

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 553**

51 Int. Cl.:

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2016** **PCT/EP2016/080187**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017** **WO17097876**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2016** **E 16808635 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022** **EP 3387115**

54 Título: **Métodos para expandir una población de macrófagos alveolares en un cultivo de larga duración**

30 Prioridad:

08.12.2015 EP 15306959

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2022

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%)

72 Inventor/es:

SIEWEKE, MICHAEL;
MOLAWI, KAAWEH y
GEIRSDOTTIR, LAUFEY

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 908 553 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 expandir una población de macrófagos alveolares en un cultivo de larga duración

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a métodos para expandir una población de macrófagos alveolares en un cultivo de larga duración.

10 **Antecedentes**

En muchos tejidos del cuerpo, las células diferenciadas se reemplazan con frecuencia como parte del mantenimiento homeostático o en respuesta a una lesión. Mientras que en la mayoría de los casos esto depende de las células madre específicas de tejido, los macrófagos tisulares pueden mantenerse mediante proliferación local independientemente de las células madre hematopoyéticas (1-4), posiblemente mediante mecanismos de autorrenovación activados en macrófagos maduros (5). A diferencia de los pocos ejemplos de células normales diferenciadas que pueden reingresar de manera transitoria al ciclo celular, tales como los hepatocitos, los macrófagos también pueden expandirse y mantenerse en cultivo de larga duración sin transformación o pérdida de diferenciación. Esto se ha observado en macrófagos con deleciones de dos factores de transcripción de macrófagos principales (6), MafB y c-Maf (macrófagos Maf-DKO) (7), o en cultivos derivados de progenitores fetales (8).

Lin HS. *et al.* dan a conocer los efectos de GM-CSF sobre el crecimiento, la supervivencia y la formación de colonias de macrófagos alveolares durante varios días (14 días) (Lin, H. S., Balakrishna L. Lokeshwar y S. H. I. N. Hsu. "Both granulocyte-macrophage CSF and macrophage CSF control the proliferation and survival of the same subset of alveolar macrophages". The Journal of Immunology 142.2 (1989): 515-519).

Nakata, Koh, *et al.* dan a conocer el cultivo de macrófagos alveolares humanos en medio complementado con GM-CSF durante varios días (Nakata, Koh, *et al.* "Growth inhibitory factor of human alveolar macrophage". Biochemical and biophysical research communications 180.3 (1991): 1207-1213).

Careau E. *et al.* dan a conocer el uso de macrófagos alveolares en la modulación de trastornos inflamatorios del pulmón (Careau, Eric y Elyse Y. Bissonnette. "Adoptive transfer of alveolar macrophages abrogates bronchial hyperresponsiveness". American journal of respiratory cell and molecular biology 31.1 (2004): 22-27).

Al-Hallak, Kamal MHD, *et al.* dan a conocer el uso de macrófagos alveolares en la terapia contra el cáncer de pulmón (Al-Hallak, Kamal MHD, *et al.* "Secondary cytotoxicity mediated by alveolar macrophages: a contribution to the total efficacy of nanoparticles in lung cancer therapy?". European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 76.1 (2010): 112-119).

El documento EP1547615 da a conocer el uso de macrófagos alveolares como agente terapéutico para el cáncer de pulmón.

Sumario de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un método de expansión de una población de macrófagos alveolares en un cultivo líquido de larga duración, que comprende cultivar durante al menos 100 días la población de macrófagos alveolares en un medio de cultivo complementado con una cantidad de GM-CSF.

Descripción detallada

Un objeto de la presente divulgación se refiere a un método de expansión de una población de macrófagos alveolares en un cultivo de larga duración, que comprende cultivar la población de macrófagos alveolares en un medio de cultivo complementado con una cantidad de GM-CSF.

Tal como se usa en el presente documento, el término "macrófago alveolar" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un subconjunto específico de macrófagos que está presente en los alvéolos pulmonares de un mamífero. Normalmente, el mamífero se selecciona del grupo que consiste en roedores (por ejemplo, ratones o ratas), perros, cerdos, gatos, caballos, vacas, ovejas, camélidos o primates y seres humanos. Los métodos para obtener una población de macrófagos alveolares a partir de un mamífero son convencionales e incluyen normalmente lavado bronquial. Según la presente divulgación, los macrófagos alveolares se autorrenuevan. Tal como se usa en el presente documento, el término "autorrenovación" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la capacidad de los macrófagos alveolares de experimentar numerosos ciclos de división celular dando lugar a más macrófagos alveolares del mismo fenotipo celular diferenciado o uno muy similar. Normalmente, los macrófagos alveolares que se autorrenuevan mantienen su capacidad para dividirse durante

una cantidad ilimitada o un periodo prolongado de tiempo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “expansión” tiene su significado general en la técnica y se refiere a una multiplicación de células, dando como resultado de ese modo un aumento en el número total de macrófagos alveolares. Por ejemplo, los macrófagos alveolares pueden expandirse al menos 100 veces su número original, tal como al menos 1.000 veces su número original, preferiblemente al menos 10.000 veces su número original, tal como al menos 100.000 veces su número original, etc.

Por tanto, según la presente divulgación, el método de la presente divulgación, por tanto, no sólo permite la expansión de los macrófagos alveolares sino que también permite que los macrófagos alveolares mantengan su fenotipo a largo plazo. Tal fenotipo incluye, sin limitarse a, la función biológica o/y el perfil de expresión de marcadores específicos. Los ejemplos no limitativos de las funciones biológicas incluyen su función como fagocitos, la capacidad de destruir microorganismos, la capacidad de producir mediadores inflamatorios tales como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y mediadores inmunológicos tales como interferones y regular por incremento la expresión de marcadores de superficie (CD69, CD14) importantes en la activación de las células inmunitarias innatas en respuesta a una estimulación. El perfil de expresión de marcadores específicos incluye la presencia de, por ejemplo, el receptor de GM-CSF, receptor de M-CSF, CD11c, TLR, F4/80, CD16, CD11b, CD14 y/o la falta de expresión de CMH-II, B220, Gr1, receptor de IgE, receptor de células T y/o receptor de células B, tal como se define a continuación en el presente documento.

Normalmente, el medio de cultivo de la presente divulgación corresponde a cualquier medio de cultivo que es convencional para cultivar la población de macrófagos alveolares de la presente divulgación. Por ejemplo, el medio de cultivo puede ser un medio seleccionado del grupo que consiste en RPMI 1640, el de Iscove, F12, OPTI-MEM, DMEM, etc. En particular, el medio se complementa con suero, incluyendo el suero humano o no humano. El suero tal como, por ejemplo, FCS puede obtenerse de, por ejemplo, GIBCO, Sigma o PAA. Según la presente divulgación, el medio de cultivo se complementa de ese modo con una cantidad de GM-CSF. Tal como se usa en el presente documento, el término “GM-CSF” tiene su significado general en la técnica y se refiere al factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. El GM-CSF es una citocina que actúa como factor de crecimiento para los leucocitos. Una secuencia de aminoácidos humana a modo de ejemplo está representada por la entrada de la base de datos GenBank AAA52578.1. Normalmente, el GM-CSF se produce de manera recombinante y hay diversas fuentes comerciales disponibles. El método dado a conocer en el presente documento se lleva a cabo en condiciones de cultivo celular adecuadas. En la técnica se conocen bien las condiciones generales de cultivo celular, así como los medios de cultivo celular adecuados. Normalmente, las condiciones de cultivo celular comprenden condiciones de aproximadamente el 2 al 10% de CO₂, preferiblemente de aproximadamente el 5% de CO₂, y una temperatura de aproximadamente 32 a 38°C, normalmente de aproximadamente 37°C.

La población de macrófagos alveolares tal como se prepara mediante el método de la presente divulgación puede encontrar diversas aplicaciones. En particular, la población de macrófagos alveolares puede usarse para el tratamiento de diversas enfermedades. Para la aplicación terapéutica, el experto en la técnica podría imaginar que el método de la presente divulgación es adecuado para preparar grandes cantidades de macrófagos alveolares obtenidos de un paciente que pueden volver a administrarse al paciente para el tratamiento de una enfermedad. En ese caso, el trasplante es autólogo. Sin embargo, en particular, el trasplante también puede ser no autólogo. Para el trasplante no autólogo, se examinará al receptor en busca de una coincidencia máxima del haplotipo de CMH y/o se le administrará preferiblemente un inmunodepresor para reducir el riesgo de rechazo de la célula trasplantada. Los métodos de administración de la población de macrófagos alveolares dada a conocer en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, intrapulmonar, intratraqueal y epidural. En particular, la población de macrófagos alveolares se administra en el aparato respiratorio del paciente (por ejemplo, mediante lavado). Por tanto, la población de macrófagos alveolares de la presente divulgación es adecuada para la terapia de trasplante de macrófagos pulmonares. Las células pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. El título de las células trasplantadas que será eficaz en el tratamiento de una enfermedad o un estado particular dependerá de la naturaleza del trastorno o estado y puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o el trastorno, y deberá decidirse según el criterio del facultativo y las circunstancias de cada sujeto.

