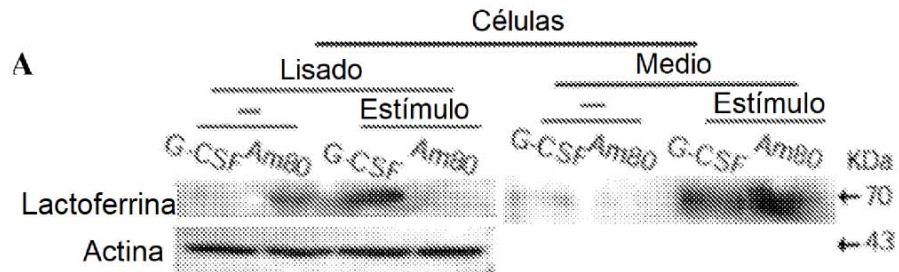


Figura 3

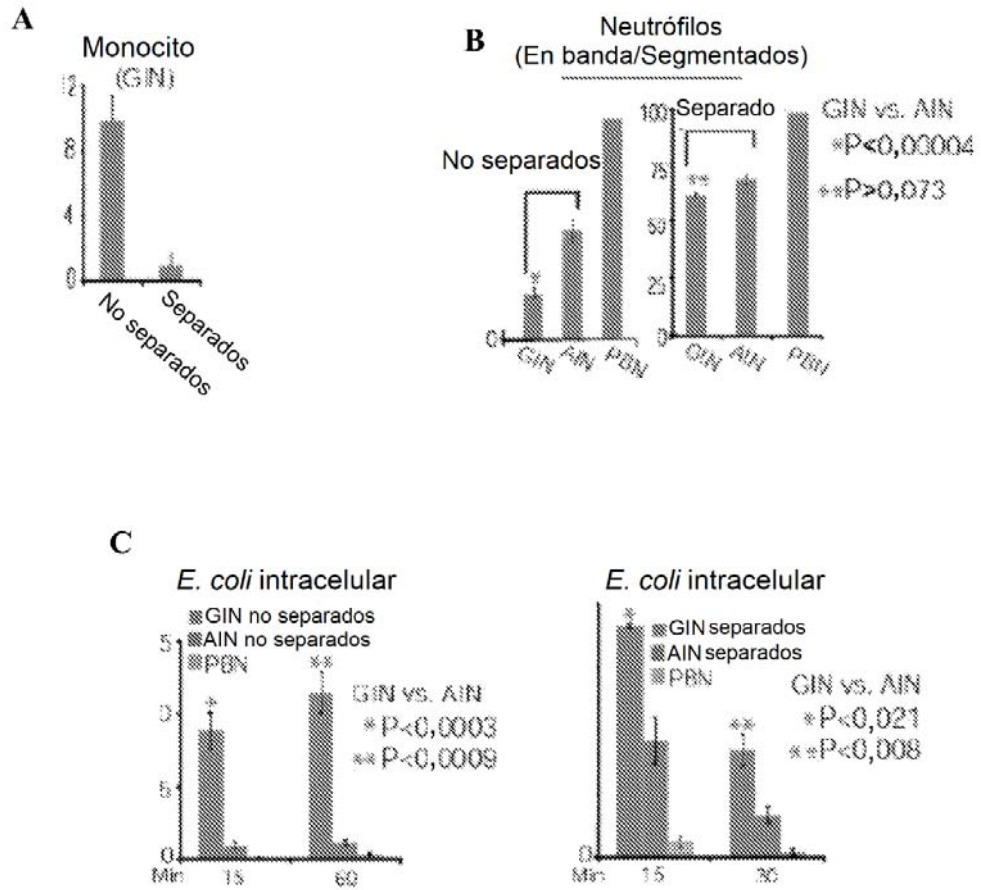


Figura 4

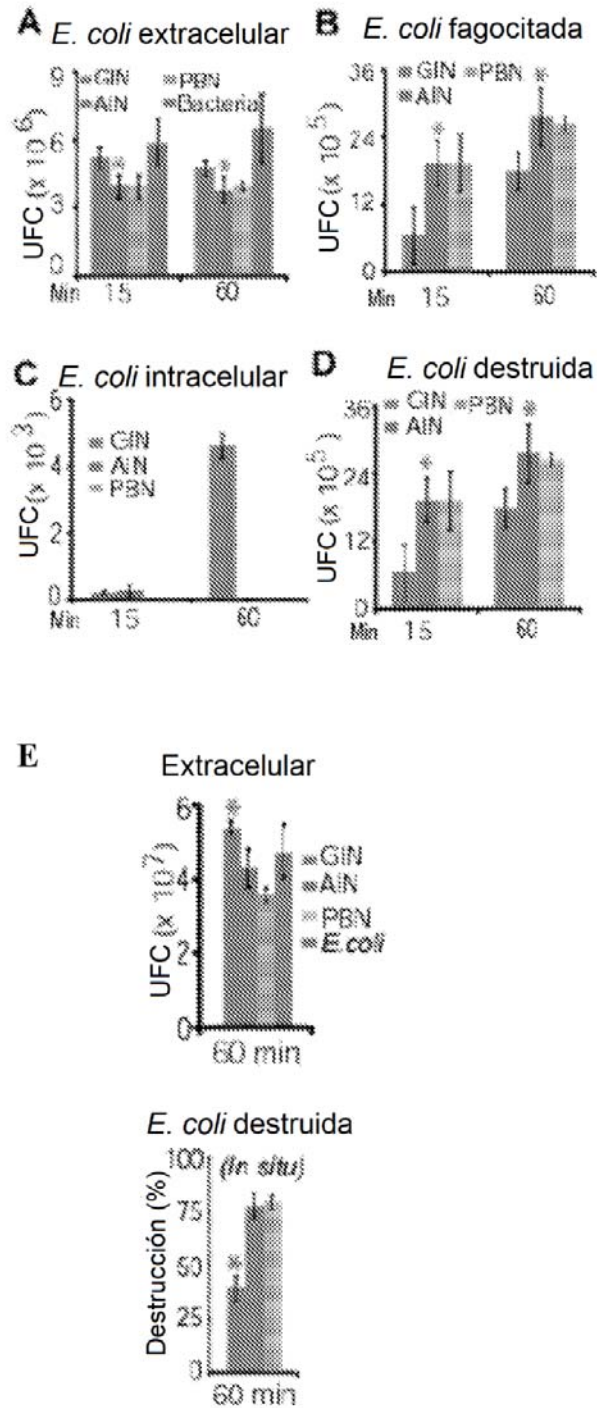


