

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 157**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2020** **PCT/EP2020/070244**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2021** **WO21009336**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2020** **E 20740023 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024** **EP 3999097**

54 Título: **Mutante de RAC2 para su uso en la ablación de la hematopoyesis y en el tratamiento de neoplasias malignas hematopoyéticas**

30 Prioridad:

18.07.2019 EP 19305948

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.10.2024

73 Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.0%)
101 rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
FONDATION IMAGINE (20.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (APHP) (20.0%);
UNIVERSITÉ PARIS CITÉ (20.0%) y
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (20.0%)

72 Inventor/es:

LAGRESLE-PEYROU, CHANTAL;
OLICHON, AURÉLIEN;
SADEK-ROCK, HANEM;
ANDRE, ISABELLE y
CAVAZZANA, MARINA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 982 157 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

Mutante de RAC2 para su uso en la ablación de la hematopoyesis y en el tratamiento de neoplasias malignas hematopoyéticas

Campo

La presente divulgación se encuentra en el campo de la hematología.

Antecedentes

El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) es un enfoque terapéutico potencialmente curativo para una variedad de enfermedades hematopoyéticas malignas y no malignas. Cuando se realiza HSCT en pacientes con trastornos malignos, se administran regímenes de preparación o acondicionamiento como parte del procedimiento para conseguir 3 objetivos: hacer espacio en la médula ósea (mieloablación), proporcionar inmunoblación suficiente para prevenir el rechazo del injerto y reducir la carga tumoral. La intensidad de los regímenes de acondicionamiento puede variar sustancialmente, y cuando se selecciona el régimen de acondicionamiento óptimo para cualquier paciente dado, deben considerarse factores relacionados con la enfermedad tales como el diagnóstico y el estado de remisión, así como factores relacionados con el paciente incluyendo la edad, la disponibilidad de donantes y la presencia de afecciones comórbidas. Aunque no se ha alcanzado un consenso completo dentro de la comunidad de HCT, los regímenes de acondicionamiento se han clasificado como de dosis alta (mieloablativos), de intensidad reducida y no mieloablativos. Por ejemplo, se espera que los regímenes mieloablativos o de "dosis alta", que consisten en agentes alquilantes (individuales o múltiples) con o sin irradiación corporal total, realicen la ablación de la hematopoyesis, no permitiendo la recuperación hematológica autóloga. La administración de regímenes de acondicionamiento está asociada con toxicidades inmediatas y retardadas. Por ejemplo, las náuseas, los vómitos, la parotiditis aguda transitoria, la xerostomía, la mucositis y la diarrea son complicaciones agudas comúnmente observadas. También pueden observarse neumonitis intersticial, fibrosis pulmonar idiopática y función pulmonar del pulmón reducida. La aparición del síndrome de obstrucción sinusoidal (también conocido como enfermedad venooclusiva del hígado) es más común en los regímenes basados en quimioterapia. Los efectos secundarios a largo plazo incluyen infertilidad, formación de cataratas, hipotiroidismo y tiroiditis y neoplasias malignas secundarias. Por consiguiente, existe la necesidad de un nuevo método que permita la ablación completa de la hematopoyesis con una mínima aparición de efectos secundarios adversos graves a corto y largo plazo.

RAC2 pertenece a la subfamilia Rac de la familia Rho de pequeñas GTPasas. En el estado inactivo unido a GDP, RAC2 se localiza en el citosol. Tras la estimulación y activación por factores de intercambio de nucleótidos de guanina, la forma activa unida a GTP de RAC2 se dispone por translocación en la membrana plasmática. Allí, RAC2 desencadena diversas rutas de señalización hasta que el GTP se hidroliza o la GTPasa se degrada por la célula ⁷⁻⁹. A diferencia de los otros miembros de la subfamilia Rac (RAC1 y RAC3), la expresión de RAC2 está restringida al linaje hematopoyético ^{10,11}.

Sumario de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a:

- una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso en un método de ablación completa de la hematopoyesis en un paciente que lo necesita, y

- una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso en un método de tratamiento de una neoplasia maligna de células hematopoyéticas en un paciente que lo necesita.

La descripción detallada, las figuras y el ejemplo siguientes no se encuentran dentro del alcance de la presente invención y se presentan únicamente con fines de comprensión e ilustración.

Además, cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, a las composiciones farmacéuticas y a los medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.

Descripción detallada

Los inventores han identificado una mutación de sentido erróneo autosómica dominante (AD) en el gen *RAC2* (que codifica para sustrato 2 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras (RAC2)) en tres pacientes con

inmunodeficiencias combinadas graves (SCID) cuya presentación clínica se solapa con la forma SCID RD pero que no presentan mutaciones de AK2 e hipoacusia. Usando ensayos de diferenciación *in vitro* y bioquímicos, los inventores demostraron que la mutación de RAC2 estaba estrechamente relacionada con una alteración en la capacidad de diferenciación celular y defectos en las redes celulares y mitocondriales. En conjunto, los datos demuestran que una mutación de ganancia de función (GOF) dominante en el sitio de unión a GDP/GTP de la proteína RAC2 inhibe la diferenciación de HSPC y conduce a una forma AD grave de SCID con una presentación clínica de RD. Por consiguiente, los resultados llevan a considerar que la introducción de la muteína de RAC2 identificada en el linaje hematopoyético sería adecuada para inducir la ablación completa de la hematopoyesis.

El primer objeto de la presente divulgación se refiere a un método de ablación completa de la hematopoyesis en un paciente que lo necesita que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R).

Un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de una neoplasia maligna de células hematopoyéticas en un paciente que lo necesita que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R).

Tal como se usa en el presente documento, el término "célula hematopoyética" tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier tipo de célula del sistema hematopoyético, incluyendo, pero sin limitarse a, células no diferenciadas, tales como células madre hematopoyéticas y células progenitoras, y células diferenciadas, por ejemplo, leucocitos (por ejemplo, granulocitos, monocitos y linfocitos), plaquetas y glóbulos rojos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "célula madre hematopoyética" o "HSC" se refiere a células sanguíneas que tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en precursores de células sanguíneas maduras circulantes. Estas células precursores son células sanguíneas inmaduras que no pueden autorrenovarse ni diferenciarse en células sanguíneas maduras circulantes. Dentro del microentorno de la médula ósea, las células madre se autorrenuevan y mantienen la producción continua de células hematopoyéticas que dan lugar a todas las células sanguíneas maduras a lo largo de toda la vida. En particular, las células progenitoras hematopoyéticas o células madre hematopoyéticas se aíslan de células sanguíneas periféricas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "hematopoyesis" se refiere a la formación y al desarrollo de células hematopoyéticas que implican la proliferación y/o la diferenciación a partir de células madre.

Normalmente, el paciente se selecciona del grupo que consiste en niños, adultos jóvenes, adultos de mediana edad y adultos de edad avanzada.

En particular, el método dado a conocer en el presente documento es particularmente adecuado para preparar al paciente para un trasplante de médula ósea (es decir, tratamiento de acondicionamiento). Por tanto, el método dado a conocer en el presente documento es particularmente adecuado para evitar el uso de quimioterapia y radioterapia. El método dado a conocer en el presente documento ayudará a la médula ósea para que crezcan nuevas células madre sanguíneas, ayuda a impedir que el cuerpo del paciente rechace las células trasplantadas y ayuda a destruir cualquier célula cancerosa que pueda estar presente en el cuerpo. Normalmente, la administración del polinucleótido se realiza antes del trasplante de médula ósea.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "trasplante de médula ósea" o "trasplante de células madre hematopoyéticas" usados en el presente documento deben considerarse intercambiables, en referencia al trasplante de células madre hematopoyéticas en alguna forma a un receptor. No es necesario que las células madre hematopoyéticas deriven de la médula ósea, sino que también pueden derivar de otras fuentes tales como sangre de cordón umbilical o PBMC movilizadas. Tal como se usa en el presente documento, los términos "trasplante de células madre hematopoyéticas" o "HSCT" se refieren a un componente del tratamiento de una amplia gama de trastornos hematológicos. Generalmente, hay dos tipos de HSCT: trasplante autólogo y alogénico. Tal como se usa en el presente documento, el término "alogénico" se refiere a que deriva de, se origina en o es miembro de la misma especie, donde los miembros están genéticamente relacionados o genéticamente no relacionados, pero son genéticamente similares. Un "trasplante alogénico" se refiere a la transferencia de células u órganos de un donante a un receptor, donde el receptor es de la misma especie que el donante. El trasplante alogénico implica la infusión de células madre del donante, normalmente usando un donante que coincide con el MHC del receptor. Tal como se usa en el presente documento, el término "autólogo" se refiere a que deriva de o se origina en el mismo paciente. Un "trasplante autólogo" se refiere a la recogida y al trasplante de las propias células o los propios órganos del paciente.

Los ejemplos de neoplasias malignas de células hematopoyéticas que son cánceres incluyen leucemias, linfomas y mielomas múltiples. Los ejemplos de leucemias incluyen leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia mielógena crónica (LMC). Los ejemplos de linfomas incluyen enfermedad de

Hodgkin y sus subtipos; linfomas no Hodgkin y sus subtipos, incluyendo leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP), linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), leucemia de células pilosas (LCP), linfoma de la zona marginal (LZM), linfoma de Burkitt (LB), trastorno linfoproliferativo postrasplante (TPPT), leucemia prolinfocítica de células T (LPL-T), leucemia prolinfocítica de células B (LPL-B), macroglobulinemia de Waldenström/linfoma linfoplasmocitario y otros linfomas de linfocitos citolíticos naturales (células NK) o de células T. Los ejemplos de otras afecciones malignas que son neoplasias malignas de células hematopoyéticas incluyen síndrome mielodisplásico (SMD); enfermedades mieloproliferativas tales como policitemia vera (es decir, PV, PCV o policitemia rubra vera (PRV)), trombocitosis esencial (TE), mielofibrosis; y enfermedades con características tanto de síndromes mielodisplásicos como de enfermedades mieloproliferativas tales como leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), leucemia mieloide crónica atípica (LMCa) y enfermedad mielodisplásica/mieloproliferativa.

En particular, la neoplasia maligna de células hematopoyéticas de leucemia mielógena aguda (LMA) se ve afectada por la mutación descrita en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” o “tratar” se refiere a tratamiento tanto profiláctico como preventivo, así como a tratamiento curativo o modificador de la enfermedad, incluyendo tratamiento de un paciente en riesgo de contraer la enfermedad o que se sospecha que ha contraído la enfermedad, así como pacientes que están enfermos o se ha diagnosticado que padecen una enfermedad o afección médica, e incluye la supresión de la recidiva clínica. El tratamiento puede administrarse a un paciente que padece un trastorno médico o que en última instancia puede adquirir el trastorno, con el fin de prevenir, curar, retrasar la aparición de, reducir la gravedad de o mejorar uno o más síntomas de un trastorno o trastorno recurrente o con el fin de prolongar la supervivencia de un paciente más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento. Por “régimen terapéutico” se entiende el patrón de tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, el patrón de dosificación usado durante la terapia. Un régimen terapéutico puede incluir un régimen de inducción y un régimen de mantenimiento. La expresión “régimen de inducción” o “periodo de inducción” se refiere a un régimen terapéutico (o a la porción de un régimen terapéutico) que se usa para el tratamiento inicial de una enfermedad. El objetivo general de un régimen de inducción es proporcionar un alto nivel de fármaco a un paciente durante el periodo inicial de un régimen de tratamiento. Un régimen de inducción puede emplear (en parte o en su totalidad) un “régimen de carga”, que puede incluir administrar una dosis del fármaco mayor de la que emplearía un médico durante un régimen de mantenimiento, administrar un fármaco con más frecuencia que con la que un médico administraría el fármaco durante un régimen de mantenimiento, o ambos. La expresión “régimen de mantenimiento” o “periodo de mantenimiento” se refiere a un régimen terapéutico (o a la porción de un régimen terapéutico) que se usa para el mantenimiento de un paciente durante el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, para mantener al paciente en remisión durante largos periodos de tiempo (meses o años). Un régimen de mantenimiento puede emplear terapia continua (por ejemplo, administrar un fármaco a intervalos regulares, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, anualmente, etc.) o terapia intermitente (por ejemplo, tratamiento interrumpido, tratamiento intermitente, tratamiento en la recidiva o tratamiento tras el logro de un criterio predeterminado particular [por ejemplo, manifestación de la enfermedad, etc.]).