Por tanto, el método de la presente divulgación es particularmente adecuado para preparar una composición farmacéutica que comprende grandes cantidades de macrófagos alveolares. En particular, el método de la presente divulgación es particularmente adecuado para preparar una composición farmacéutica que comprende al menos 1×10^9 - 1×10^{12} de macrófagos alveolares. En particular, la composición farmacéutica comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ó 1 billón de macrófagos alveolares. En particular, los métodos dados a conocer en el presente documento proporcionan una población sustancialmente homogénea de macrófagos alveolares funcionalmente diferenciados. El término “población sustancialmente homogénea”, tal como se usa en el presente documento, se

- refiere a una población de células en la que la mayoría (por ejemplo, al menos aproximadamente el 80%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%) del número total de células tienen las características específicas de los macrófagos alveolares completamente diferenciados. Normalmente, la composición farmacéutica comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, el término "portador o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio portador que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de las células somáticas funcionalmente diferenciadas dadas a conocer en el presente documento, y que no es excesivamente tóxico para el huésped en las concentraciones a las que se administra. Los ejemplos de portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina (por ejemplo, solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas, hidratos de carbono (por ejemplo, lactosa, amilasa o almidón), ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolina. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como líquidos, semilíquidos (por ejemplo, geles) o sólidos (por ejemplo, matrices, redes cristalinas, andamiajes, y similares).
- En particular, la población de macrófagos alveolares tal como se prepara mediante el método de la presente divulgación es particularmente adecuada para el tratamiento de cáncer. Tal como se usa en el presente documento, el término "cáncer" tiene su significado general en la técnica e incluye, pero no se limita a, tumores sólidos y tumores de transmisión hemática. El término cáncer incluye enfermedades de la piel, los tejidos, los órganos, el hueso, el cartílago, la sangre y los vasos. El término "cáncer" abarca además tanto cánceres primarios como metastásicos. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse mediante los métodos y las composiciones dados a conocer en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas de vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, gastrointestinales, encía, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículo, lengua o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente uno de los siguientes tipos histológicos, aunque no se limita a estos: neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma, indiferenciado; carcinoma gigantocelular y fusocelular; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma epidermoide; carcinoma linfoepitelial; carcinoma basocelular; carcinoma pilomatricial; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma quístico adenoides; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis cólica hereditaria; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma bronquioloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma adrenocortical; carcinoma endometrioide; carcinoma de anejos cutáneos; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; ceruminoso; adenocarcinoma; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma papilar seroso; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma canalicular infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobulillar; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor estromal de ovario, maligno; tecoma, maligno; tumor de células de la granulosa, maligno; y roblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de célula epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario; rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto de Müller; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filóide, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; bocio ovárico, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendoteloma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor gigantocelular de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontógeno, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; tumor neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurógeno olfativo; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico de células pequeñas; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfocítica; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfoma; leucemia mielógena; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mielógeno; y tricoleucemia.
- En particular, la población de macrófagos alveolares tal como se prepara mediante el método de la presente divulgación es particularmente adecuada para el tratamiento de una enfermedad infecciosa. Tal como se usa en

el presente documento, el término “enfermedad infecciosa” incluye cualquier infección provocada por virus, bacterias, protozoos, mohos u hongos. En particular, la infección viral comprende infección por uno o más virus seleccionados del grupo que consiste en los virus *Arenaviridae*, *Astroviridae*, *Birnaviridae*, *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*, *Closteroviridae*, *Comoviridae*, *Cystoviridae*, *Flaviviridae*, *Flexiviridae*, *Hepevirus*, *Leviviridae*, *Luteoviridae*, *Mononegavirales*, virus del mosaico, *Nidovirales*, *Nodaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Picobirnavirus*, *Picornaviridae*, *Potyviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Sequiviridae*, *Tenuivirus*, *Togaviridae*, *Tombusviridae*, *Totiviridae*, *Tymoviridae*, *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae*, *Paramyxoviridae* o *Papillomaviridae*. Las familias taxonómicas relevantes de virus ARN incluyen, sin limitación, los virus *Astroviridae*, *Birnaviridae*, *Bromoviridae*, *Caliciviridae*, *Closteroviridae*, *Comoviridae*, *Cystoviridae*, *Flaviviridae*, *Flexiviridae*, *Hepevirus*, *Leviviridae*, *Luteoviridae*, *Mononegavirales*, virus del mosaico, *Nidovirales*, *Nodaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Picobirnavirus*, *Picornaviridae*, *Potyviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Sequiviridae*, *Tenuivirus*, *Togaviridae*, *Tombusviridae*, *Totiviridae* y *Tymoviridae*. En particular, la infección viral comprende infección por uno o más virus seleccionados del grupo que consiste en adenovirus, rinovirus, hepatitis, virus de la inmunodeficiencia, poliomieltis, sarampión, Ébola, Cocksackie, rinovirus, Nilo Occidental, viruela, encefalitis, fiebre amarilla, dengue, gripe (incluyendo humana, aviar y porcina), Lassa, coriomeningitis linfocítica, Junin, Machupo, Guanarito, hantavirus, fiebre del Valle del Rift, La Crosse, encefalitis californiana, Crimea y el Congo, Marburgo, encefalitis japonesa, selva de Kyasanur, encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental, síndrome respiratorio agudo grave (SRAG), paragripal, respiratorio sincicial, Punta Toro, Tacaribe, virus *Pachindae*, adenovirus, dengue, gripe A y gripe B (incluyendo humana, aviar y porcina), Junin, sarampión, paragripal, Pichindé, Punta Toro, respiratorio sincicial, rinovirus, fiebre del Valle del Rift, síndrome respiratorio agudo grave (SRAG), Tacaribe, encefalitis equina venezolana, virus del Nilo Occidental y de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de St. Louis, virus del Valle del Murray, virus Powassan, virus Rocio, virus de la encefalomieltis ovina, virus Banzi, virus Ilheus, virus Kokobera, virus Kunjin, virus Alfuy, virus de la diarrea bovina y enfermedad de la selva de Kyasanur. Las infecciones bacterianas que pueden tratarse según la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, infecciones provocadas por las siguientes: *Staphylococcus*; *Streptococcus*, incluyendo *S. pyogenes*; *Enterococci*; *Bacillus*, incluyendo *Bacillus anthracis* y *Lactobacillus*; *Listeria*; *Corynebacterium diphtheriae*; *Gardnerella* incluyendo *G. vaginalis*; *Nocardia*; *Streptomyces*; *Thermoactinomyces vulgaris*; *Treponema*; *Campylobacter*; *Pseudomonas* incluyendo *aeruginosa*; *Legionella*; *Neisseria* incluyendo *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*; *Flavobacterium* incluyendo *F. meningosepticum* y *F. odoratum*; *Brucella*; *Bordetella* incluyendo *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*; *Escherichia* incluyendo *E. coli*, *Klebsiella*; *Enterobacter*, *Serratia* incluyendo *S. marcescens* y *S. liquefaciens*; *Edwardsiella*; *Proteus* incluyendo *P. mirabilis* y *P. vulgaris*; *Streptobacillus*; *Rickettsiaceae* incluyendo *R. fickettsii*, *Chlamydia* incluyendo *C. psittaci* y *C. trachomatis*; *Mycobacterium* incluyendo *M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. laprae*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. intracellulare* y *M. lepraemurium*; y *Nocardia*. Las infecciones por protozoos que pueden tratarse según la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, infecciones provocadas por leishmania, kokidioa y trypanosoma. Una lista completa de enfermedades infecciosas puede encontrarse en la página web del Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas (NCID) en el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) (web (www) en cdc.gov/ncidod/diseases/). Todas de dichas enfermedades son candidatas para el tratamiento usando las composiciones dadas a conocer en el presente documento.