Figura 5

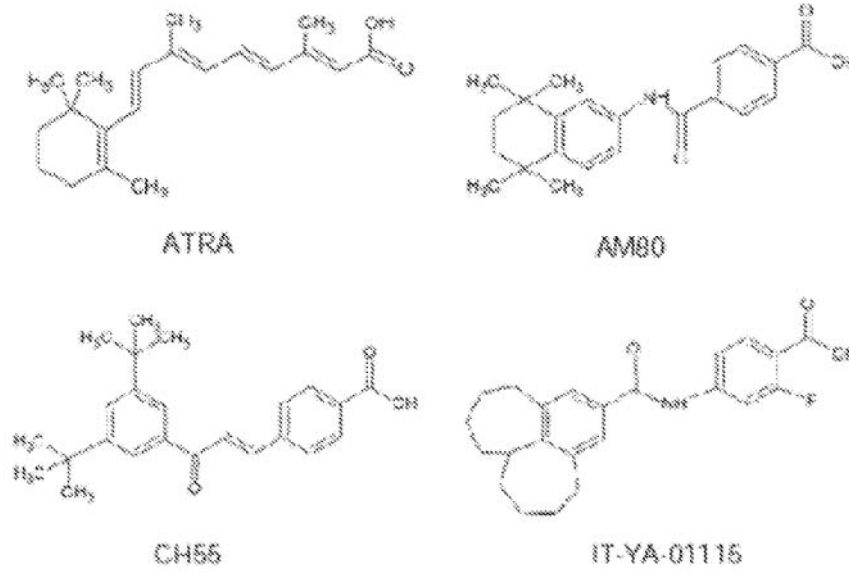


Figura 6

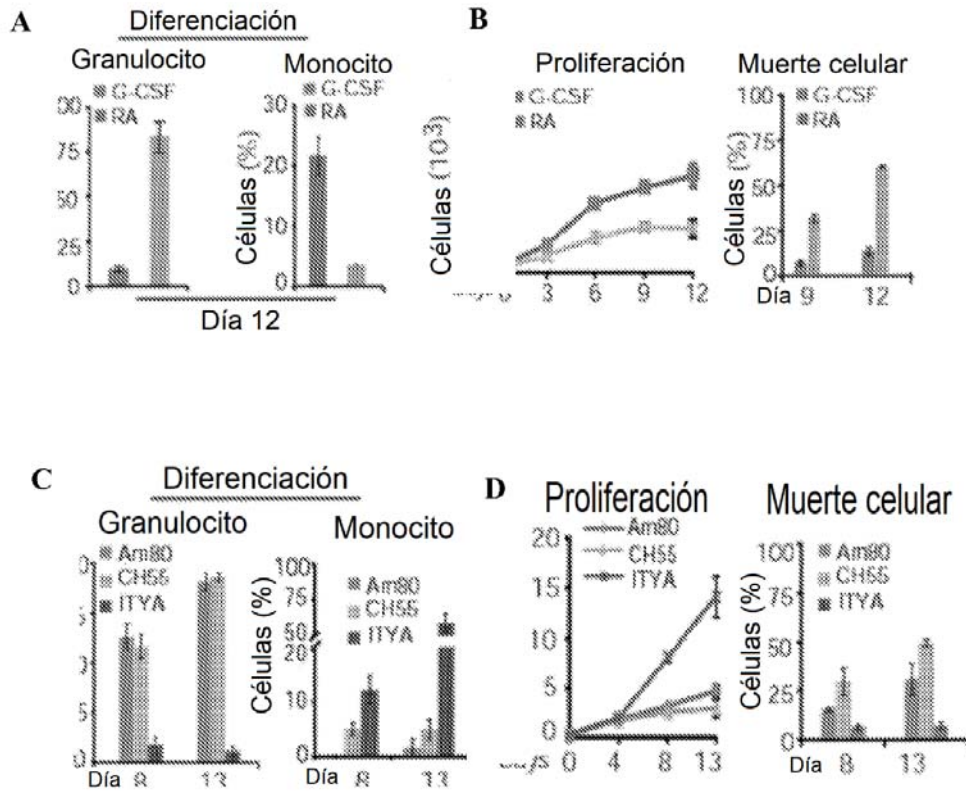