Tal como se usa en el presente documento, el término “Rac2” tiene su significado general en la técnica y se refiere a sustrato 2 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras. Una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo para Rac2 humana se representa por SEQ ID NO:1.

```
SEQ ID NO:1 >sp|P15153|Rac2_HUMANA Sustrato 2 de toxina botulínica
C3 relacionada con Ras OS=Homo sapiens OX=9606 GN=Rac2 PE=1 SV=1
MQAIKCVVVGDAVAGKTCLLISYTTNAFGEYIPTVFDNYSANVMVDSKPVNLGLWDTAG
QEDYDRLRLPSYPQTDVFLICFSLVSPASYENVRAKWFPEVRHHCPSTPIILVGTKLDLR
DDKDTIEKLKEKKLAPITYPQGLALAKEIDSVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAVLCPQ
PTRQQKRACSL
```

Tal como se usa en el presente documento, el término “mutación” tiene su significado general en la técnica y se refiere a una sustitución, delección o inserción. El término “sustitución” significa que se elimina un residuo de aminoácido específico en una posición específica y se inserta otro residuo de aminoácido en la misma posición. El término “delección” significa que se elimina un residuo de aminoácido específico. El término “inserción” significa que se insertan uno o más residuos de aminoácido antes o después de un residuo de aminoácido específico, más específicamente, ese uno o más, preferiblemente uno o varios, residuos de aminoácido se unen a un grupo a-carboxilo o un grupo a-amino del residuo de aminoácido específico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” tiene su significado general en la técnica y se refiere a un polímero de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede comprender aminoácidos modificados. El término también abarca un polímero de aminoácidos que se ha modificado de manera natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. Dentro de la

definición también se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales tales como homocisteína, ornitina, p-acetilfenilalanina, D-aminoácidos y creatina), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" tal como se usa en el presente documento se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, incluyendo ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de los mismos o mezclas de los mismos. Este término se refiere a la estructura primaria de la molécula. Por tanto, el término incluye ácido desoxirribonucleico ("ADN") monocatenario, bicatenario y tricatenario, así como ácido ribonucleico ("ARN") monocatenario, bicatenario y tricatenario. También incluye formas modificadas, por ejemplo, mediante alquilación y/o mediante remate de extremos, y formas no modificadas del polinucleótido. Más particularmente, el término "polinucleótido" incluye polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribose), polirribonucleótidos (que contienen D-ribose), incluyendo ARNt, ARNr, ARNh, ARNip y ARNm, ya sean sometidos a corte y empalme o no sometidos a corte y empalme, cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glicósido o C-glicósido de una base de purina o pirimidina y otros polímeros que contienen estructuras principales normonucleotídicas, por ejemplo, poliamida (por ejemplo, ácidos peptidonucleicos "APN") y polímeros de polimorfolino, y otros polímeros de ácido nucleico específicos de secuencia sintéticos siempre que los polímeros contengan bases nitrogenadas en una configuración que permite el apareamiento de bases y el apilamiento de bases, tal como se encuentra en ADN y ARN. En particular, el polinucleótido comprende un ARNm. En otro aspecto, el ARNm es un ARNm sintético. En particular, el ARNm sintético comprende al menos una base nitrogenada no natural. En particular, todas las bases nitrogenadas de una determinada clase se han reemplazado por bases nitrogenadas no naturales (por ejemplo, todas las uridinas en un polinucleótido dado a conocer en el presente documento pueden reemplazarse por una base nitrogenada no natural, por ejemplo, 5-metoxiuridina). En particular, el polinucleótido (por ejemplo, un ARN sintético o un ADN sintético) comprende sólo bases nitrogenadas naturales, es decir, A, C, T y G en el caso de un ADN sintético o A, C, T y U en el caso de un ARN sintético.

En particular, el polinucleótido dado a conocer en el presente documento es un ARN mensajero (ARNm).

En particular, el polinucleótido se inserta en un vector, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral. Normalmente, el vector es vector viral que es un virus adenoasociado (VAA), un retrovirus, virus del papiloma bovino, un vector adenoviral, un vector lentiviral, un virus de la variolovacuna, un poliomavirus o un virus infeccioso. Normalmente, el vector dado a conocer en el presente documento incluye "secuencias de control", que se refiere colectivamente a secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en el sentido 5', orígenes de replicación, sitios internos de entrada al ribosoma ("IRES"), potenciadores, y similares, que colectivamente proporcionan la replicación, la transcripción y la traducción de una secuencia codificante en una célula del receptor. No siempre es necesario que todas estas secuencias de control estén presentes, siempre que la secuencia codificante seleccionada pueda replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada. Otra secuencia de ácido nucleico es una secuencia "promotora", que se usa en el presente documento en su sentido habitual para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, en la que la secuencia reguladora se deriva de un gen que puede unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (en el sentido de 3'). Los promotores de la transcripción pueden incluir "promotores inducibles" (donde la expresión de una secuencia de polinucleótido unida operativamente al promotor se induce mediante un analito, un cofactor, una proteína reguladora, etc.), "promotores reprimibles" (donde la expresión de una secuencia de polinucleótido unida operativamente al promotor se induce por un analito, un cofactor, una proteína reguladora, etc.) y "promotores constitutivos".

En particular, el polinucleótido dado a conocer en el presente documento puede conjugarse con al menos otra molécula. Normalmente, dicha molécula se selecciona del grupo que consiste en polinucleótidos, polipéptidos, lípidos, lectinas, hidratos de carbono, vitaminas, cofactores y fármacos. En particular, el polipéptido o el polinucleótido dado a conocer en el presente documento se conjuga con una molécula que tiene una afinidad específica por células hematopoyéticas, tal como anticuerpos o péptidos que tienen una afinidad de unión por una proteína expresada en la superficie de una célula madre hematopoyética. La conjugación puede dar como resultado una mayor estabilidad y/o semivida y puede ser particularmente útil para dirigir el polipéptido o los polinucleótidos a las células hematopoyéticas.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del principio activo para tratar o reducir los síntomas a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y las composiciones dados a conocer en el presente documento lo decidirá el médico responsable dentro del alcance del juicio médico razonable. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo el trastorno que esté tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el momento de la administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación con los principios activos; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, se encuentra dentro de la experiencia en la

técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variarse a lo largo de un amplio intervalo desde 0,01 hasta 1.000 mg por adulto al día. Normalmente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación del sujeto que va a tratarse. Un medicamento contiene normalmente desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 500 mg del principio activo, normalmente desde 1 mg hasta aproximadamente 100 mg del principio activo. Habitualmente se administra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de desde 0,0002 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 7 mg/kg de peso corporal al día.

Normalmente, el principio activo dado a conocer en el presente documento (es decir, el polinucleótido) se combina con excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas. El término "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y a composiciones que no producen ninguna reacción adversa, alérgica o no deseada cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, un diluyente, un material de encapsulación o un agente auxiliar de formulación de cualquier tipo sólido, semisólido o líquido y no tóxico.

En particular, el polinucleótido dado a conocer en el presente documento se formula con lipídoides. La síntesis de lipídoides se ha descrito extensamente (véanse Mahon *et al.*, Bioconjug Chem. 2010 21:1448-1454; Schroeder *et al.*, J Intern Med. 2010 267:9-21; Akinc *et al.*, Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Love *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2010 107:1864-1869; Siegwart *et al.*, Proc Natl Acad Sci US A. 2011 108:12996-3001). Aunque estos lipídoides se han usado para administrar eficazmente moléculas de ARN de interferencia pequeño bicatenario en roedores y primates no humanos (véanse Akinc *et al.*, Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Frank-Kamenetsky *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2008 105:11915-11920; Akinc *et al.*, Mol Ther. 2009 17:872-879; Love *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2010 107:1864-1869; Leuschner *et al.*, Nat Biotechnol. 2011 29:1005-1010), la presente divulgación describe su formulación y uso para administrar polinucleótidos.

En particular, el polinucleótido dado a conocer en el presente documento se formula usando uno o más liposomas, lipoplejos o nanopartículas lipídicas.

Los liposomas son vesículas preparadas artificialmente que pueden estar compuestas principalmente por una bicapa lipídica y pueden usarse como vehículo de administración para la administración de formulaciones farmacéuticas. Los liposomas pueden ser de diferentes tamaños tales como, pero sin limitarse a, una vesícula multilaminar (MLV) que puede tener un diámetro de cientos de nanómetros y puede contener una serie de bicapas concéntricas separadas por compartimentos acuosos estrechos, una vesícula unicelular pequeña (SUV) que puede tener un diámetro inferior a 50 nm y una vesícula unilaminar grande (LUV) que puede tener un diámetro entre 50 y 500 nm. El diseño de liposomas puede incluir, pero no se limita a, opsoninas o ligandos con el fin de mejorar la unión de los liposomas a tejido enfermo o para activar eventos tales como, pero sin limitarse a, la endocitosis. Los liposomas pueden contener un pH bajo o alto con el fin de mejorar la administración de las formulaciones farmacéuticas. Como un ejemplo no limitativo, los liposomas tales como las vesículas de membrana sintéticas se preparan mediante los métodos, el aparato y los dispositivos descritos en las publicaciones de patente estadounidense n.ºs US20130177638, US20130177637, US20130177636, US20130177635, US20130177634, US20130177633, US20130183375, US20130183373 y US20130183372. En particular, los liposomas se forman a partir de liposomas de 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), liposomas de DiLa2 de Marina Biotech (Bothell, Wash.), 1,2-dilinoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-DMA), 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA) y MC3 (tal como se describe en el documento US20100324120) y liposomas que pueden administrar fármacos de molécula pequeña tales como, pero sin limitarse a, DOXIL[®] de Janssen Biotech, Inc. (Horsham, Pa.). El polipéptido del polinucleótido dado a conocer en el presente documento puede estar encapsulado por el liposoma y/o puede estar contenido en un núcleo acuoso que puede estar encapsulado entonces por el liposoma (véanse las publicaciones internacionales n.ºs WO2012031046, WO2012031043, WO2012030901 y WO2012006378 y las publicaciones de patente estadounidense n.ºs US20130189351, US20130195969 y US20130202684).

En particular, el polinucleótido dado a conocer en el presente documento se formula con partículas de plásmido-lípido estabilizadas (SPLP) o partículas de ácido nucleico-lípido estabilizadas (SNALP) que se han descrito previamente y se ha demostrado que son adecuadas para la administración de oligonucleótidos *in vitro* e *in vivo* (véanse Wheeler *et al.* Gene Therapy. 1999 6:271-281; Zhang *et al.* Gene Therapy. 1999 6:1438-1447; Jeffs *et al.* Pharm Res. 2005 22:362-372; Morrissey *et al.*, Nat Biotechnol. 2005 2:1002-1007; Zimmermann *et al.*, Nature. 2006 441:111-114; Heyes *et al.* J Contr Rel. 2005 107:276-287; Semple *et al.* Nature Biotech. 2010 28:172-176; Judge *et al.* J Clin Invest. 2009 119:661-673; De Fougères Hum Gene Ther. 2008 19:125-132; publicación de patente estadounidense n.º US20130122104). El método de fabricación original de Wheeler *et al.* era un método de diálisis con detergente, que más adelante fue mejorado por Jeffs *et al.* y se denomina método de formación espontánea de vesículas. Las formulaciones de liposomas están compuestas por de 3 a 4 componentes lipídicos

además del polinucleótido. Como un ejemplo, un liposoma puede contener, pero no se limita a, el 55 % de colesterol, el 20 % de diesteroilfosfatidilcolina (DSPC), el 10 % de PEG-S-DSG y el 15 % de 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), tal como describen Jeffs *et al.* Como otro ejemplo, determinadas formulaciones de liposomas contienen, pero no se limitan a, el 48 % de colesterol, el 20 % de DSPC, el 2 % de PEG-c-DMA y el 30 % de lípido catiónico, donde el lípido catiónico puede ser 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetilaminopropano (DSDMA), DODMA, DLin-DMA o 1,2-dilineniloxi-3-dimetilaminopropano (DLenDMA), tal como describen Heyes *et al.*

En particular, el polinucleótido dado a conocer en el presente documento se formula en una nanopartícula lipídica tal como las descritas en la publicación internacional n.º WO2012170930. Las formulaciones de nanopartículas lipídicas comprenden normalmente un lípido, en particular, un lípido catiónico ionizable, y comprenden además un lípido neutro, un esteroide y una molécula que puede reducir la agregación de partículas, por ejemplo, un PEG o un lípido modificado con PEG. El lípido puede seleccionarse de, pero no se limita a, DLin-DMA, DLin-K-DMA, 98N12-5, C12-200, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA, DODMA, PLGA, PEG, PEG-DMG, lípidos pegilados y lípidos de aminoalcohol. En particular, el lípido es un lípido catiónico tal como, pero sin limitarse a, DLin-DMA, DLin-D-DMA, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA, DODMA y lípidos de aminoalcohol. El lípido catiónico de aminoalcohol puede ser los lípidos descritos en y/o preparados mediante los métodos descritos en la publicación de patente estadounidense n.º US20130150625. Como un ejemplo no limitativo, el lípido catiónico puede ser 2-amino-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-2-[(9Z,2Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]metil}propan-1-ol (compuesto 1 en el documento US20130150625); 2-amino-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]-2-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]metil}propan-1-ol (compuesto 2 en el documento US20130150625); 2-amino-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-2-[(octiloxi)metil}propan-1-ol (compuesto 3 en el documento US20130150625); y 2-(dimetilamino)-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]metil}propan-1-ol (compuesto 4 en el documento US20130150625); o cualquier estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Las formulaciones de nanopartículas de la presente divulgación pueden estar recubiertas con un tensioactivo o polímero con el fin de mejorar la administración de la partícula. En particular, la partícula está recubierta con un recubrimiento hidrófilo tal como, pero sin limitarse a, recubrimientos de PEG y/o recubrimientos que tienen una carga superficial neutra. Los recubrimientos hidrófilos pueden ayudar a administrar nanopartículas con mayores cargas útiles tales como, pero sin limitarse a, polinucleótidos dentro del sistema nervioso central. Como un ejemplo no limitativo, se describen nanopartículas que comprenden un recubrimiento hidrófilo y métodos de preparación de tales nanopartículas en la publicación de patente estadounidense n.º US20130183244.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las figuras y los ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance dado a conocer en el presente documento.