En particular, la población de macrófagos alveolares tal como se prepara mediante el método de la presente divulgación es particularmente adecuada para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria e inflamatoria. Las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias pueden ser una o más seleccionadas del grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, artritis aguda, artritis reumatoide crónica, artritis gotosa, artritis gotosa aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, artritis vertebral y artritis reumatoide de comienzo juvenil, artrosis, artritis crónica progresiva, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva y espondilitis anquilosante, enfermedades cutáneas hiperproliferativas inflamatorias, psoriasis tal como psoriasis en placas, psoriasis en gotas, psoriasis pustulosa y psoriasis ungueal, dermatitis incluyendo dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis herpetiforme y dermatitis atópica, síndrome de hiper-IgM ligado al cromosoma X, urticaria tal como urticaria alérgica crónica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria autoinmunitaria crónica, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia, esclerodermia sistémica, esclerosis, esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM), EM mielo-óptica, EM primaria progresiva (EMPP), EM remitente recidivante (EMRR), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada y esclerosis atáxica, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrosante, colitis transparietal, enfermedad inflamatoria autoinmunitaria del intestino, piodermia gangrenosa, eritema nudoso, colangitis esclerosante primaria, episcleritis, síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), meningitis, inflamación de la totalidad o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hemático autoinmunitario, espondilitis reumatoide, pérdida auditiva repentina, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxis y rinitis alérgica y atópica, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, encefalitis límbica y/o del tronco encefálico, uveítis, uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis faecoantigénica, uveítis posterior, uveítis autoinmunitaria, glomerulonefritis (GN), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN membranoproliferativa o proliferativa membranosa (GNMP), GN rápidamente progresiva, estados alérgicos,

miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión leucocitaria, lupus eritematoso sistémico (LES) tal como LES cutáneo, lupus eritematoso cutáneo subagudo, síndrome lúpico neonatal (NLE), lupus eritematoso diseminado, lupus (incluyendo nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, extrarrenal, discoide, alopecia), diabetes mellitus de comienzo juvenil (tipo I), incluyendo diabetes mellitus pediátrica insulino dependiente (DMID), diabetes mellitus de comienzo en la adultez (diabetes de tipo II), diabetes autoinmunitaria, diabetes insípida idiopática, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis, granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis, incluyendo vasculitis, vasculitis de vasos grandes, polimialgia reumática, arteritis (de Takayasu) gigantocelular, vasculitis de vasos medios, enfermedad de Kawasaki, poliarteritis nudosa, poliarteritis microscópica, vasculitis del SNC, necrosante, cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis necrosante sistémica y vasculitis asociada a ANCA, tal como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (SCS), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmunitaria, anemia positiva para Coombs, anemia de Diamond-Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AHA), anemia perniciosa, enfermedad de Addison, anemia o aplasia pura de la serie roja (APSR), deficiencia de factor VIII, hemofilia A, neutrocitopenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucocitopenia, enfermedades que implican diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión multiorgánica tal como los secundarios de septicemia, traumatismo o hemorragia, enfermedades mediadas por un complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome antifosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet o Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, pénfigoide tal como pénfigoide ampolloso y cutáneo, pénfigo, opcionalmente pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo y pénfigoide mucomembranoso, pénfigo eritematoso, poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad o síndrome de Reiter, nefritis por inmunocomplejos, nefritis mediada por anticuerpos, neuromielitis óptica, polineuropatías, neuropatía crónica, polineuropatías por IgM, neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), orquitis y ooforitis autoinmunitarias, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto); tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Graves, síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes poliglandulares de endocrinopatías), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome del hombre rígido o de la persona rígida, encefalomiелitis, encefalomiелitis alérgica, encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia grave, miastenia grave asociada a timoma, degeneración cerebelosa, neuromiotonía, opsoclonía o síndrome de opsoclonía-mioclónia (SOM) y neuropatía sensitiva, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis gigantocelular, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfocítica, bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), nefropatía por IgA idiopática, dermatosis por IgA lineal, cirrosis biliar primaria, neumonocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, celiaquía, enfermedad celíaca, esprúe celíaco (enteropatía por gluten), esprúe refractario, esprúe idiopático, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), arteriopatía coronaria, enfermedad autoinmunitaria del oído tal como enfermedad autoinmunitaria del oído interno (EAOI), pérdida auditiva autoinmunitaria, síndrome de opsoclonía-mioclónia (SOM), policondritis tal como policondritis refractaria o recidivante, proteinosis alveolar pulmonar, amiloidosis, escleritis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria, incluyendo linfocitosis monoclonal de células B, opcionalmente gammapatía monoclonal benigna o gammapatía monoclonal de importancia indeterminada, MGUS, neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis, trastorno hepatológico autoinmunitario, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes tales como enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias, nefropatía diabética, síndrome de Dressler, alopecia areata, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, disfunción esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto de repetición, neumopatía de los campesinos, eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, neumopatía de los avicultores, angitis granulomatosa alérgica, angitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis tal como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacción transfusional, lepra, malaria, leishmaniosis, tripanosomiasis, esquistosomiasis, ascariosis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmía, eritema elevado persistente o diutino, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariosis, ciclitis tales como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis o ciclitis de Fuchs, púrpura de Henoch-Schönlein, infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), infección por ecovirus, miocardiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección por el virus de la rubéola, síndromes posvacunación, infección por rubéola congénita, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, insuficiencia gonadal autoinmunitaria, corea de Sydenham, nefritis postestreptocócica, tromboangitis obliterante, hipertiroidismo, tabes dorsal, coroiditis, polimialgia gigantocelular, oftalmopatía endocrina, neumonitis por hipersensibilidad crónica, queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico

idiopático, nefropatía por cambios mínimos, lesión por isquemia-reperfusión y hereditaria benigna, autoinmunidad retiniana, artritis, bronquitis, enfermedad de las vías respiratorias obstructiva crónica, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioscleróticos, espermatogénesis, hemólisis autoinmunitaria, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmía facoanaléctica, enteritis alérgica, eritema leproso nudoso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida auditiva sensorineural, hemoglobinuria paroxística, hipogonadismo, ileítis regional, leucocitopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversal, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmía simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, pioderma gangrenoso, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, infertilidad debida a anticuerpos antiespermatozoides, timoma no maligno, vitíligo, enfermedades asociadas a IDCG y el virus de Epstein-Barr, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), parasitosis tales como leishmania, síndrome del choque tóxico, intoxicación alimentaria, estados que implican la infiltración de células T, deficiencia de adhesión leucocitaria, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapedesis leucocitaria, síndrome de lesión multiorgánica, enfermedades mediadas por un complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías autoinmunitarias, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmunitaria, oftalmía simpática, enfermedades reumáticas, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, síndrome nefrótico, insulinitis, insuficiencia poliendocrina, neuropatía periférica, síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de comienzo en la adultez (AOIH), alopecia total, miocardiopatía congestiva, epidermolisis ampollosa adquirida (EAA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoidal, frontal, maxilar o esfenoidal, un trastorno relacionado con eosinófilos tal como eosinofilia, eosinofilia de infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Löfller, neumonía eosinofílica crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis, aspergiloma o granulomas bronconeumónicos que contienen eosinófilos, anafilaxis, espondiloartritis seronegativas, enfermedad autoinmunitaria poliendocrina, colangitis esclerosante, candidiasis de la esclerótica, epiesclerótica, mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia telangiectasia, trastornos autoinmunitarios asociados con la enfermedad del tejido conjuntivo, reuma, enfermedad neurológica, trastorno por isquemia-reperfusión, reducción en la respuesta a la tensión arterial, disfunción vascular, angiectasia, lesión tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgia, isquemia cerebral y enfermedad que acompaña a la vascularización, trastornos por hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión por reperfusión, lesión por reperfusión de tejidos miocárdicos u otros tejidos, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitarios, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citocinas, inflamación grave aguda, inflamación crónica resistente al tratamiento, pielitis, neumonocirrosis, retinopatía diabética, trastorno diabético de arterias de gran tamaño, hiperplasia endoarterial, úlcera péptica, vulvitis y endometriosis.

En particular, la población de macrófagos alveolares tal como se prepara mediante el método de la presente divulgación es particularmente adecuada para el tratamiento de proteinosis alveolar pulmonar (PAP).