Figura 7

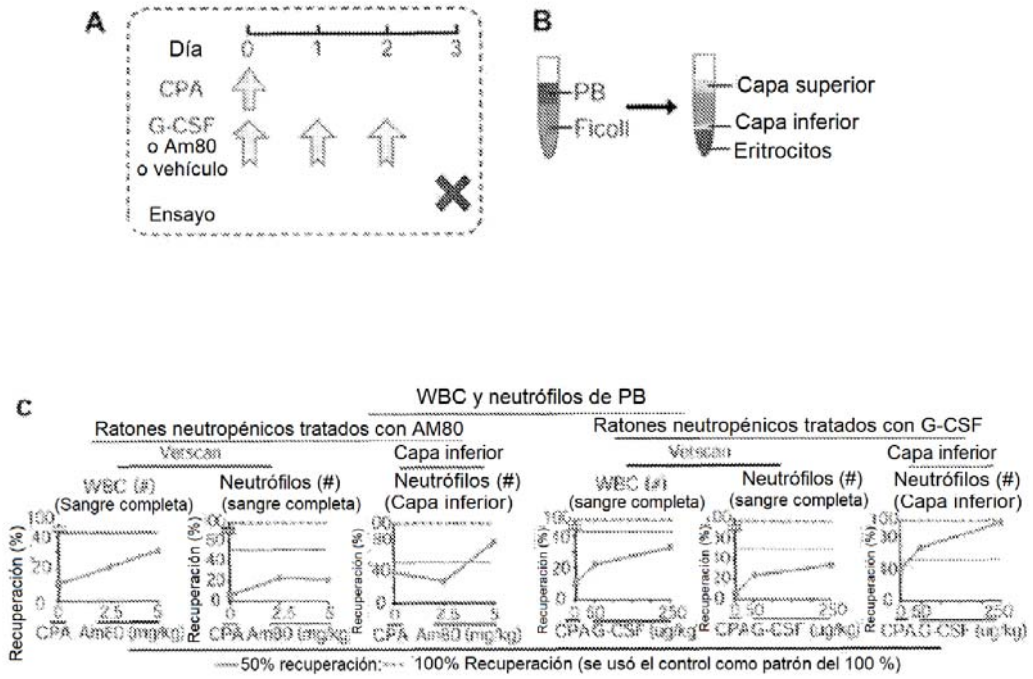
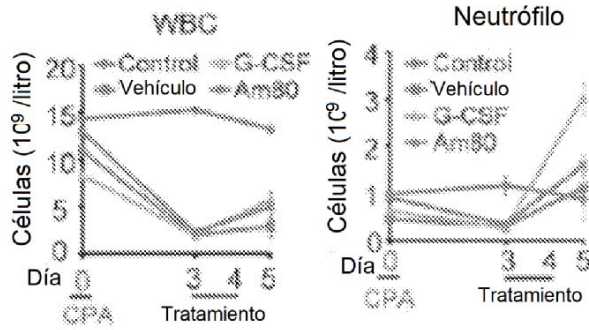
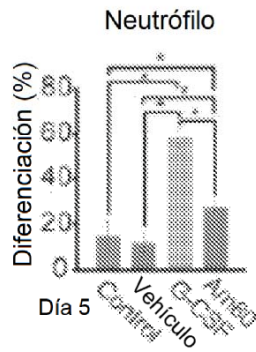