Figuras

Figura 1: Identificación y efectos de la mutación p.G12R de RAC2 sobre la actividad GTPasa de RAC2. A. Genealogía de los tres pacientes a partir de dos parentescos no relacionados. Las cajas negras y los círculos negros representan el sujeto masculino (P1) y los sujetos femeninos (P2, P3) afectados, respectivamente. Las cajas y los círculos blancos representan individuos no afectados. Las flechas representan los probandos y una barra doble horizontal representa la consanguinidad. B. Electroferograma representativo de la secuenciación de ADN de RAC2 para células de control y de paciente, que muestra la mutación c.34G>A. C. Inmunotransferencia representativa de la expresión de la proteína RAC2 en lisados de fibroblastos de control (C1, C2) y fibroblastos derivados de los individuos afectados (P1, P2 y P3). El control de carga corresponde a la expresión de GAPDH. D. Las células HEK293T o bien no se transdujeron (NT, control) o bien se transdujeron con un vector lentiviral vacío (WPI) que contenía la forma de tipo natural (WT) de ADNC de RAC2, la forma mutada descrita en el presente documento (G12R) o (como control positivo) la forma RAC2-GTP constitutivamente activada (G12V). Dos días después de la transducción, las células se recuperaron para su análisis usando el ensayo G-LISA (15 µg de proteína total por pocillo). Los resultados se indican como media ± error estándar de la media (EEM) de tres experimentos independientes. ***p<0,001; ****p<0,0001.

Figura 2: La mutación G12R inhibe la proliferación y diferenciación de HSPC

A. Proliferación de células positivas para CD34 en un cultivo de 7 días. Se usó citometría de flujo para analizar la proporción (en %) de células que expresan GFP+ en la ventana de adquisición de células vivas (negativas para 7-AAD). Las proporciones de células vivas GFP+ ROS bajo, DiIC1(5) bajo y positivas para anexina V se determinaron el día 4. Los resultados se indican como media ± EEM de cuatro experimentos independientes. B. Diferenciación de neutrófilos en un cultivo de 7 días. Se usó citometría de flujo para analizar el número de granulocitos (CD11b+CD15+) entre las células vivas GFP+. Las proporciones de células ROS bajo, DiIC1(5) bajo y anexina V+ entre las células vivas GFP+ se analizaron el día 4. Los resultados se indican como media ± EEM de tres experimentos independientes. C. Diferenciación de células T en un cultivo de 7 días (n=3). Se usó citometría de flujo para analizar la proporción de células vivas GFP+. El número de progenitores de células T (CD7+) se evaluó el día 7 en las células vivas GFP+. Los resultados se indican como media ± EEM de tres experimentos independientes. Para todos los experimentos: *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001.

Figura 3. Prueba de células Molm-13 de leucemia mielógena aguda (LMA, translocación MLL-AF9). A. Las células Molm-13 se transdujeron en presencia de un constructo lentiviral que contenía un vector vacío (WPI) o un vector con la forma de tipo natural de RAC2 (WT) o un vector que contenía la forma mutada de RAC2 (G12R). Las células transducidas expresan todas ellas un gen indicador de GFP que posibilita la detección mediante citometría de flujo del % de células GFP+ y el número de células GFP+ transducidas durante un cultivo de 7 días. B. El día 4, se realizó análisis por citometría de flujo para evaluar la proporción de células GFP+ transducidas que entran en apoptosis (% de anexina V+), la polarización de membrana mitocondrial (% de $\Delta\mu\text{m}$) y la producción de ROS. Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes. **p<0,01 y ***p<0,001.

Figura 4. Prueba de células MV4-11 de LMA (translocación MLL-AF4). Las células MV4-11 se transdujeron en presencia de un constructo lentiviral que contenía un vector vacío (WPI) o un vector con la forma de tipo natural de RAC2 (WT) o un vector que contenía la forma mutada de RAC2 (G12R). Las células transducidas expresan todas ellas un gen indicador de GFP que posibilita la detección mediante citometría de flujo del % de células GFP+ y el número de células GFP+ transducidas durante un cultivo de 7 días. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

Figura 5. Prueba de células HL-60 de LMA. Las células HL-60 se transdujeron en presencia de un constructo lentiviral que contenía un vector vacío (WPI) o un vector con la forma de tipo natural de RAC2 (WT) o un vector que contenía la forma mutada de RAC2 (G12R). Tras la etapa de transducción, las células se cultivaron en presencia de ácido retinoico con el fin de inducir su diferenciación hacia el linaje granulocítico. A-B. Las células transducidas expresan todas ellas un gen indicador de GFP que posibilita la detección mediante citometría de flujo del número de células GFP+ transducidas 2 días (J2) y 4 días (J4) después del comienzo del cultivo y el número de granulocitos (CD11b+CD15+). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. *p<0,05 y ***p<0,001. C-D. El día 4, se realizó análisis por citometría de flujo para evaluar la proporción de células con un bajo nivel de polarización de membrana mitocondrial y un bajo nivel de producción de ROS. El porcentaje de células que entran en apoptosis fue del 2 % y del 10 % para las condiciones WT y G12R, respectivamente. Los histogramas son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 6. A. Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos en presencia de fitohemaglutinina A y se transdujeron con un constructo lentiviral que contenía un vector vacío (WPI) o un vector que contenía la forma mutada de RAC2 (G12R). Las células transducidas expresan todas ellas un gen indicador de GFP que posibilita el seguimiento mediante citometría de flujo del % de células GFP+, el número de células GFP+ transducidas y la proporción de células GFP+ que entran en apoptosis (% de anexina V+). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. B. Se transdujeron líneas de VEB-B de donantes sanos en presencia de un constructo lentiviral que contenía un vector vacío (WPI) o un vector que contenía la forma mutada de RAC2 (G12R). Las células transducidas expresan todas ellas un gen indicador de GFP que posibilita el seguimiento mediante citometría de flujo del % de células GFP+. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. ***p <0,001.

Ejemplo

Materiales y métodos

Pacientes y muestras de sangre de cordón humana.

El estudio se llevó a cabo según la legislación francesa y los principios de la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado de los padres o tutores legales de los pacientes, y el protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética independiente regional y el Ministerio de Investigación de Francia (DC 2014-2272/2015/DC-2008-329). Las líneas celulares de fibroblastos primarios se obtuvieron de biopsias cutáneas.

Las muestras de sangre de cordón (CB) humanas idóneas para fines de investigación se obtuvieron del banco de sangre de cordón del Hospital St Louis (París, Francia; autorización: 23/09/2014). Las células mononucleares se aislaron mediante separación por densidad en el medio Lymphoprep (Abcys). Las HSPC positivas para CD34 se clasificaron magnéticamente usando el separador autoMACSpro (Miltenyi Biotec) y la pureza de las células se verificó con un analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec).

Análisis genético, de secuenciación y de expresión génica.

Se aisló ADN genómico mediante extracción con fenol/cloroformo a partir de fibroblastos (P1, P2 y P3) o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (padre de P3). Se realizó secuenciación del exoma completo con un kit de enriquecimiento de exoma Illumina TruSeq (Illumina), usando lecturas de extremos emparejados de 100 pb. Se observaron el ochenta y cinco por ciento de las regiones diana con una cobertura >20x. El llamado de variantes no estaba basado en ningún modelo genético particular. La variante G12R RAC2 no se encontró en varias bases de datos de secuencia internas y públicas. La secuenciación de Sanger confirmó la mutación en P1, P2 y P3 (secuenciador ABI Prism 3700, Life Technologies).

Para los análisis por inmunotransferencia de tipo Western, los fibroblastos primarios de control o de los pacientes se sometieron a lisis en un tampón Tris (Tris 20 mM, pH 7,9; NaCl 300 mM; Nonidet P-40 al 1 %) complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los extractos celulares se separaron mediante SDS-PAGE, se sometieron a inmunotransferencia y se tiñeron con anticuerpo anti-RAC2 (ab154711, Abcam) o anticuerpo anti-GAPDH (SC-32233, Santa Cruz). Después de la tinción con un anticuerpo secundario conjugado con HRP, se desarrolló la inmunotransferencia usando un kit ECL+ (Amersham). Los niveles de proteína se cuantificaron con el software Fiji.

Construcción y producción de los vectores lentivirales. La estructura principal del vector lentiviral pWPI autoinactivante y de replicación defectuosa fue proporcionado por Addgene (<https://www.addgene.org/>). Todos los constructos (G12R, G12V, D57N y E62K) fueron generados por GenScript (<https://www.genscript.com>). Los sobrenadantes lentivirales fueron producidos por la instalación de vectores en SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (Lyon, Francia). Todos los procedimientos con células genéticamente modificadas fueron aprobados por el Consejo Nacional de Biotecnología de Francia y el Ministerio de Investigación de Francia (referencia: 4983/3).

Ensayos de activación de RAC2 e inmunotransferencia de la línea celular HEK293T.

Las células HEK293T se cultivaron durante la noche antes de la transducción con el sobrenadante lentiviral apropiado a una multiplicidad de infección de 20. Después de dos días de cultivo, los sedimentos celulares se congelaron en nitrógeno líquido. Los niveles de RAC2 activada se determinaron usando el kit bioquímico de ensayo de activación de RAC G-LISA® (#BK125, Cytoskeleton Inc.). El kit G-LISA® se usó según las instrucciones del fabricante, excepto porque se usaron 10 µg/ml de anticuerpo específico de RAC2 (AT2G11, sc-517424, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y 1/2000 de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (#1721011, Bio-Rad) para detectar la cantidad de RAC2 activa capturada. La reacción se visualizó mediante la adición de 100 µl de sustrato cromógeno (UltraTMB de 1 etapa, 34028, Thermo Scientific) durante 3 min y se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 1 N. La absorbancia a 450 nm se midió usando un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA. Se obtuvieron extractos celulares completos sometiendo a lisis las células en tampón de lisis G-LISA complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti-RAC2 (AT2G11, sc-517424, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) o anticuerpo anti-GAPDH (14C10, Cell Signaling Technology). Las inmunotransferencias se revelaron mediante quimioluminiscencia usando el sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad). Los niveles de proteína se cuantificaron con el software Image Lab.

Holotomografía

Para medir el índice de refracción dentro de la célula (es decir, visualización sin marcadores de los orgánulos celulares), la muestra de células se sembró en una placa de fondo de vidrio de 35 mm (Ibidi-Dishes™ #81156; Ibidi, GmbH) y se colocó en el área de visualización del microscopio 3D Cell Explorer (Nanolive SA). Las imágenes de las células se procesaron usando el software STEVE (Nanolive).

Cultivo *in vitro* de células CD34+ de sangre de cordón humana

Se cultivaron HSPC CD34+ de sangre de cordón durante la noche (tal como se describió previamente⁵) y luego se transdujeron con el sobrenadante lentiviral apropiada a una multiplicidad de infección de 80. Después de dos días de cultivo, las células GFP+ se midieron mediante citometría de flujo antes del cultivo *in vitro*. La capacidad de las células CD34+ para diferenciarse a lo largo del linaje de granulocitos o células T se midió tal como se describe en otras partes^{6,29}.

Citometría de flujo, tinción con Mitotracker DIIC1(5) y CellRox

Los anticuerpos monoclonales contra CD7 (MT-701), CD11b (D12), CD34 (8G12) y los controles de isotipo de IgG1k, IgG2a y IgG2b de ratón y los reactivos anexina V y 7-aminoactinomicina D (7AAD) se obtuvieron de BD Biosciences (San José, CA). Los anticuerpos contra CD15 (80H5) e IgM de ratón de control se adquirieron de Beckman Coulter (San Diego). El potencial de membrana mitocondrial se midió usando un kit de ensayo de DiIC1(5) MitoProbe™ (M34151) y el nivel de ROS se midió usando un kit de ensayo CellRox® (C10492), según las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Después de la tinción, las células se analizaron en un citómetro de flujo Gallios y los datos se procesaron usando el software Kaluza (todos ellos de Beckman Coulter).

Modelado de homología

Se construyeron modelos de homología tridimensionales para el mutante G12R de RAC2 humana (Uniprot P15153) usando el software MODELLER v20 (Webb y Sali, 2016, 2017). La estructura cristalina de RAC2 humana WT (código de PDB: 1DS6) se usó como plantilla.

Análisis estadístico

Para todos los análisis, se realizaron tres o más experimentos independientes. Los datos se notifican como media $\pm$ error estándar de la media (EEM). Se realizó una prueba de la t para datos independientes bilateral usando el software Prism 4 (GraphPad). El umbral para la significación estadística se estableció a $p < 0,05$.

Resultados

Una mutación de sentido erróneo (G12R) en la proteína GTPasa RAC2 conduce a un fenotipo SCID

En la presente cohorte de pacientes con un fenotipo SCID, algunos individuos aún no tienen un diagnóstico molecular. Tres pacientes de dos parentescos no relacionados (P1 de un parentesco y P2 y P3 como madre e hija de otro parentesco, respectivamente) se presentaron con todas las características clínicas de RD distintas de hipoacusia (figura 1A). Tal como se observa en pacientes con RD, la ausencia completa de neutrófilos fue responsable de la aparición de graves infecciones antes de lo que se observa habitualmente en otras formas de SCID (tabla 1) Picard². El análisis de otros linajes de células sanguíneas destacó la ausencia de linfocitos T y B y monocitos circulantes. A la inversa, los recuentos de plaquetas eran normales y el nivel de hemoglobina era ligeramente inferior al normal en sólo un paciente (tabla 1). En general, el perfil de recuento de células periféricas correspondía a la morfología hipoplásica grave de la médula ósea de los pacientes (tabla 1 y datos no mostrados). El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) realizado poco después del nacimiento tuvo éxito en P1 (previamente descrito como P4¹²) y P2, lo que demuestra que el defecto hereditario era intrínseco y no extrínseco (es decir, no microambiental) (tabla 1).