Tal como se usa en el presente documento, el término "proteinosis alveolar pulmonar" o "PAP" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una enfermedad pulmonar en la que se produce una acumulación anómala de tensioactivo pulmonar dentro de los alvéolos, lo que interfiere con el intercambio de gases. La PAP congénita está provocada por mutaciones de los genes que codifican para GM-CSF-R *Csf2ra* o *Csf2rb* o el gen que codifica para GM-CSF *csf2*, mientras que la forma adquirida más frecuente de la enfermedad está provocada por autoanticuerpos contra GM-CSF (Trapnell, B.C. *et al.*, Pulmonary alveolar proteinosis, a primary immunodeficiency of impaired GM-CSF stimulation of macrophages. *Curr Opin Immunol* 21, 514-521 (2009)).

En particular, la población de macrófagos alveolares tal como se prepara mediante el método de la presente divulgación es particularmente adecuada para el tratamiento de una enfermedad degenerativa o para estimular la regeneración de tejido dañado. De hecho, el sistema de fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos) representa un órgano distribuido responsable de la homeostasis dentro del huésped. Dicho sistema está implicado en cada proceso de la enfermedad en el que existe una lesión tisular persistente o una metabolopatía. Por tanto, los macrófagos median tanto en la inflamación aguda como en la crónica y fomentan la reparación a través de la eliminación de células muertas y fibrina por fagocitosis y fibrinólisis, inducen el crecimiento infiltrante de vasos sanguíneos (angiogénesis) y modulan la invasión de fibroblastos y la producción de matriz extracelular. Producen mediadores que movilizan las respuestas sistémicas del huésped, incluyendo la fiebre, liberan y catabolizan las hormonas del estrés y otras hormonas, aumentan la actividad metabólica de otras células e influyen en la circulación sanguínea a los tejidos y en la permeabilidad capilar. Los propios macrófagos muestran una considerable heterogeneidad en sus funciones, a menudo expresando tanto activadores como inhibidores de una propiedad, por ejemplo, actividad proteolítica, o producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, dependiendo de la evolución de una respuesta particular del huésped. Además, los macrófagos pueden inhibir la apoptosis de las células precursoras en un contacto de célula a célula y pueden servir como soporte estromal para la incorporación eficaz del injerto celular para la reparación tisular (véase, por ejemplo, el documento WO2005014016). En particular, los macrófagos podrían inhibir la apoptosis de las células precursoras miogénicas. Por tanto, los métodos para generar macrófagos tal como se describió anteriormente pueden ser útiles para el tratamiento de daños tales como daños óseos o musculares, que resultan posiblemente de una

enfermedad o lesión. Por ejemplo, puede ser una fractura ósea o un desgarro muscular. En particular, dicho daño es un daño o una lesión cardíaca. En particular, puede ser, por ejemplo, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, trombosis coronaria, miocardiopatía congestiva o cualquier disfunción de los cardiomiocitos posterior a, o resultante de, cualquier defecto genético. Por tanto, los métodos para generar macrófagos tal como se describió anteriormente pueden ser útiles para el tratamiento de insuficiencias cardíacas agudas con mal pronóstico a pesar del progreso en los tratamientos, tales como la miocardiopatía infiltrante o la miocardiopatía debida a toxicidad por antraciclinas o la miocardiopatía secundaria a la infección por VIH. Los métodos para generar macrófagos tal como se describió anteriormente también pueden ser útiles para el tratamiento de lesiones de la médula espinal. De hecho, una terapia para la lesión de la médula espinal (LME) completa puede consistir en injertos autólogos de macrófagos que han sido educados para un fenotipo de cicatrización de heridas mediante la incubación conjunta con tejido cutáneo. Los macrófagos también son esenciales para la cicatrización de heridas y, por tanto, los métodos para generar macrófagos tal como se describió anteriormente pueden ser útiles para potenciar la cicatrización de heridas y/o reparar el daño tisular. De hecho, el proceso de cicatrización de heridas tiene 3 fases. Durante la fase inflamatoria, los macrófagos secretan numerosas enzimas y citocinas. Estas incluyen colagenasas, que limpian los residuos de la herida, interleucinas y factor de necrosis tumoral (TNF), que estimulan los fibroblastos (para producir colágeno) y fomentan la angiogénesis; y el factor de crecimiento transformante α (TGF α), que estimula los queratinocitos. Esta etapa marca la transición al proceso de reconstrucción tisular, es decir, la fase proliferativa.

En particular, la población de macrófagos alveolares tal como se prepara mediante el método de la presente divulgación es particularmente adecuada para el tratamiento de enfermedades pulmonares. Por ejemplo, la enfermedad pulmonar se selecciona del grupo que consiste en asma, asbestosis, silicosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (en particular, empeoramiento de la EPOC), dificultad respiratoria neonatal, síndrome de dificultad respiratoria aguda, deficiencias congénitas de proteína B tensioactiva, y asma alérgica. En particular, la población de macrófagos alveolares tal como se prepara mediante el método de la presente divulgación es particularmente adecuada para prevenir el aumento de susceptibilidad de algunos individuos a la exposición microbiana, especialmente en el caso de una inmunidad específica inadecuada o deteriorada. Estos trastornos, así como algunos trastornos asociados con un mayor riesgo de neumonía (fibrosis quística, asma, prematuridad, bronquitis crónica, daño alveolar difuso), también pueden estar asociados con defectos adquiridos o deficiencia en la función de las colectinas. En particular, la enfermedad pulmonar se selecciona del grupo que consiste en fibrosis quística, enfisema, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias y rechazo al trasplante. En particular, la enfermedad pulmonar es una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria e incluye normalmente proteinosis alveolar pulmonar, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial y fibrosis pulmonar idiopática. En particular, la enfermedad pulmonar es una infección pulmonar. En particular, la infección pulmonar es neumonía bacteriana, viral o fúngica. En particular, la enfermedad pulmonar viral se selecciona del grupo que consiste en gripe A, rinovirus, coronavirus, virus respiratorio sincicial (VRS), varicela, parvovirus humano B19, tipos 1-3 del virus paragripal, citomegalovirus, adenovirus, hantavirus y rubéola.

Además, la población de macrófagos alveolares de la presente divulgación se modifica adicionalmente por ingeniería genética de modo que dichas células expresen un ácido nucleico terapéutico de interés, que codifica para una proteína de interés. Los genes de interés adecuados incluyen factores de crecimiento. Por ejemplo, la población de macrófagos alveolares de la presente divulgación puede modificarse por ingeniería genética para producir productos génicos beneficiosos tras el trasplante de las células modificadas por ingeniería genética a un sujeto. Tales productos génicos incluyen, pero no se limitan a, factores antiinflamatorios, por ejemplo, anti-TNF, anti-IL-1, anti-IL-6, anti-IL-2, etc. La población de macrófagos alveolares de la presente divulgación también puede modificarse adicionalmente por ingeniería genética de modo que dichas células corrijan un defecto genético antes del trasplante. Alternativamente, la población de macrófagos alveolares de la presente divulgación puede fusionarse con otras células somáticas funcionalmente diferenciadas para corregir defectos genéticos en la célula diana o para administrar compuestos terapéuticos. De hecho, se ha demostrado que los macrófagos se fusionan con los cardiomiocitos o los hepatocitos y pueden corregir un defecto genético en estas células, tal como se describe en Camargo *et al.*, 2003; Camargo *et al.*, 2004 y Willenbring *et al.*, 2004. Por ejemplo, las células dadas a conocer en el presente documento, tales como los macrófagos, también pueden modificarse por ingeniería, por tanto, para expresar copias múltiples o únicas de variantes normales o hiperactivas de genes que están mutados en trastornos genéticos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, deficiencias de enzimas en el hígado o distrofina en la distrofia muscular de Duchenne.

En particular, la población de macrófagos alveolares dada a conocer en el presente documento se modifica por ingeniería genética con el fin de regular por disminución uno o más genes de interés, tal como el gen MafB que tiene un efecto negativo sobre la proliferación/autorrenovación de los macrófagos.

En particular, la población de macrófagos alveolares dada a conocer en el presente documento se modifica por ingeniería genética con la tecnología "CRISPR/Cas9".