Figura 8

A



B



C

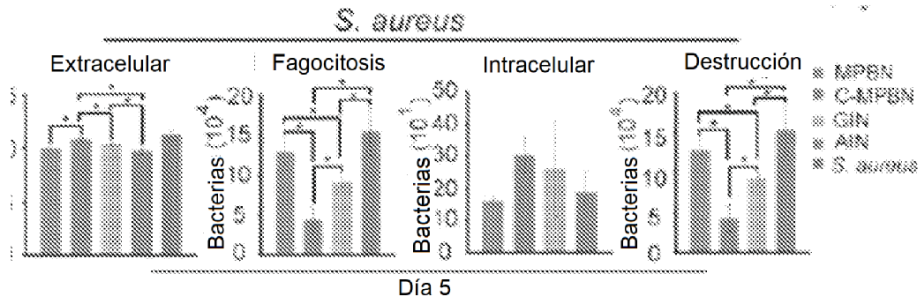


Figura 8

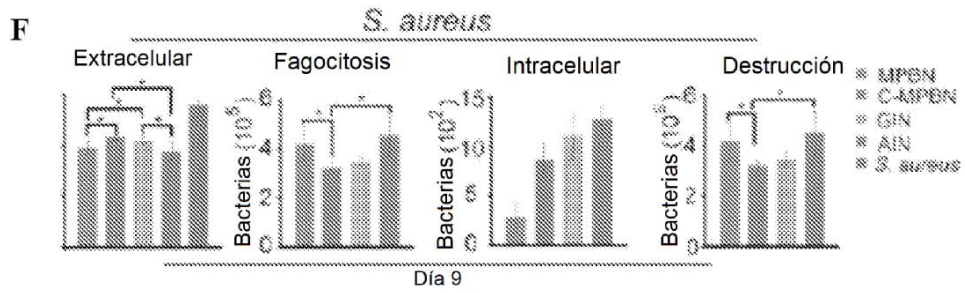
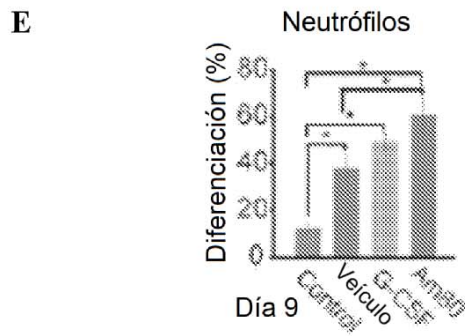
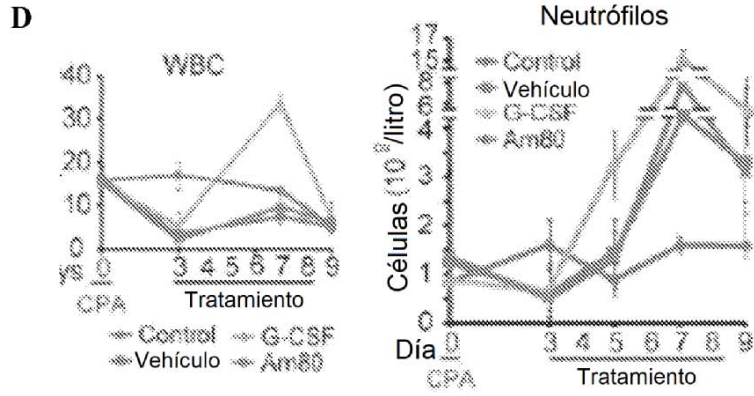


Figura 8

G