Al realizar secuenciación del genoma completo (WES) de los fibroblastos de los pacientes, se identificó una mutación de sentido erróneo heterocigótica (c.34G>A, p.G12R) en el gen *RAC2* como única causa genética posible. La mutación se confirmó mediante secuenciación de Sanger en los tres pacientes, pero estaba ausente en el padre de P3, el único pariente del cual pudo obtenerse una muestra de ADN (figura 1B). La presencia del mismo fenotipo y la misma mutación de sentido erróneo G12R en *RAC2* en P2 y su hija P3 destacó el patrón de herencia de AD.

La mutación de sentido erróneo p.G12R está ubicada en la caja G1, una región de unión de nucleótidos de guanina altamente conservada¹³, y no estaba anotada en la base de datos interna de los presentes inventores (n=14154 en la cohorte) o en la base de datos de agregación del genoma humano (gnomAD). Se predijo que la mutación era perjudicial mediante cuatro software de predicción *in silico* diferentes, incluyendo agotamiento dependiente de anotaciones combinadas. Cabe destacar que esta mutación génica difería de las mutaciones de pérdida de función (LOF) o ganancia de función (GOF) previamente notificadas que son responsables de defectos neutrofílicos leves y/o linfocitopenia¹⁴⁻¹⁸. Cabe destacar que la mutación de sentido erróneo G12R estaba asociada con niveles normales de expresión de proteína *RAC2* en los fibroblastos de los pacientes (figura 1C).

La mutación G12R ubicada en el dominio de unión a GDP/GTP altera la homeostasis celular

Con el fin de entender el impacto funcional de esta mutación G12R, se generó un modelo de homología tridimensional usando la estructura de rayos X de *RAC2* de tipo natural (WT)¹⁹ como plantilla (datos no mostrados). Se predijo que una arginina flexible voluminosa bloquea la entrada al bolsillo de unión a GDP/GTP en la caja G1 (datos no mostrados). Por consiguiente, el grupo guanidinio cargado de la arginina podría alterar el bolsillo cargado positivamente y, por tanto, influir en la velocidad de hidrólisis de GTP, tal como se demostró previamente para otras GTPasas pequeñas²⁰.

Para someter a prueba este modelo bioquímicamente, se cuantificó la forma activa unida a GTP de *RAC2* en extractos de células HEK293T negativas para *RAC2* de manera natural. Las células se transdujeron con una estructura principal de vector lentiviral vacío (WPI) con proteína fluorescente verde (GFP) como rastreador o el vector que contenía o bien la forma WT de ADNc de *RAC2*, o bien la forma mutada descrita en el presente documento (G12R) o bien, como control positivo, la forma *RAC2*-GTP constitutivamente activada (G12V)²¹. Se observó un alto nivel de la forma activa unida a GTP de *RAC2* tanto con G12V como con G12R (figura 1D), lo que demuestra que la sustitución por arginina en la posición 12 conduce a una activación sostenida de la ruta de señalización de *RAC2*. Por tanto, la mutación G12R es una mutación de GOF.

Para determinar cómo la expresión de una forma constitutivamente activa de *RAC2* tiene un impacto sobre la división y la supervivencia de las células, se realizó un análisis holotomográfico de fibroblastos primarios de P3. De acuerdo con la baja tasa de proliferación de células observada *in vitro* (datos no mostrados), los fibroblastos del paciente se caracterizaron por una dinámica celular muy lenta y núcleos fragmentados que sugerían un fallo de la citocinesis (datos no mostrados). Además, y a diferencia de los fibroblastos de control, la forma de las células y la red mitocondrial estaban alteradas en los fibroblastos de P3 (datos no mostrados). Estas dos observaciones destacaron un vínculo entre la mutación G12R, la actividad mitocondrial defectuosa y los drásticos cambios en la mitosis celular que reflejan un defecto en las rutas de señalización de *RAC* que impulsan la citocinesis²².

La mutación G12R altera la actividad mitocondrial y bloquea la diferenciación de HSPC

Para entender del impacto de la activación de RAC2 constitutiva sobre la hematopoyesis, se transdujeron HSPC de sangre de cordón humana positivas para CD34 (dada la ausencia de muestras de médula ósea de los pacientes) con los ADNc de RAC2 WPI, WT, G12R o G12V (con GFP como rastreador) y luego se cultivaron con citocinas durante 7 días (figura 2b). La expresión de formas de RAC2 constitutivamente activadas (G12R y G12V) condujo a la desaparición de células GFP+ transducidas en el plazo de 4 días, un punto de tiempo en el que se bloqueó significativamente la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (cuantificada como proporción de células "ROS bajo"), y la despolarización de membrana mitocondrial (la proporción de células "DilC1(5) bajo") y la apoptosis (la proporción de células positivas para anexina V) habían aumentado significativamente (figura 2A). Cabe destacar que estos cambios no se observaron en el subconjunto negativo para GFP. En conjunto, estos hallazgos destacaron la correlación específica entre las mutaciones en la posición 12 en la proteína RAC2 y la disfunción mitocondrial. Los presentes resultados están en línea con informes previos que indican que (i) la actividad mitocondrial es necesaria para la función de HSPC^{23,24} y (ii) la alteración de la ruta de señalización de RAC2 afecta a la dinámica mitocondrial²⁵ y a la producción de ROS²⁶⁻²⁸ (figura 2A).

Como RAC2 tiene una expresión alta en subconjuntos de médula ósea hematopoyética humana y durante la timopoyesis humana, se transdujeron HSPC con ADNc de RAC2 WPI, WT, G12R o G12V y se estimularon para diferenciarse a lo largo de los linajes de granulocitos, monocitos y linfocitos T, todos ellos ausentes en los tres pacientes. Después de 7 días de cultivo con factor de estimulación de colonias de granulocitos, los recuentos de neutrófilos GFP+CD15+CD11b+ eran significativamente menores en las condiciones G12R y G12V que en las condiciones WPI o WT (figura 2B). También se halló que estaban alterados el potencial de membrana mitocondrial y la producción de ROS y estaban asociados con niveles elevados de apoptosis (figura 2B). La diferenciación hacia el linaje de monocitos y la diferenciación en ensayos de unidades de formación de colonias proporcionaron resultados similares (datos no mostrados). Tras la exposición al sistema de cultivo del ligando tipo delta-4 (DL4) de Notch (que permite la diferenciación de HSPC en progenitores de células T CD7+ en 7 días²⁹), el recuento del subconjunto GFP+ en las condiciones G12R y G12V fue muy bajo (con respecto a las condiciones WT y WPI) y los progenitores de células T GFP+CD7+ estaban ausentes casi por completo (figura 2C). Estos resultados están en línea con un informe previo en el que la expresión de la forma de RAC2 G12V constitutivamente activa impedía la diferenciación de timocitos de ratón y conducía a la apoptosis³⁰. En conjunto, los presentes resultados destacan la función clave del equilibrio de RAC2 unida a GDP/GTP en la supervivencia y la diferenciación del compartimento linfomieloide y enfatizan la implicación de la ruta de señalización de RAC2 en la función de HSPC. A continuación, se comparó el impacto de G12R con el de las mutaciones de sentido erróneo de LOF y GOF previamente descritas en RAC2 (p.D57N y p.E62K, respectivamente)^{14,15,18} sobre la proliferación de HSPC de sangre de cordón humana. Durante el cultivo de 8 días, el número de HSPC GFP+ transducidas era bajo en los grupos E62K y G12R, pero era significativamente más alto en la condición E62K que en la condición G12R. A diferencia de la mutación G12R, las mutaciones D57N y E62K no tenían ningún impacto sobre la actividad mitocondrial.

En conjunto, las presentes observaciones sugieren que la mutación de sentido erróneo G12R en RAC2 se correlaciona con el nivel de la forma activa unida a GTP de RAC2 y con la supervivencia y la función de las HSPC. Estos hallazgos concuerdan con el fenotipo clínico e inmunológico de SCID observado en los presentes tres pacientes y con el fenotipo menos grave que presentan los pacientes que portan mutaciones E62K o D57.

Los tres tipos de LAM sometidos a prueba (Molm13, MV4-11 y HL-60)

Se transdujeron células Molm-13 de leucemia mielógena aguda (LMA, translocación MLL-AF9) en presencia de un constructo lentiviral que contenía un vector vacío (WPI), un vector que contenía la forma de tipo natural de RAC2 (WT) o un vector que contenía la forma mutada de RAC2 (G12R). Las células transducidas expresan todas ellas un gen indicador de GFP (proteína fluorescente verde) que posibilita el seguimiento mediante citometría de flujo del porcentaje de células GFP+ y el número de células GFP+ transducidas. La expresión de la forma de RAC2 constitutivamente activada (G12R) condujo a la desaparición de células GFP+ transducidas en el plazo de 7 días (figura 3A). Esta observación se correlaciona con una mayor proporción de células apoptóticas GFP+ (% de anexina V+) que tienen una polarización de membrana mitocondrial defectuosa y una producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) defectuosa (figura 3B).

También se transdujeron células MV4-11 de LMA (translocación MLL-AF4) en presencia de un constructo lentiviral que contenía un vector vacío (WPI), un vector que contenía la forma de tipo natural de RAC2 (WT) o un vector que contenía la forma mutada de RAC2 (G12R). A las células transducidas que expresan un gen indicador de GFP se les realizó un seguimiento mediante citometría de flujo y se observaron un porcentaje y un número disminuidos de células GFP+ en la condición G12R (figura 4). Las células también se tiñeron con May-Grünwald Giemsa y se observó fragmentación del núcleo únicamente en las células transducidas con el constructo G12R (datos no mostrados).

Se transdujeron células HL-60 de LMA en presencia de un constructo lentiviral que contenía la forma de tipo natural de RAC2 (WT) o un vector que contenía la forma mutada de RAC2 (G12R). Después de la transducción, las células se cultivaron durante 4 días en presencia de ácido retinoico para inducir su diferenciación en granulocitos (CD11b+CD15+). Se midió el número de células GFP+ el día 2 (J2) y el día 4 (J4) y el número de granulocitos el día 4. Tal como se observa en las figuras 5A y 5B, el número de células GFP+ y CD11b+CD15+ se redujo drásticamente en la condición G12R en comparación con la condición WT. Esta observación se correlacionó con una mayor despolarización de membrana mitocondrial (cuantificada como la proporción de células DILC bajo; figura 5C) y una mayor proporción de células que no pueden producir ROS (cuantificada como el % de ROS bajo; figura 5D). Naturalmente, la proporción de células GFP+ que entran en apoptosis fue del 2 % y del 10 % para la condición WT y G12R, respectivamente. Las células también se tiñeron con May-Grünwald Giemsa y se observaron núcleos fragmentados únicamente en las células transducidas con el constructo G12R.

También se estudió el efecto de la mutación de sentido erróneo G12R de RAC2 sobre las células primarias. Brevemente, se transdujeron células mononucleares de donantes sanos en presencia de un constructo lentiviral que contenía un vector vacío (WPI) o un vector que contenía la forma mutada de RAC2 (G12R). A las células GFP+ transducidas se les realizó un seguimiento mediante citometría de flujo durante un cultivo de 8 días. Tal como se observa en la figura 6A, el % y el número de células GFP+ se redujeron drásticamente en la condición G12R en comparación con la condición de control. Esta observación se asocia con un mayor % de células apoptóticas (figura 6A). También se transdujeron líneas de VEB-B de donantes sanos en presencia de un constructo lentiviral que contenía un vector vacío (WPI) o un vector que contenía la forma mutada de RAC2 (G12R). En la cinética de evolución temporal representada en la figura 6B, el % de células GFP+ se reduce significativamente en la condición G12R.

Discusión:

En tres pacientes con SCID, se identificó una mutación de sentido erróneo heterocigótica dominante (p.G12R) en el dominio de caja G1 altamente conservado de la proteína RAC2. La mutación afectó a los sistemas inmunitarios innato y adaptativo. Dada la gravedad de la presentación clínica, los pacientes debían someterse a HSCT en las primeras semanas de vida. La observación de herencia de AD amplía el espectro clínico de RD. Ahora se distingue entre dos formas de RD: una forma sindrómica recesiva asociada con hipoacusia y mutaciones AK2 (tipo I) y una forma no sindrómica (sin hipoacusia) específicamente asociada con la mutación G12R AD en RAC2 (tipo II). La ausencia de pérdida auditiva neurosensitiva en la forma de SCID AD de tipo II podría deberse a la expresión específica de RAC2 en el linaje hematopoyético y al hecho de que RAC1 y RAC3 (pero no RAC2) son las GTPasas RAC implicadas en el desarrollo del oído interno del ratón ³¹.