Tal como se usa en el presente documento, el término "CRISPR" tiene su significado general en la técnica y se refiere a asociaciones de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas que son los segmentos de ADN procariota que contienen repeticiones cortas de secuencias de bases. En las bacterias, los

locus de CRISPR/Cas codifican para sistemas inmunitarios adaptativos guiados por ARN contra elementos genéticos móviles (virus, transposones y plásmidos conjugativos). Se han identificado tres tipos (I-III) de sistemas CRISPR. Las agrupaciones de CRISPR contienen espaciadores, las secuencias complementarias a los elementos móviles precedentes. Las agrupaciones de CRISPR se transcriben y procesan para dar ARN maduro de CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas) (ARNcr). La endonucleasa asociada a CRISPR, Cas9, pertenece al sistema CRISPR/Cas de tipo II y tiene una fuerte actividad endonucleasa para cortar el ADN diana. A la Cas9 le guía un ARNcr maduro que contiene aproximadamente 20 pares de bases (pb) de secuencia diana única (denominada espaciador) y un ARN pequeño transactivado (ARNtracr) que sirve como guía para el procesamiento de pre-ARNcr asistido por ribonucleasa III. El dúplex ARNcr:ARNtracr dirige a Cas9 al ADN diana a través del apareamiento de bases complementarias entre el espaciador en el ARNcr y la secuencia complementaria (denominada protoespaciador) en el ADN diana. La Cas9 reconoce un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) de trinucleótido (NGG) para especificar el sitio de corte (el tercer nucleótido a partir de PAM). El ARNcr y el ARNtracr pueden expresarse por separado o modificarse por ingeniería para dar un ARN pequeño guía (ARNpg) de fusión artificial a través de un tallo-bucle sintético para imitar el dúplex natural ARNcr/ARNtracr. Tal ARNpg, como el ARNhc, puede sintetizarse o transcribirse *in vitro* para la transfección directa de ARN o expresarse a partir del vector de expresión de ARN fomentada por U6 o HI, aunque las eficiencias de escisión del ARNpg artificial son más bajas que las de los sistemas con ARNcr y ARNtracr expresados por separado. En particular, la endonucleasa asociada a CRISPR puede ser una nucleasa Cas9. La nucleasa Cas9 puede tener una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de *Streptococcus pyrogenes* de tipo natural. En particular, la endonucleasa asociada a CRISPR puede ser una secuencia de otras especies, por ejemplo, otras especies de *Streptococcus*, tales como *thermophilus*; *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* u otros genomas bacterianos secuenciados y arqueas u otros microorganismos procariotas. Alternativamente, puede modificarse la secuencia de Cas9 de *Streptococcus pyrogenes* de tipo natural. La secuencia de ácido nucleico puede tener codones optimizados para una expresión eficaz en células de mamífero, es decir, "humanizada". Una secuencia de nucleasa Cas9 humanizada puede ser, por ejemplo, la secuencia de nucleasa Cas9 codificada por cualquiera de los vectores de expresión enumerados en los números de registro de Genbank KM099231.1 GL669193757; KM099232.1 GL669193761; o KM099233.1 GL669193765. Alternativamente, la secuencia de la nucleasa Cas9 puede ser, por ejemplo, la secuencia contenida dentro de un vector disponible comercialmente tal como PX330 o PX260 de Addgene (Cambridge, MA). En particular, la endonucleasa Cas9 puede tener una secuencia de aminoácidos que sea una variante o un fragmento de cualquiera de las secuencias de endonucleasa Cas9 de los números de registro de Genbank KM099231.1 GL669193757; KM099232.1 GL669193761; o KM099233.1 GL669193765, o una secuencia de aminoácidos de Cas9 de PX330 o PX260 (Addgene, Cambridge, MA). La secuencia de nucleótidos de Cas9 puede modificarse para codificar para variantes biológicamente activas de Cas9, y estas variantes pueden tener o incluir, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que difiere de una Cas9 de tipo natural en virtud de que contiene una o más mutaciones (por ejemplo, una mutación por adición, delección o sustitución, o una combinación de tales mutaciones). Una o más de las mutaciones por sustitución pueden ser una sustitución (por ejemplo, una sustitución de aminoácidos conservadora). Por ejemplo, una variante biológicamente activa de un polipéptido de Cas9 puede tener una secuencia de aminoácidos con al menos o aproximadamente el 50% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos o aproximadamente el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% de identidad de secuencia) con un polipéptido de Cas9 de tipo natural. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen normalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina. La secuencia de la nucleasa Cas9 puede ser una secuencia mutada. Por ejemplo, la nucleasa Cas9 puede mutarse en los dominios FiNH y RuvC conservados, que están implicados en la escisión específica de cadena. Por ejemplo, una mutación de aspartato a alanina (D10A) en el dominio catalítico RuvC permite que el mutante nickasa de Cas9 (Cas9n) melle el ADN en lugar de escindirlo para producir roturas monocatenarias, y la posterior reparación preferencial a través de HDR puede disminuir potencialmente la frecuencia de mutaciones indel no deseadas a partir de roturas de bicatenarias inespecíficas. Los polipéptidos que son variantes biológicamente activas de una endonucleasa asociada a CRISPR pueden caracterizarse en cuanto a la medida en que su secuencia es similar o idéntica al polipéptido de tipo natural correspondiente. Por ejemplo, la secuencia de una variante biológicamente activa puede ser al menos o aproximadamente el 80% idéntica a los residuos correspondientes en el polipéptido de tipo natural. Por ejemplo, una variante biológicamente activa de una endonucleasa asociada a CRISPR puede tener una secuencia de aminoácidos con al menos o aproximadamente el 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos o aproximadamente el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% de identidad de secuencia) con una endonucleasa asociada a CRISPR o con un homólogo u ortólogo de la misma. Una variante biológicamente activa de un polipéptido de endonucleasa asociada a CRISPR conservará suficiente actividad biológica para ser útil en los presentes métodos. Las variantes biológicamente activas conservarán suficiente actividad para funcionar en la escisión de ADN dirigida. La actividad biológica puede evaluarse de maneras conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, sin limitación, ensayos funcionales o ensayos de escisión *in vitro*.

En particular, la población de macrófagos alveolares obtenida mediante el método de la presente divulgación se modifica por ingeniería genética para expresar un ácido nucleico terapéutico de interés, que codifica para una proteína de interés, o para inhibir la expresión de un gen de interés y la producción de la forma activa de la

proteína de interés.

La presente divulgación se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y los ejemplos. Sin embargo, no debe interpretarse que estos ejemplos y figuras limitan en modo alguno el alcance de la presente divulgación.

5

Figuras

Figura 1.

- 10 A) Expresión de MafB y cMaf en relación con HPRT1, medida mediante qRT-PCR, en cultivos de corta duración de macrófagos de médula ósea (BMM), macrófagos peritoneales (PM) y macrófagos alveolares (AM).
- B) Curva de crecimiento que muestra el número de AM a lo largo del tiempo en cultivo líquido.
- 15 C) Número de unidades formadoras de colonias (UFC) contadas el día 21 por 10^4 AM y PM sembrados en placa en medio MethoCult después de la primera siembra en placa o después de volver a sembrar en placa 10^4 células retiradas por lavado de la primera siembra en placa (2ª siembra en placa) o de la segunda siembra en placa (3ª siembra en placa).
- 20 D) Diagramas de cajas que muestran los niveles de expresión relativa promedio, intercuartil y percentil 5-95 de los genes de autorrenovación en Maf-DKO, WT BMM y AM, medidos mediante PCR en tiempo real nanofluídica en matriz Fluidigm. * valor de $p < 0,05$; ** valor de $p < 0,01$ basándose en una prueba de la t para datos independientes.
- 25 E) Gráficos de agregación que muestran señales Chip-seq promedio para PU.1 y P300 en Maf-DKO, WT BMM y AM para las regiones potenciadoras asociadas con el gen de autorrenovación (total = 88 regiones).
- F) Matriz de correlación de Pearson (número de lectura en $\log_2$ ordenado por rangos mediante PCA) para la unión de PU.1 y P300 a potenciadores asociados al gen de autorrenovación (total = 88 regiones) basándose en
30 datos de Chip-seq para Maf-DKO, WT BMM y AM.

Figura 2. Los AM se autorrenuevan *in vivo* e *in vitro* y puede integrarse en el espacio alveolar tras el trasplante pulmonar. (a, b) Se aislaron los AM de los pulmones de WT (CD45.2) mediante BAL y se inyectaron por vía i.t. a ratones receptores (huésped) WT (CD45.1). (a) Se analizaron CD11c+SiglecF+ AM en suspensiones de células generadas a partir de pulmones totales de ratones receptores mediante citometría de flujo para determinar la expresión de CD45.1 y CD45.2 en el punto temporal indicado después de la inyección. La mediana se indica mediante una barra ($n = 4-5$). Los datos se agrupan a partir de tres experimentos independientes. (b) Se midió la incorporación de BrdU por los AM derivados del huésped y del injerto mediante citometría de flujo 4/20 h después de la inyección i.p. de 2 mg de BrdU. La mediana se indica mediante una barra ($n = 4$). Los datos son representativos de dos experimentos independientes. (c) Análisis *in vitro* de la incorporación de BrdU por los AM y los PM 3 días después de la estimulación con GM-CSF y 18 h de pulsos de BrdU. Los datos se presentan como aumento en veces con respecto a las células no estimuladas y son representativos de dos experimentos independientes. Las barras de error representan la DE de 3 repeticiones técnicas. (d, e) Se les inyectó por vía i.t. a los ratones receptores (huésped) WT (CD45.1) o bien con WT AM (CD45.2) recién aislados o bien con eAM (CD45.2) expandidos *in vitro*. (d) Se analizó la contribución de las células derivadas del injerto (CD45.2+) a la población total de CD11c+SiglecF+ AM en homogeneizados de pulmón total mediante citometría de flujo. La mediana se indica mediante una barra ($n = 6$). (e) Se comparó la expresión del marcador de superficie de los AM derivados del huésped tal como se determina mediante citometría de flujo con los AM o eAM recién aislados injertados CD45.2+. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. (f) Comparación de los AM sometidos a expansión de larga duración y trasplantados (eAM) con la expresión génica global de AM recién trasplantados mediante un diagrama de dispersión de cpm de RNAseq que muestra el promedio de duplicados de eAM y AM; CC, coeficiente de correlación rho de Spearman. (g) Matriz de coeficientes de correlación rho de Spearman de la expresión génica global de RNAseq entre muestras individuales de eAM trasplantados, AM trasplantados y AM endógenos.

55

Figura 3. La sobreexpresión de MafB inhibe la autorrenovación de AM *in vitro* e *in vivo*. (a) Se usó el constructo lentiviral pLV-tetO-MafB para la sobreexpresión inducible de MafB marcado con Flag. Se analizó la expresión de GFP de macrófagos que expresan el transactivador rtTA mediante citometría de flujo 48 h después de que la infección *in vitro* con partículas lentivirales generara el constructo viral indicado. Se detectó la expresión de Flag-MafB después de la adición de DOX al medio de cultivo mediante inmunotransferencia de tipo Western en las mismas células. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. (b-f) Se les inyectó por vía i.t. a los ratones R26-M2rtTA partículas lentivirales generadas a partir de pLV-tetO-MafB o vector vacío (EV) que no contiene la secuencia de MafB. (b) 7 días después de la inyección, se identificaron las células que expresan GFP en homogeneizados de pulmón total mediante citometría de flujo y se analizaron para determinar la expresión de CD11c y SiglecF ($n = 10$). Los datos son representativos de más de dos experimentos independientes. (c) Se clasificaron los GFP+ y GFP- AM a partir de homogeneizados de pulmón total y se usaron

65

para CFA en presencia o ausencia de DOX *in vitro*. La cuantificación de la formación de colonias representada como media y EEM de un duplicado técnico se muestra en (c). Los datos son representativos de tres experimentos independientes. (d) Análisis de proliferación por citometría de GFP+CD11c+SiglecF+ AM en homogeneizados de pulmón total 7 días después de la inyección del virus y 3 días después de la inducción de la expresión de MafB mediante la expresión de Ki67 (parte superior) y la incorporación de BrdU después de 20 h de pulsos (parte inferior). La mediana se indica mediante una barra (n = 4-6). Los datos mostrados son de dos experimentos independientes y se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney. (e) Se analizó la contribución de las células GFP+ a la población total de CD11c+SiglecF+ AM en homogeneizados de pulmón total mediante citometría de flujo 3 meses después de la inducción de la expresión de MafB por DOX. La mediana se indica mediante una barra (n = 4-5). Los datos mostrados se agrupan a partir de dos experimentos independientes y se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney. (f) Se determinó la muerte celular de GFP+ AM mediante citometría de flujo. La mediana se indica mediante una barra (n = 6-7). Los datos son representativos de tres experimentos independientes y se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney.

Figura 4. MafB inhibe la autorrenovación de AM en la PAP autoinmunitaria y congénita. (a-d) Se les inyectó por vía i.t. a los ratones WT 100 ug de anticuerpo anti-GM-CSF o control de isotipo según el esquema en (a) y se analizaron un día después de la última inyección. (b) Se determinó la contribución relativa de CD11c+SiglecF+ AM con respecto al total de células vivas mediante citometría de flujo. La mediana se indica mediante una barra (n = 5). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes y se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney. (c) Análisis de proliferación por citometría de CD11c+SiglecF+ AM en homogeneizados de pulmón total mediante la expresión de Ki67. La mediana se indica mediante una barra (n = 5). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes y se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney. (d) Análisis de la expresión de MafB y cMaf por AM clasificados tal como se determina mediante qRT-PCR. La mediana se indica mediante una barra (n = 5). Los datos son representativos de 3 experimentos independientes y se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney. (e) Análisis para determinar la expresión de MafB y cMaf por AM aislados de BAL de ratones WT y Csf2rb-/- tal como se determina mediante qRT-PCR. Las barras y las barras de error representan la media y el EEM, respectivamente (n = 5). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes. (f) Se evaluó la proliferación de macrófagos F4/80+CD64+ en líquido de BAL de ratones WT y Csf2rb-/- mediante la expresión de Ki67 mediante citometría de flujo. La mediana se indica mediante una barra (n = 4). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes y se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney.

EJEMPLO 1:

Material y métodos

Para el cultivo de macrófagos alveolares, se combinaron lavados alveolares de diez lavados BAL de 1 ml a 37°C (PBS, EDTA 2 mM, FBS al 2% (GE Healthcare)) por ratón y se almacenaron en hielo. Luego se realizó la lisis de RBC a temperatura ambiente (TA) durante 3 minutos (tampón de lisis de RBC, Invitrogen). Se sembraron en placa las células a una densidad de al menos 1,1 millones de células por placa de Petri bacteriana de 10 cm (Greiner Bio-One) o placas de 6 pocillos NUNC no tratadas ($>0,45 \cdot 10^6$ por pocillo) en medio completo (RPMI, FCS al 10%, Pen/Strep al 1%, piruvato al 1%, glutamato al 1%) complementado con sobrenadante de GM-CSF al 1-2% de células J558L transfectadas con ADNC de GM-CSF murino. Se cambió parcialmente el medio cada dos-tres días. Se volvieron a sembrar en placa las células sólo en la confluencia y sólo al menos un día después del cambio de medio. Para evitar la muerte celular durante el desprendimiento, se desprendieron las células con Accutase (StemCells Technologies) y EGTA 2 mM durante 15 minutos a 37°C sin agitación ni pipeteo y se monitorizaron cuidadosamente bajo el microscopio durante el proceso de desprendimiento. Sólo después de que un gran número de células comenzaran a agruparse y flotar, las células se separaron cuidadosamente con una pipeta p1000.

Resultados

Se ha demostrado previamente que la inactivación de los dos factores de transcripción MafB y c-Maf en macrófagos (macrófagos Maf-DKO) confirió la capacidad de autorrenovación ampliada, posiblemente ilimitada, y expansión en cultivo a estas células (7). Se demostró además que esta capacidad se debe a la activación de una red de genes que se requieren para la autorrenovación tanto en las células madre embrionarias como en los macrófagos. Se investigó además si las presentes observaciones en macrófagos Maf-DKO eran directamente relevantes para la capacidad de autorrenovación de los macrófagos alveolares (AM) genéticamente no modificados. Los AM son una población de macrófagos residentes adultos con la capacidad bien caracterizada de autorrenovarse de manera autónoma *in vivo* (4) y que, al contrario que otras poblaciones de macrófagos caracterizadas, tienen la propiedad única de expresar de manera natural niveles muy bajos de MafB y cMaf (6). Se confirmaron estos niveles de Maf constitutivamente bajos en comparación con otras poblaciones de macrófagos (figura 1A).