La mutación G12R-RAC2 identificada en el presente documento tuvo un efecto drástico sobre la proliferación y la supervivencia de las células, especialmente en HSPC. Además, la mutación alteró la actividad mitocondrial en HSPC y alteró la diferenciación celular hacia los linajes linfoide y mieloide. Estas características podrían explicar la ausencia de neutrófilos y linfocitos circulantes en los presentes tres pacientes y destacan el papel regulador no redundante de RAC2 en diferentes puntos de control hematopoyéticos.

Sorprendentemente, en los presentes experimentos, la variante de LOF D57N no tuvo ningún impacto sobre el conjunto de HSPC y la variante de GOF E62K sólo tiene un efecto moderado (con respecto a G12R). En conjunto, los presentes hallazgos enfatizan que las diversas mutaciones de RAC2 difieren en sus efectos sobre las HSPC, lo que probablemente justifica el amplio espectro de fenotipos clínicos observados en pacientes con defectos de RAC2 (que van desde defectos neutrofílicos y/o leucocitopenia, sin ninguna alteración notificada de la hematopoyesis, hasta la forma SCID con hipoplasia de médula ósea que se describe en el presente documento). Este tipo de heterogeneidad ya se ha notificado para mutaciones de RAG1, donde el fenotipo va desde enfermedad autoinmunitaria hasta SCID ³².

La ubicación de la sustitución de aminoácido (dentro del bolsillo de unión a GDP/GTP (G12R) o en el dominio de Switch II (E62K)) podría explicar la diferencia entre estas dos mutaciones de GOF. Esta hipótesis está en línea con (i) el alto nivel de la forma activa de RAC2 (unida a GTP) observada en la condición G12R, con respecto a su ausencia en la condición E62K, y (ii) el bajo nivel de expresión de proteína RAC2 observado en la condición E62K, lo que sugiere que la sustitución de glutamato en la posición 62 puede influir en la estabilidad de la proteína. Como consecuencia, se sugirió que la mutación G12R es la única que puede activar dianas aguas abajo de una manera sostenida y constitutiva. Los presentes resultados para la variante E62K difieren de los descritos por Hsu *et al* ¹⁸, ya que ellos evalúan la capacidad de unión a GTP de la proteína E62K purificada; en el presente documento, se midió la actividad de RAC2-GTP en un lisado celular. A la luz de estos resultados, las dos mutaciones de GOF no proporcionan el mismo nivel de actividad de RAC2-GTP y el ensayo G-LISA parece ser un método apropiado para medir el nivel de activación de RAC2 en células vivas.

En resumen, la mutación p.G12R de RAC2 tiene un impacto drástico sobre el mantenimiento y la diferenciación del compartimento de HSPC y, por tanto, podría explicar la gravedad del fenotipo clínico e inmunológico de los pacientes. Según el conocimiento de los presentes inventores, el presente estudio es el primero que notifica una forma AD de SCID y los médicos deben considerar la secuenciación del gen RAC2 para pacientes con

presentación clínica de SCID y RD. También se observó un impacto drástico de la mutación de sentido erróneo G12R en diversas líneas celulares (VEB-B, LMA) o células primarias maduras, lo que sugiere que seleccionar como diana el dominio de unión a GDP/GTP de la proteína RAC2 podría representar una novedosa estrategia terapéutica para inducir la muerte de células leucémicas.

5

Tabla 1: Características hematológicas y desenlaces para los tres pacientes

Pacientes (edad en el momento de la presentación)	P1 (3 días)	P2 (10 días)	P3 (9 días)	Valor de control de edad coincidente
Infección en el momento de nacimiento	Septicemia	Líquido amniótico coloreado Septicemia/neumonía	Septicemia/meningitis Abscesos cerebrales	
Glóbulos blancos ($\times 10^{-9}/l$)	0,6	0,3	0,5	7-18
Linfocitos ($\times 10^{-9}/l$)	0,4	0,1	0,5	3,4-7,6
Linfocitos B ($\times 10^{-9}/l$)	0,09	0,004	0	0,3-2
Linfocitos T ($\times 10^{-9}/l$)	0,24	0,07	0	2,5-5,5
Monocitos ($\times 10^{-9}/l$)	0,01	NE	0	0,1-1,1
Neutrófilos ($\times 10^{-9}/l$)	0,2	NE	0	1,5-8,5
Plaquetas ($\times 10^{-9}/l$)	248	220	429	175-500
Hemoglobina (g/dl)	18	13	10	12,5-16,6
Aspirado de médula ósea	Hipoplasia	Hipoplasia	Hipoplasia	
HSCT (edad en el momento de trasplante, meses) Régimen de acondicionamiento	1 ^{er} HSCT con agotamiento de células T (3 M) Busulfán 8 mg/kg Endoxán 200 mg/kg ALS 25 mg/kg 2 ^o HSCT con agotamiento de células T (6 M) Busulfán 16 mg/kg Ciclofosfamida 200 mg/kg ALS 25 mg/kg	HSCT (2 M) Busulfán 8 mg/kg Endoxán 50 mg/kg	1 ^{er} HSCT con agotamiento de células T (2 M) Busulfán 3,6 mg/kg Fludarabina 160 mg/m ² ALS 5 mg/kg 2 ^o HSCT (3 M) Fludarabina 120 mg/m ² ALS 5 mg/kg	
Células del donante	1 ^{er} HSCT: MMFD/f 2 ^o HSCT: MMFD/f	MMFD/f	1 ^{er} HSCT: MMFD/f 2 ^o HSCT: MMFD/f	
Desenlace	AWW	EICH resuelta en D120; AWW	Fracaso de injerto; muerte (5,5 M después del HSCT)	

BM = médula ósea; HSCT = trasplante de células madre hematopoyéticas; M = meses; ALS: suero antilinfocitario; MMFD/f: donante familiar no coincidente/padre; EICH: enfermedad de injerto contra huésped; AWW: vivo y sano

10

Referencias

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

15

1. Fischer, A., Notarangelo, L. D., Neven, B., Cavazzana, M. y Puck, J. M. Severe combined immunodeficiencies and related disorders. Nat. Rev. Dis. Prim. 1, 15061 (2015).

20

2. Picard, C. *et al.* International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. J. Clin. Immunol. 38, 96-128 (2018).

3. de VAAL, O. y SEYNHAEVE, V. Reticular dysgenesis. Lancet (Londres, Inglaterra) 2, 1123-5 (1959).

4. Pannicke, U. *et al.* Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2. *Nat. Genet.* 41, 101-5 (2009).
5. Lagresle-Peyrou, C. *et al.* Human adenylate kinase 2 deficiency causes a profound hematopoietic defect associated with sensorineural deafness. *Nat. Genet.* 41, 106-11 (2009).
6. Six, E. *et al.* AK2 deficiency compromises the mitochondrial energy metabolism required for differentiation of human neutrophil and lymphoid lineages. *Cell Death Dis.* 6, e1856 (2015).
7. Troeger, A. y Williams, D. A. Hematopoietic-specific Rho GTPases Rac2 and RhoH and human blood disorders. *Exp. Cell Res.* 319, 2375-83 (2013).
8. Nayak, R. C., Chang, K.-H., Vaitinadin, N.-S. y Cancelas, J. A. Rho GTPases control specific cytoskeleton-dependent functions of hematopoietic stem cells. *Immunol. Rev.* 256, 255-68 (2013).
9. Gu, Y. *et al.* Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* 302, 445-9 (2003).
10. Shirsat, N. V, Pignolo, R. J., Kreider, B. L. y Rovera, G. A member of the ras gene superfamily is expressed specifically in T, B and myeloid hemopoietic cells. *Oncogene* 5, 769-72 (1990).
11. Gu, Y. *et al.* Rac2, a hematopoiesis-specific Rho GTPase, specifically regulates mast cell protease gene expression in bone marrow-derived mast cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7645-57 (2002).
12. André-Schmutz, I. *et al.* Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. *Lancet* 360, 130-7 (2002).
13. Olson, M. F. Rho GTPases, their post-translational modifications, disease-associated mutations and pharmacological inhibitors. *Small GTPases* 9, 203-215 (2018).
14. Ambruso, D. R. *et al.* Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4654-9 (2000).
15. Accetta, D. *et al.* Human phagocyte defect caused by a Rac2 mutation detected by means of neonatal screening for T-cell lymphopenia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 535-538.e1-2 (2011).
16. Alkhairy, O. K. *et al.* RAC2 loss-of-function mutation in 2 siblings with characteristics of common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 1380-4.e1-5 (2015).
17. Lougaris, V. *et al.* A monoallelic activating mutation in RAC2 resulting in a combined immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2019). doi:10.1016/j.jaci.2019.01.001
18. Hsu, A. P. *et al.* Dominant activating RAC2 mutation with lymphopenia, immunodeficiency and cytoskeletal defects. *Blood* (2019). doi:10.1182/blood-2018-11-886028
19. Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O. N., Illenberger, D. y Gierschik, P. The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat. Struct. Biol.* 7, 122-6 (2000).
20. Hunter, J. C. *et al.* Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. *Mol. Cancer Res.* 13, 1325-1335 (2015).
21. Illenberger, D. *et al.* Rac2 regulation of phospholipase C-beta 2 activity and mode of membrane interactions in intact cells. *J. Biol. Chem.* 278, 8645-52 (2003).
22. Canman, J. C. *et al.* Inhibition of Rac by the GAP activity of centralspindlin is essential for cytokinesis. *Science* 322, 1543-6 (2008).
23. Bigarella, C. L., Liang, R. y Ghaffari, S. Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development* 141, 4206-18 (2014).
24. Ansó, E. *et al.* The mitochondrial respiratory chain is essential for haematopoietic stem cell function. *Nat. Cell Biol.* 19, 614-625 (2017).
25. Capala, M. E. *et al.* Mitochondrial Dysfunction in Human Leukemic Stem/Progenitor Cells upon Loss of RAC2. *PLoS One* 10, e0128585 (2015).

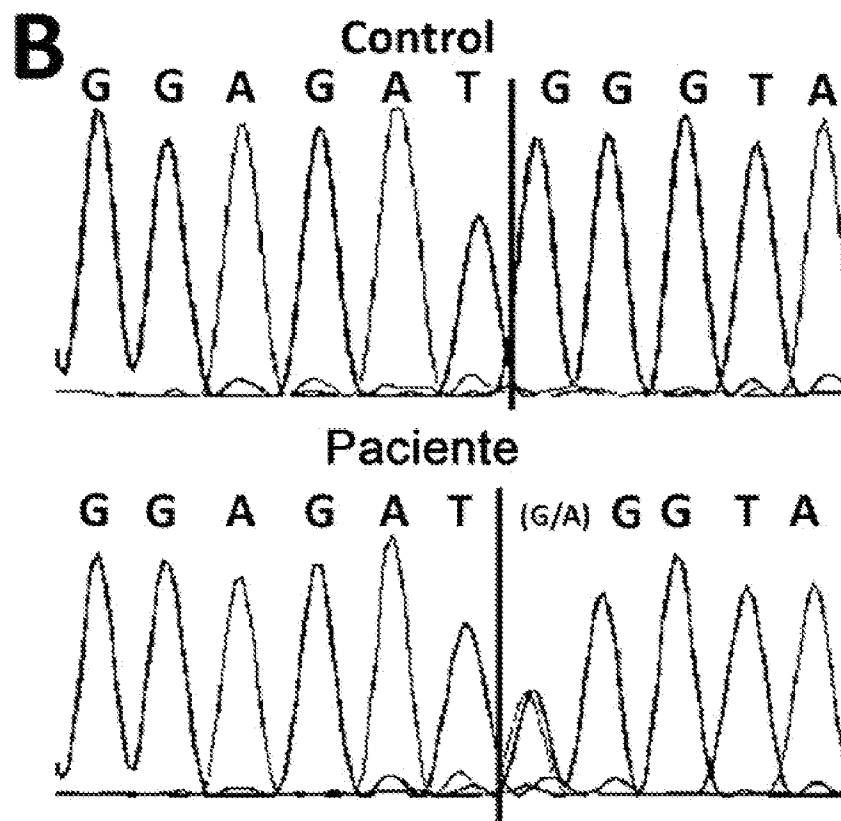
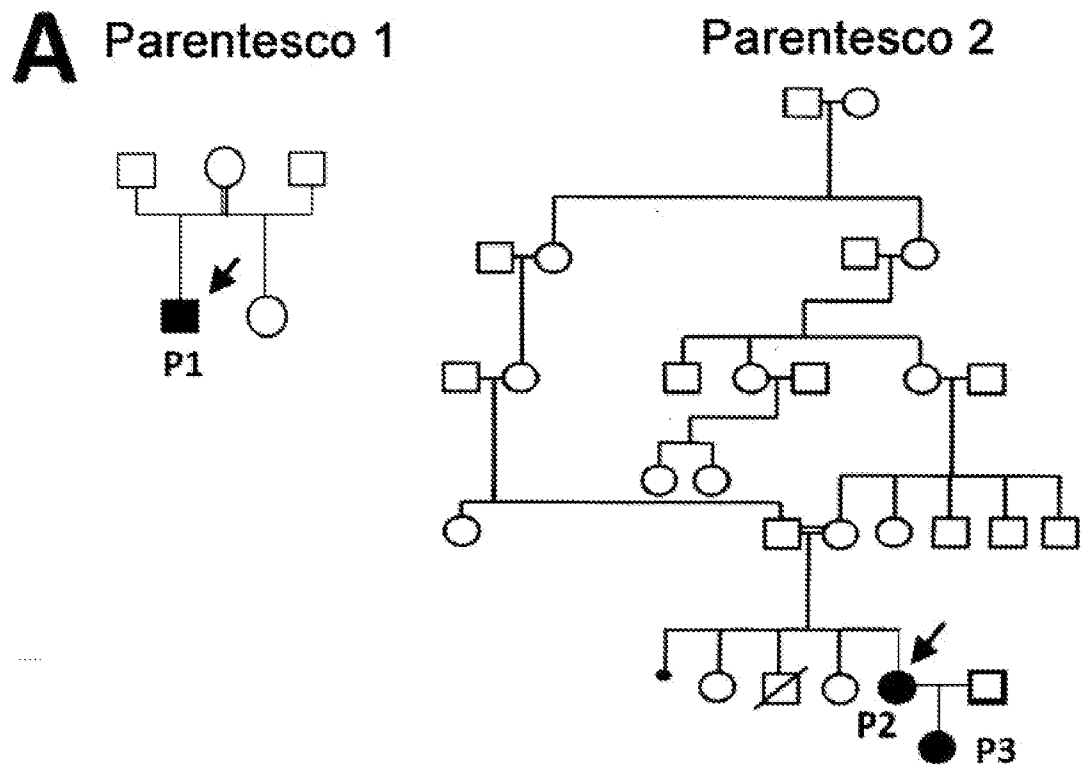
26. Pei, H. *et al.* RAC2-P38 MAPK-dependent NADPH oxidase activity is associated with the resistance of quiescent cells to ionizing radiation. *Cell Cycle* 16, 113-122 (2017).
- 5 27. Tao, W. *et al.* The TRQQKRP motif located near the C-terminus of Rac2 is essential for Rac2 biologic functions and intracellular localization. *Blood* 100, 1679-88 (2002).
28. Nieborowska-Skorska, M. *et al.* Rac2-MRC-cllII-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors. *Blood* 119, 4253-63 (2012).
- 10 29. Reimann, C. *et al.* Human T-Lymphoid Progenitors Generated in a Feeder-Cell-Free Delta-Like-4 Culture System Promote T-Cell Reconstitution in NOD/SCID/ γ c $^{-/-}$ Mice. *Stem Cells* 30, 1771-1780 (2012).
- 15 30. Lorès, P., Morin, L., Luna, R. y Gacon, G. Enhanced apoptosis in the thymus of transgenic mice expressing constitutively activated forms of human Rac2GTPase. *Oncogene* 15, 601-605 (1997).
31. Grimsley-Myers, C. M., Sipe, C. W., Wu, D. K. y Lu, X. Redundant functions of Rac GTPases in inner ear morphogenesis. *Dev. Biol.* 362, 172-186 (2012).
- 20 32. Notarangelo, L. D., Kim, M.-S., Walter, J. E. y Lee, Y. N. Human RAG mutations: biochemistry and clinical implications. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 234-246 (2016).

REIVINDICACIONES

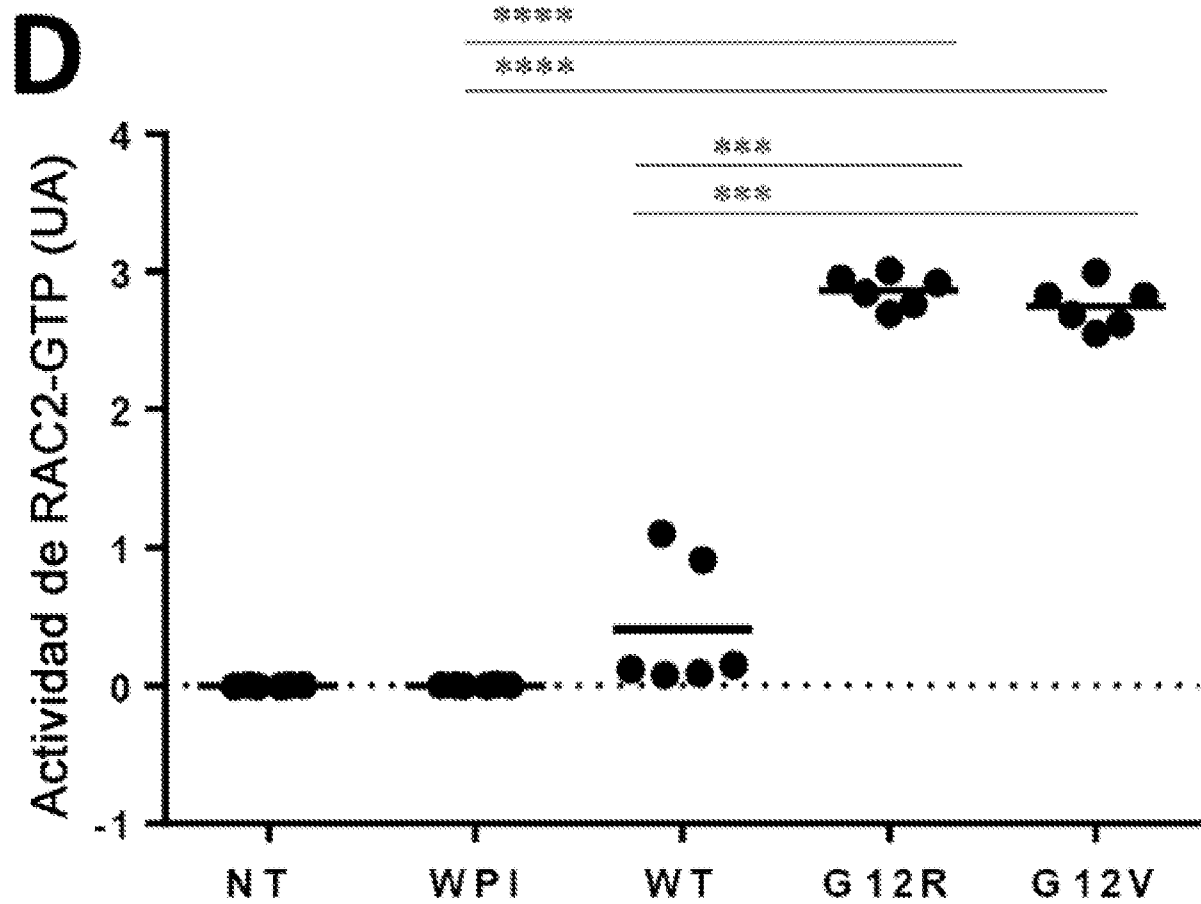
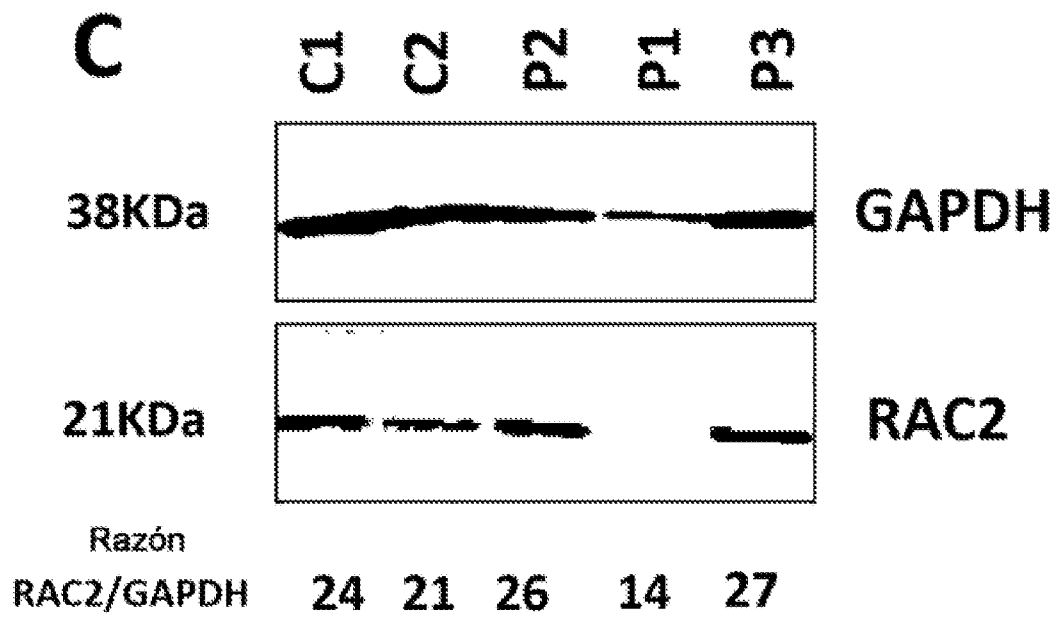
1. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso en un método de ablación completa de la hematopoyesis en un paciente que lo necesita.
2. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso en un método de tratamiento de una neoplasia maligna de células hematopoyéticas en un paciente que lo necesita.
3. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha ablación es para preparar al paciente para un trasplante de médula ósea.
4. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso según la reivindicación 3, en la que el trasplante de médula ósea es trasplante de células madre hematopoyéticas.
5. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso según la reivindicación 2, en la que la neoplasia maligna de células hematopoyéticas se selecciona del grupo que consiste en leucemias, linfomas y mielomas múltiples.
6. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso según la reivindicación 2, en la que la neoplasia maligna de células hematopoyéticas se selecciona del grupo que consiste en síndrome mielodisplásico (SMD); enfermedades mieloproliferativas tales como policitemia vera, trombocitosis esencial (TE), mielofibrosis; y enfermedades con características tanto de síndromes mielodisplásicos como de enfermedades mieloproliferativas tales como leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), leucemia mielóide crónica atípica (LMCa), enfermedad mielodisplásica/mieloproliferativa y leucemia mielógena aguda (LMA).
7. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el polinucleótido es un ARN mensajero (ARNm).
8. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el polinucleótido se inserta en un vector.
9. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el polinucleótido se conjuga con al menos otra molécula seleccionada del grupo que consiste en polinucleótidos, polipéptidos, lípidos, lectinas, hidratos de carbono, vitaminas, cofactores y fármacos.
10. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso según la reivindicación 9, en la que el polipéptido se conjuga con una molécula que tiene una afinidad específica por células hematopoyéticas, tal como anticuerpos o péptidos que tienen una afinidad de unión por una proteína expresada en la superficie de una célula madre hematopoyética.
11. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el polinucleótido se formula con lipídeos.

12. Cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1 en la que el residuo amino (G) en la posición 12 se sustituye por un residuo de aminoácido (R) para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el polinucleótido se formula usando uno o más liposomas, lipoplejos o nanopartículas lipídicas.