Sorprendentemente, pudieron expandirse los AM en un cultivo líquido de larga duración durante al menos 100 días (figura 1B) y volvieron a sembrarse en placa los AM pero no los PM en ensayos de formación de

colonias en medio semisólido sin pérdida de la capacidad replicativa durante al menos tres rondas de resiembra en placa (figura 1C). Pudieron mantenerse los AM en cultivo líquido continuo durante al menos 4 meses a través de al menos un número de pases de 16 y expandirse sus números a al menos 10 duplicaciones de población. Pudieron congelarse los AM cultivados en nitrógeno líquido y volver a descongelarse sin pérdida de la capacidad replicativa. Los macrófagos alveolares cultivados también expresaron niveles generalmente aumentados de genes de autorrenovación de la red (figura 1D). Además, el análisis de Chip-Seq de las marcas potenciadoras epigenéticas en las regiones potenciadoras asociadas al gen SR mostró una unión comparable del linaje de macrófagos que define el factor de transcripción PU.1 entre los macrófagos AM, Maf-DKO y WT BMM, pero un enriquecimiento de la marca de activación p300 en AM similar a los macrófagos Maf-DKO (figura 1E, datos no mostrados). El análisis estadístico confirmó una alta correlación para la unión de PU.1 en las tres poblaciones, pero la correlación más alta para la unión de p300 entre los macrófagos AM y Maf-DKO (figura 1F). En conjunto, estos resultados demuestran que, de manera similar a la inactivación experimental, los niveles bajos naturales de MafB y c-Maf que se producen en los macrófagos alveolares activan un conjunto de potenciadores específicos de macrófagos preparados y una red de genes de autorrenovación que permite el cultivo ampliado y posiblemente una autorrenovación ilimitada de macrófagos alveolares.

EJEMPLO 2:

En este caso, los inventores demostraron que los macrófagos alveolares expandidos (eAM) en cultivo pueden trasplantarse por vía intratraqueal, integrarse en la población de AM endógena y continuar proliferando *in vivo* como los AM del receptor.

Además, demostraron que los eAM se mantienen a largo plazo en el receptor del injerto, durante al menos 15 meses (3/4 de la esperanza de vida de un ratón).

También se muestra que los eAM mantienen la identidad de los AM incluso después de un cultivo de larga duración (>4 meses) y el posterior trasplante a largo plazo en receptores durante >7 meses.

Material y métodos

Ratones. Todos los ratones transgénicos usados en este estudio tienen antecedentes C57Bl/6 (>7 retrocruzamientos) y tenían entre 6 y 14 semanas de edad, si no se indica lo contrario. Se obtuvieron ratones C57Bl/6 CD45.1 y CD45.2 de Charles River. La Prof. Dra. Melanie Greter (Universidad de Zúrich) proporcionó ratones Csf2rb1-/- (Shibata, Y. *et al.* GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 15, 557-567 (2001)). The Jackson Laboratory proporcionó ratones Rosa26-M2rtTA (Happle, C. *et al.* Pulmonary transplantation of macrophage progenitors as effective and long-lasting therapy for hereditary pulmonary alveolar proteinosis. *Sci Transl Med* 6, 250ra113 (2014)). La Prof. Dra. Irmgard Forster (Universidad de Bonn) proporcionó ratones Csf2-/- (Dranoff, G. *et al.* Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 264, 713-716 (1994)).

Para las inyecciones i.t., se anestesiaron los ratones mediante inhalación de isoflurano y se colocaron boca arriba. Se extrajo suavemente la lengua y se fijó con unas pinzas, mientras que a los ratones se les inyectó 50-100 ul en la tráquea usando una jeringa de 1 ml y una aguja de alimentación de punta roma de 22G. Se inhaló el líquido hacia los pulmones por esfuerzos respiratorios posteriores. Se observó a los ratones mientras se recuperaban de la anestesia para garantizar la retención del líquido administrado y luego se devolvieron a sus jaulas para su cuidado y manipulación de rutina.

Para las inyecciones i.t. de células, se inyectaron 100 ul de PBS que contenían 1×10^6 células en cada ratón. La inyección i.t. de partículas lentivirales se describe a continuación. Para la neutralización de GM-CSF, se usaron 100 ul de PBS que contenían 100 ug de anticuerpo monoclonal de rata anti-IgG2a de ratón para cada inyección (anticuerpo neutralizante contra GM-CSF (clon 22E9) o anticuerpo de control de isotipo de especificidad irrelevante; proporcionado por el Dr. John A. Hamilton (Vlahos, R. *et al.* Neutralizing granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 182, 34-40 (2010)). Cada una de las inyecciones i.t. de M-CSF recombinante (rhM-CSF, Novartis) contenía 20 ug de M-CSF en 100 ul de PBS.

Para la inhibición del M-CSF-R *in vivo*, se inyectaron por vía i.p. 100 ug de GW2580 (Calbiochem/Merck millipore) en 200 ul de PBS dos veces al día comenzando 12 h antes de la inyección de células. El día 0, se resuspendieron 1×10^6 CD45.1+ AM recién aislados en 100 ul de PBS que contenían GW2580 5 uM y se inyectaron por vía i.t. en ratones receptores. Se continuó con las inyecciones i.p. de GW2580 hasta el día 2 después de la transferencia celular (7 inyecciones i.p. de GW2580 en total) y se clasificaron los CD45.1+ AM del líquido de BAL el día 3 para el análisis de la expresión génica.

Se generaron ratones quiméricos de médula ósea mediante irradiación mortal de ratones huésped WT CD45.1 de 7-10 semanas de edad a los que posteriormente se les reconstituyó mediante inyección i.v. de 1×10^6 células de BM aisladas de ratones donantes. Se aisló la BM de donantes de fémures y tibias de ratones donantes

quiméricos CD45.1, a los que se les había reconstituido con 4×10^6 células hepáticas fetales de embriones WT y Maf-DKO E14.5 CD45.2. Se aislaron CD45.2+ AM de los pulmones de las quimeras para experimentos de CFA *in vitro* después de al menos 10 semanas después de la reconstitución.

5 Se indujo la expresión génica inducida por doxiciclina *in vivo* 4-8 días después de la inyección del virus proporcionando a los ratones agua potable que contenía DOX 2 g/l y sacarosa al 2%, así como pienso que contenía DOX (Plexx B.V., ref. S3888, doxiciclina (200 mg/kg)) a voluntad. El agua potable se reponía cada 2 días.

10 Todos los experimentos con ratones se realizaron en condiciones específicas libres de patógenos y según los protocolos aprobados por el comité de ética animal de Marsella (Francia). El aislamiento de células y órganos de los ratones se realizó según los protocolos aprobados por el comité de ética animal de Marsella (Francia) y el centro Max-Delbrück de Berlín (Alemania).

15 Cultivo celular. Para aislar los macrófagos alveolares, se realizó un lavado broncoalveolar (BAL) tal como se describió (Soucie, E.L. *et al.* Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. *Science* (2016)) usando 1 ml de tampón de lavado (PBS, EDTA 2 mM, FCS al 2%) para cada etapa de lavado y agrupando hasta 10 lavados por ratón. Se recogió el líquido de BAL en hielo. Luego, se realizó la lisis de RBC a temperatura ambiente (TA) durante 3 minutos (tampón de lisis de RBC, Invitrogen) y se
20 filtraron las células a través de una malla de 70 μ m antes del procesamiento adicional. Para la expansión, se sembraron en placa las células a una densidad de 1,1 millones de células por placa de Petri de 10 cm en medio completo (RPMI, FCS al 10%, Pen/Strep al 1%, piruvato al 1%, glutamato al 1%) complementado con sobrenadante de GM-CSF al 1% de células J558L transfectadas con ADNC de GM-CSF murino. Para desprender los AM, se lavaron las células con PBS y se incubaron con Accutase (Merck Millipore) complementado con EGTA
25 1 mM (Sigma) durante 15 minutos antes de la recogida de las células desprendidas.

Se recogieron los macrófagos peritoneales mediante lavado peritoneal usando 10 ml de PBS que contenían EDTA 2 mM (Sigma). Se realizó la lisis de glóbulos rojos (tampón de lisis de RBC, Invitrogen) y se filtraron las células a través de una malla de 70 μ m antes del procesamiento adicional. Los cambios de medio se produjeron
30 cada 3-4 días.

Se hicieron crecer los macrófagos Maf-DKO de manera subconfluente en medio de crecimiento de macrófagos (medio modificado de Dulbecco (DMEM) con un complemento de células L al 20%, piruvato de sodio al 1% y L-glutamato al 1%) tal como se describió (Aziz, A., Soucie, E., Sarrazin, S. y Sieweke, M.H. MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science* 326, 867-871 (2009)).
35

Se diferenciaron los macrófagos WT BMM de la médula ósea total de ratón durante 15 días en medio de crecimiento de macrófagos, que se seleccionan para determinar las células adherentes cada 4 días.