5



Figuras 1A y 1B



Figuras 1C y 1D

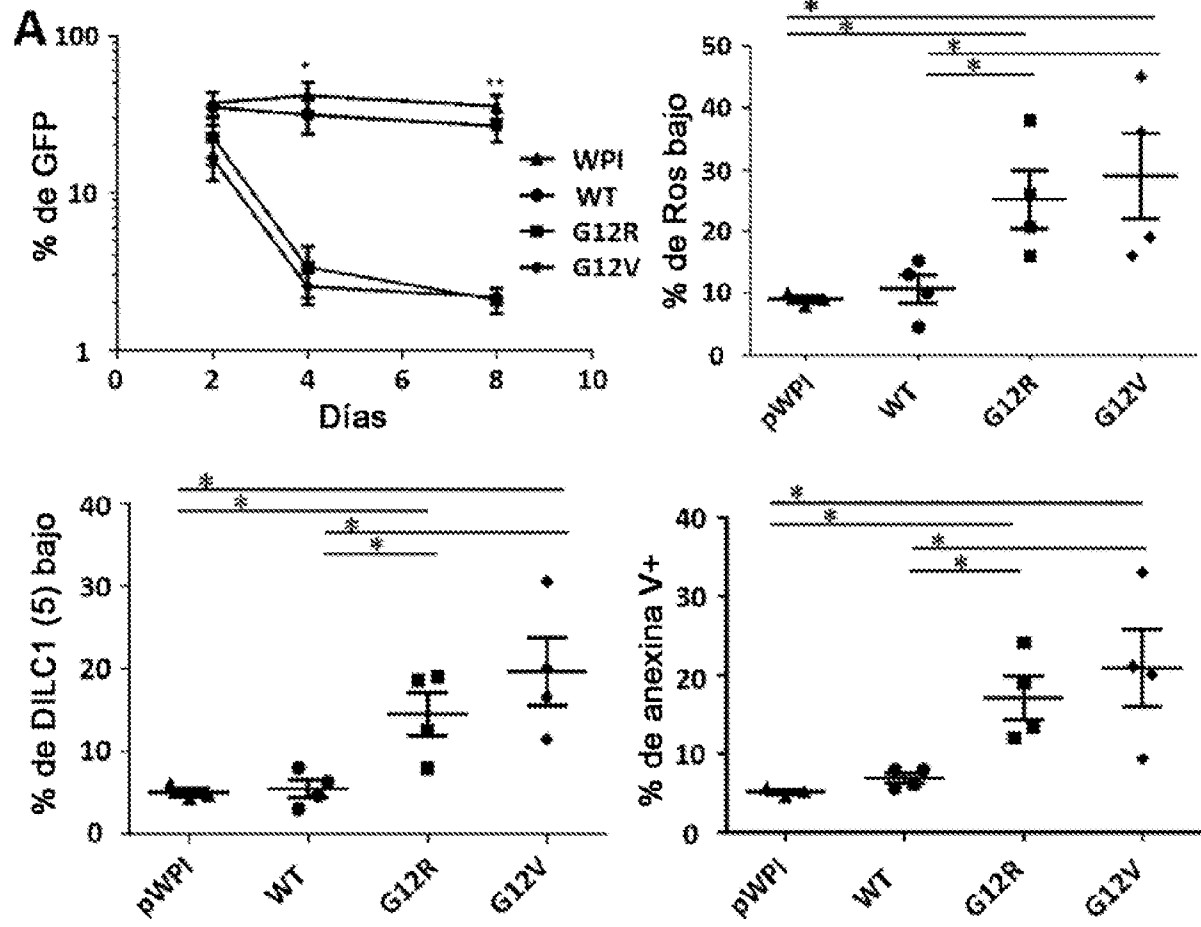
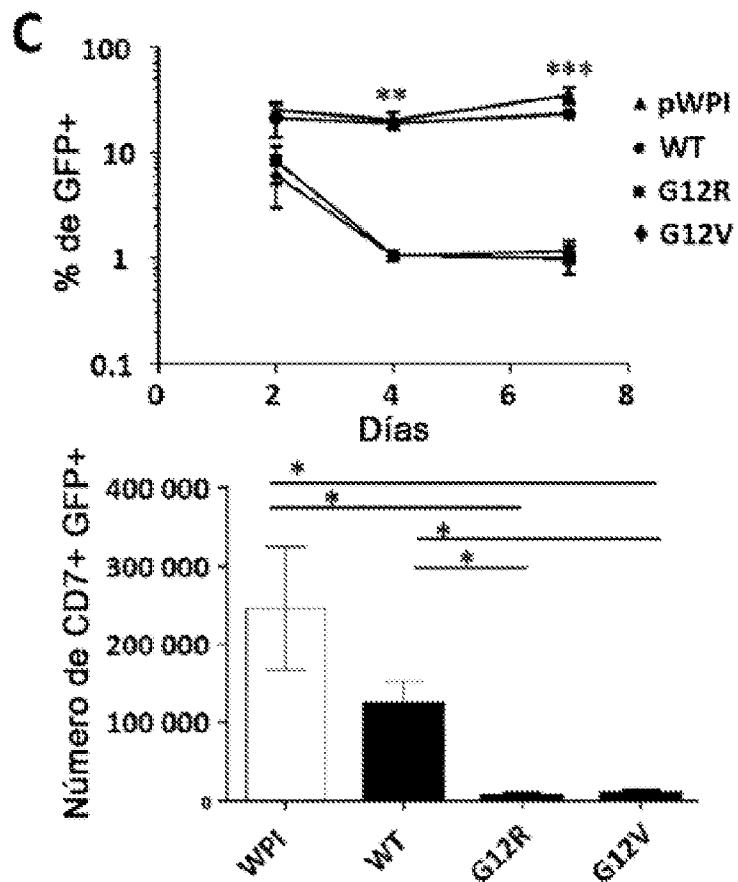
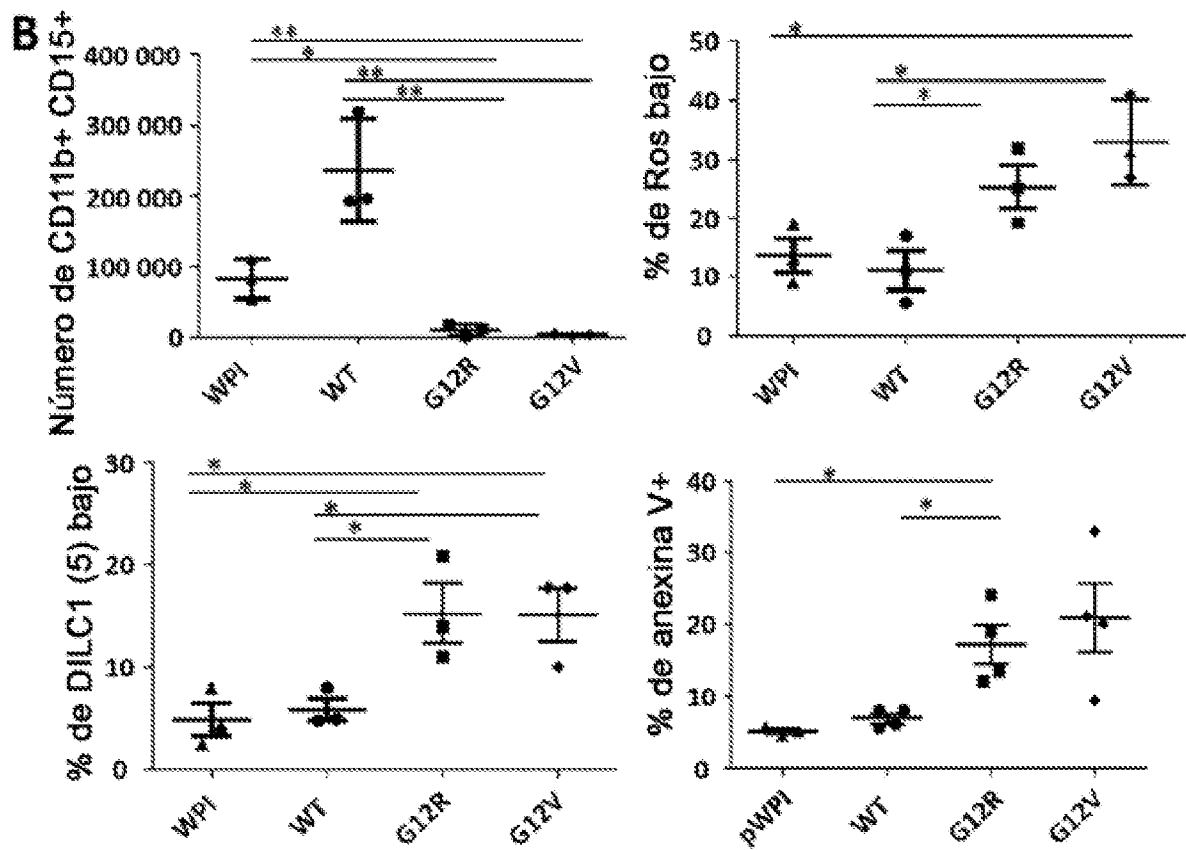


Figura 2A



Figuras 2B y 2C

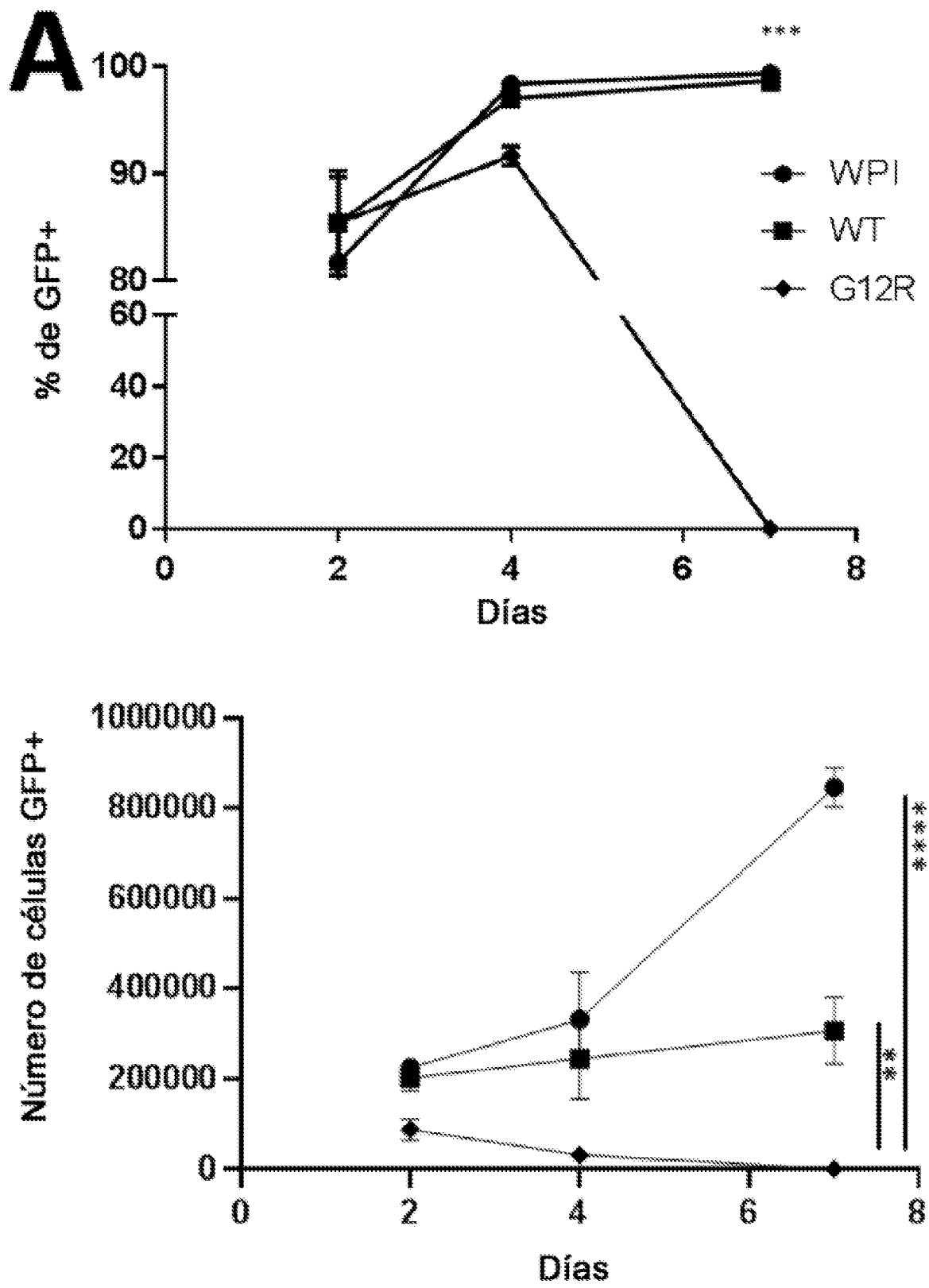


Figura 3A

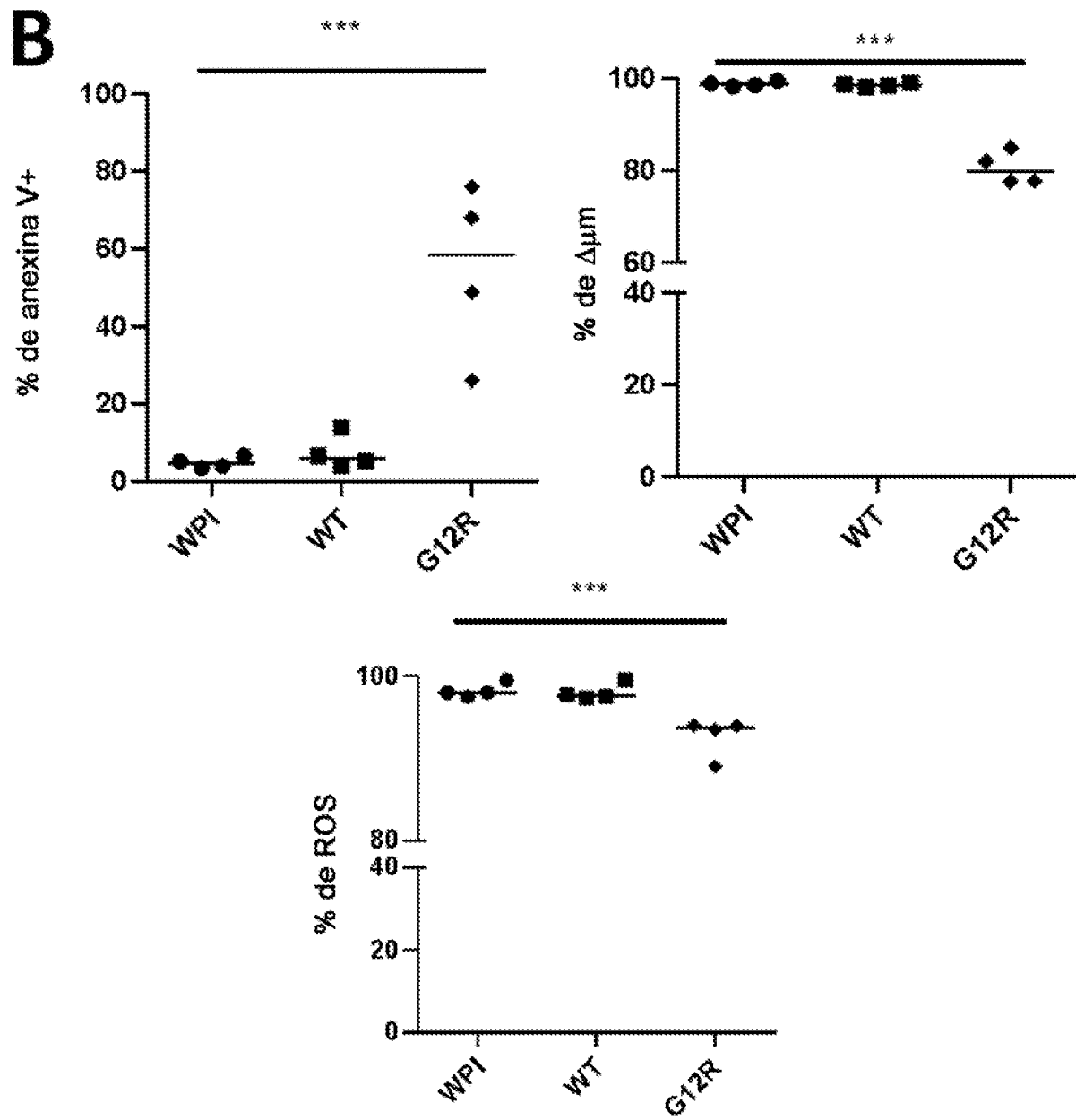


Figura 3B

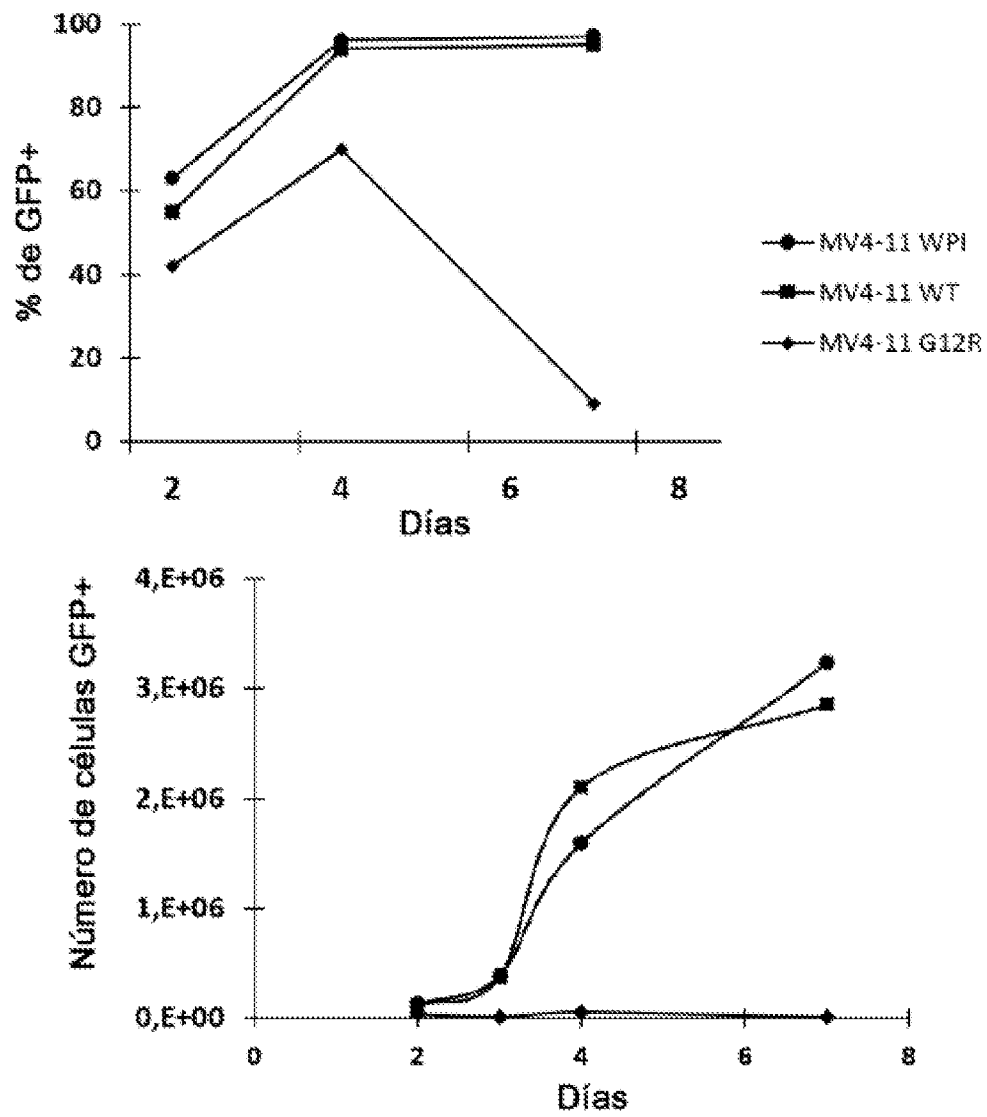


Figura 4

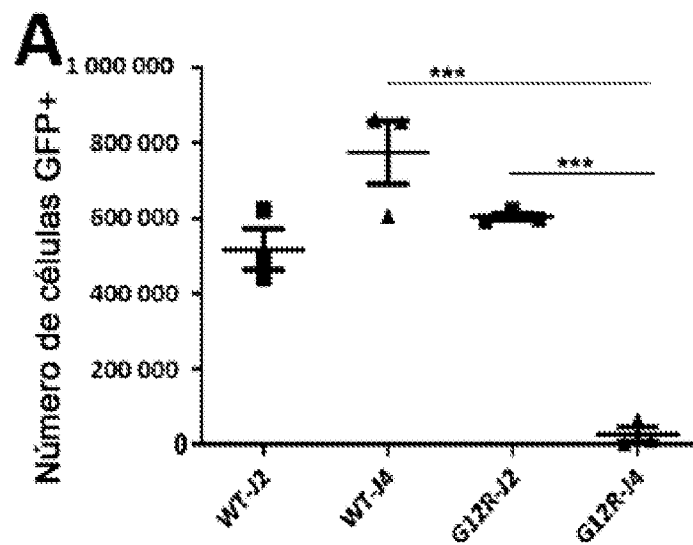
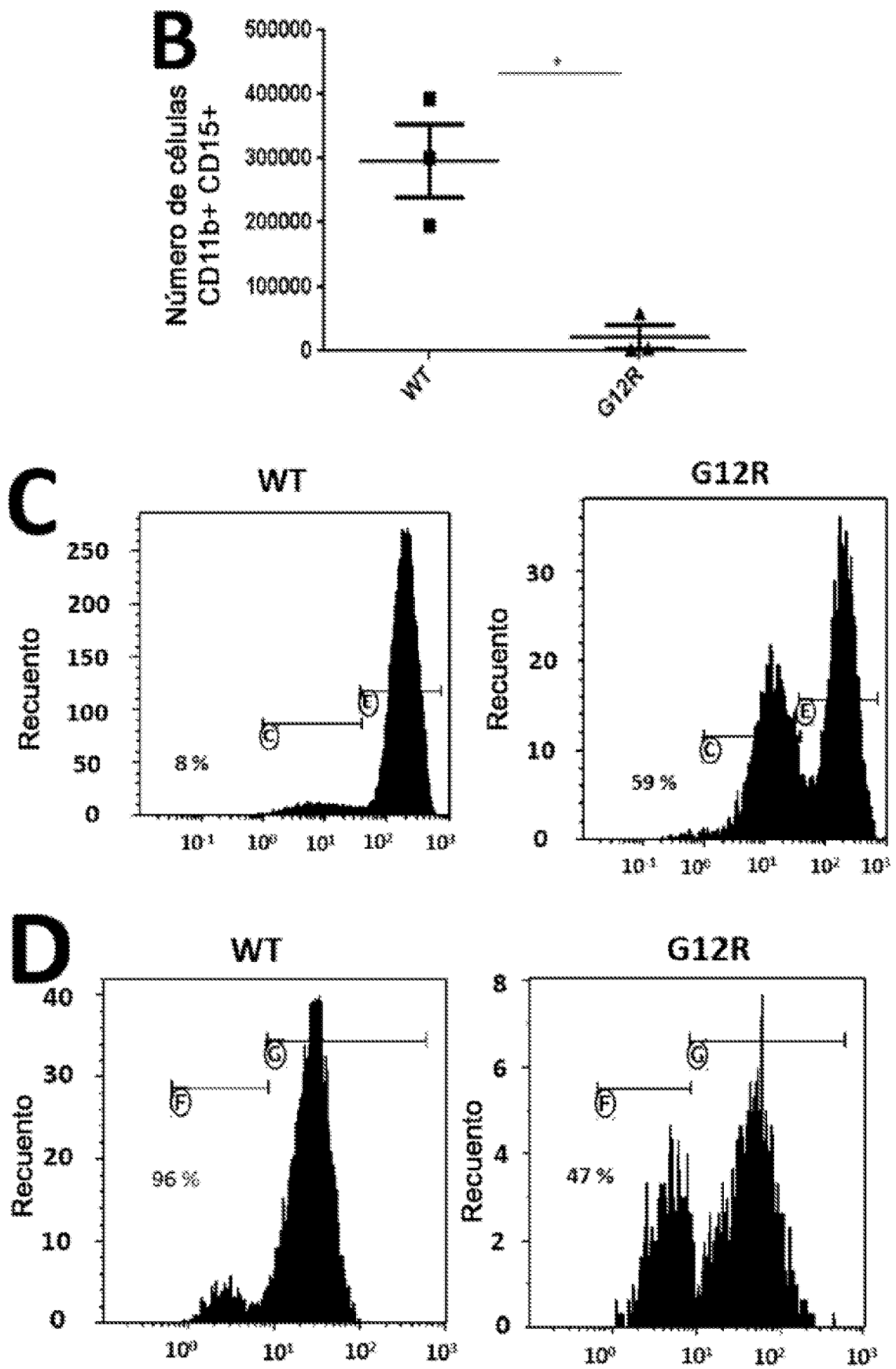
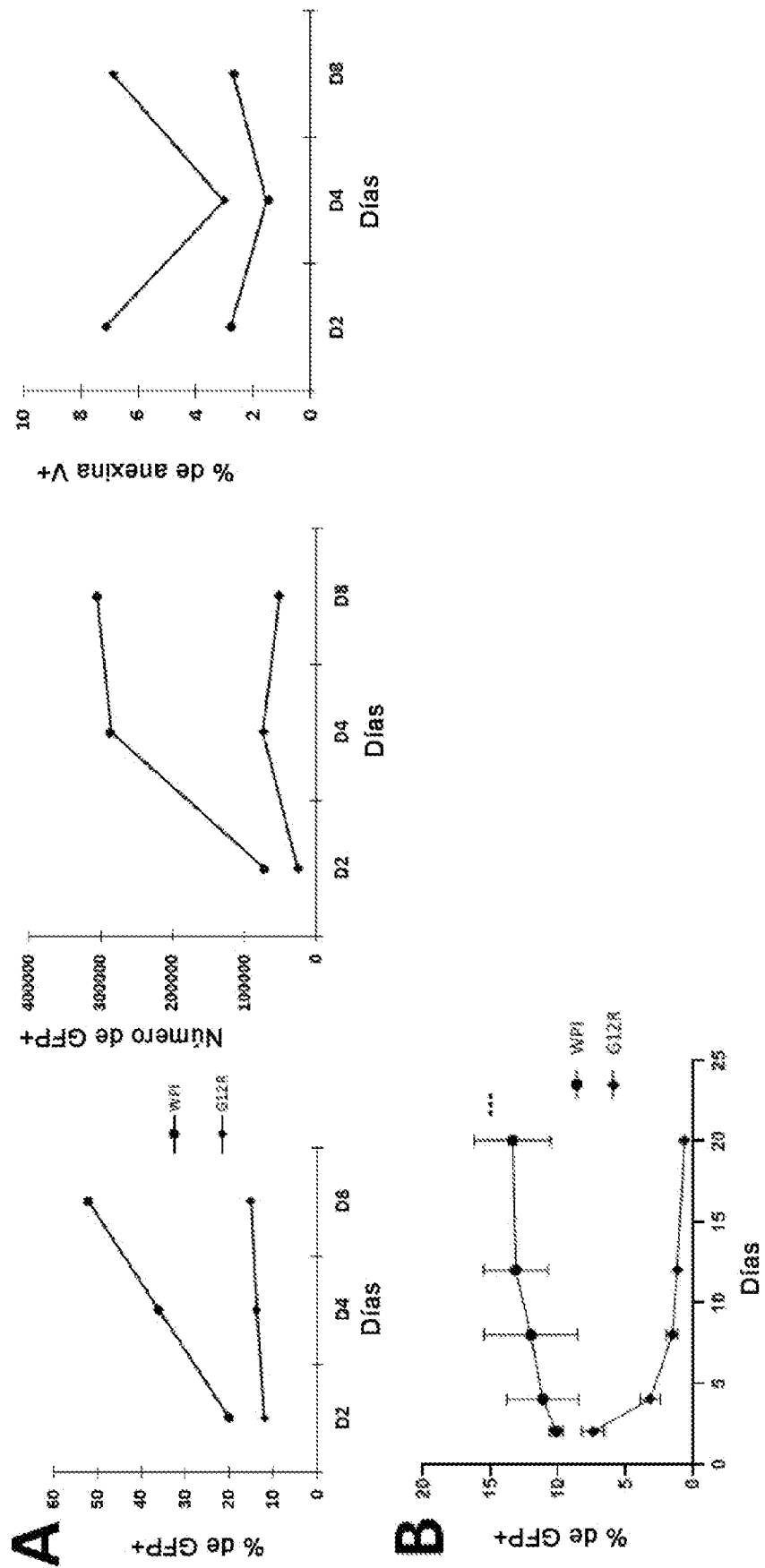


Figura 5A



Figuras 5B-D



Figuras 6A y 6B