40 Para la inyección conjunta de macrófagos WT y Maf-DKO, se desprendieron macrófagos WT BMM y Maf-DKO cultivados y se tiñeron con 2 μ M de CFSE o violeta Celltrace (Thermo) según las instrucciones del fabricante. Después de mezclar las células con la tinción de CFSE y CTV, se determinó la razón exacta previa a la inyección de células CTV+/CFSE+ mediante citometría de flujo.

45 Preparación de homogeneizados de pulmón total y líquido de BAL para análisis por citometría de flujo. Para preparar la suspensión de células individuales a partir de tejido pulmonar total, se sacrificaron los ratones por luxación cervical y se perfundieron con PBS antes de recoger el tejido. Se maceró el tejido pulmonar y se incubó con colagenasa-2 1 mg/ml (Worthington) y ADNasa I 0,15 mg/ml (Sigma) a 37°C durante 30 min con agitación constante. Se filtró la suspensión de células resultante a través de una malla de 70 μ m y se retiraron los
50 eritrocitos mediante lisis de RBC (tampón de lisis de RBC, Invitrogen) antes de proceder con el protocolo de tinción de citometría de flujo.

Se realizó el BAL tal como se describió anteriormente. Después de la lisis de RBC (tampón de lisis de RBC, Invitrogen) y pudieron procesarse las células de filtración según el protocolo de tinción de citometría de flujo.
55

Citometría de flujo. Se trató la suspensión de células con el kit de viabilidad fijable Zombie Aqua (BioLegend) según las instrucciones del fabricante para marcar las células muertas. Antes de continuar con la tinción de anticuerpos, se incubaron previamente las células con un anticuerpo bloqueante del receptor de Fc (clon 2.4 G2, PD Pharmingen) durante 20 minutos a 4°C. Para la tinción de anticuerpos, se incubaron las células con un cóctel de anticuerpos durante 20 minutos a 4°C. Se adquirieron las células en los sistemas FACSCanto, LSRII y LSRFortessa (BD) y se analizaron con el software Flowjo (TreeStar). Se usaron los siguientes anticuerpos para la tinción de células: anti-CD11b (clon M1/70, eBioscience), anti-CD11c (clon N418, eBioscience), anti-F4/80 (clon BM8, eBioscience), anti-CMHII (clon M5/114.15.2, eBioscience), anti-CD45.1 (clon A20, eBioscience), anti-CD45.2 (clon 104, eBioscience), anti-B220 (clon RA3-6B2, eBioscience), anti-CD115 (clon AFS98, eBioscience), anti-CD64 (clon X54-5/7.1, Biolegend), anti-SiglecF (clon E50-2440, BD Pharmingen), anti-Ki67 (clon B56, BD Pharmingen y clon SolA15, eBioscience), anti-BrdU (clon MoBU-1, Life technologies).
60
65

Clasificación celular. Para el análisis de la expresión génica de subconjuntos de AM totales de ratones experimentales, se clasificaron los AM vivos individuales de homogeneizados de pulmón total y líquido de BAL según la combinación de marcadores indicada en la leyenda de la figura respectiva en una máquina BD FACS Aria III. Se clasificaron directamente las células en tampón de lisis para la extracción de ARN.

Análisis del ciclo celular. Se evaluó la proliferación *in vitro* de macrófagos usando el ELISA de proliferación celular (BrdU, colorimétrico; Roche) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se sembraron en placa 10-20 mil macrófagos recién aislados por 96 pocillos en una placa de histocultivo en medio completo (DMEM, FCS al 10%, Pen/Strep al 1%, piruvato al 1%, glutamato al 1%). Después de que los macrófagos se adhirieran al plástico, se reemplazó el medio de siembra en placa por medio completo que contenía la citocina respectiva a la concentración indicada. El día 2 después de la estimulación, se añadió BrdU al cultivo y se evaluó la incorporación de BrdU el día 3.

Se evaluó el análisis *ex vivo* de la incorporación de BrdU por los AM 4 ó 20 h (tal como se especifica en las leyendas de las figuras) después de la inyección intraperitoneal de ratones con 2 mg de BrdU (Sigma) mediante citometría de flujo usando el kit BrdU Flow (BD Pharmingen) según las instrucciones del fabricante con modificaciones menores, incluyendo la digestión ampliada con ADNasa I (90 minutos a 37°C) y la tinción intracelular (30-60 minutos). Para la tinción con BrdU, se usó un anticuerpo monoclonal diferente al proporcionado en el kit (Thermo Fischer Scientific, clon MoBU-1). Para la tinción con Ki67, se trataron las células de la misma manera que para la tinción con BrdU, pero en su lugar se tiñeron con un anticuerpo anti-Ki67 (clon B56, BD Pharmingen o clon SolA15, eBioscience).

Producción y transducción de lentivirus. Se generó el constructo lentiviral pLV-TetO-FlagMafB-PGK-GFP clonando un producto de PCR de inserción que contenía FlagMafB-PGK-GFP en el sitio EcoRI de pLV-TetO-Klf4 (Addgene n.º 19764, se eliminó el ADNc de Klf4 mediante digestión con EcoRI). pRetroX-Tight-GFP que contiene MafB marcado con Flag (Soucie, E.L. *et al.* Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. Science (2016)) sirvió como molde para generar el inserto mediante dos PCR secuenciales. Se usaron el cebador directo Flag-MafB y el cebador inverso MafB para amplificar el MafB marcado con Flag. Se usaron el cebador directo PGK-GFP y el cebador inverso GFP-PGK para amplificar PGK-GFP. En una segunda etapa, se usaron los productos de PCR superpuestos resultantes de estas reacciones como moldes para una segunda PCR usando el cebador directo Flag-MafB y el cebador inverso GFP-PGK, lo que dio como resultado el inserto deseado. Esta estrategia de PCR superpuesta en dos etapas era necesaria para mutar un sitio EcoRI entre MafB y el promotor PGK.

Se produjeron las partículas del vector lentiviral en el Centro Internacional de Investigación en Infectología (CIRI) U1111/UMR5308 Inserm-CNRS-UCBL - ENS de Lyon (Lyon, Francia) por transfección triple de plásmidos que albergan el constructo de empaquetamiento, el vector de transferencia (Amit, I. *et al.* Unbiased reconstruction of a mammalian transcriptional network mediating pathogen responses. Science 326, 257-263 (2009)) y el constructo que expresa la envoltura en células productoras usando la metodología de cloruro de calcio. Se concentraron los sobrenadantes virales mediante ultracentrifugación y se resuspendieron las partículas virales en PBS, lo que dio como resultado títulos virales $>10^7$ ufp.

Para la transducción *in vivo* de AM, se les inyectó por vía i.t. a los ratones receptores 50-100 ul de partículas virales concentradas. 4-8 días después de la inyección del virus, se indujo la expresión génica proporcionando a los ratones agua potable que contenía DOX (2 g/l; también se complementó el agua con sacarosa al 2%; el agua que contenía DOX se cambió cada dos días) y pienso que contenía DOX (Plexx B.V., ref. S3888, doxiciclina (200 mg/kg)).

Para la transducción *in vitro*, se añadieron 10 ul de partículas virales concentradas a los macrófagos Maf-DKO que expresan rtTA (Soucie, E.L. *et al.* Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. Science (2016)) sembrados en una placa de 12 que contenía 350 ul de medio. Se cambió el medio después de 4 h de incubación a 37°C.

Inmunotransferencia de tipo Western.

Se extrajeron las proteínas mediante lisado directo en tampón de muestra SDS (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; SDS al 4%, glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 10% (beta-ME; azul de bromofenol). Se transfirieron las muestras a una columna QIAshredder y se centrifugaron a velocidad máxima durante 2 minutos, con el fin de romper completamente las células. Se desnaturalizaron las proteínas hirviéndolas durante 5 minutos a 100°C. Se separaron las proteínas en SDS-PAGE al 10% y luego se transfirieron a una membrana de transferencia de nitrocelulosa Protran de 0,2 µm (Schleicher & Schuell) a 2,5 mA/cm² usando base Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% v/v como tampón de transferencia. Se bloqueó la membrana durante la noche con TBS-Tween (NaCl 13,6 mM, base Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH ajustado a 7,8 con HCl 1 M, Tween 20 al 0,05%) que contenía leche desnatada en polvo al 5% (disolución de bloqueo). Se diluyeron los anticuerpos primarios en tampón de bloqueo (1:4000 anti-Flag Sigma, 1:1000 anti-GRB2 Abcam) y se incubaron durante 1 hora a TA con

agitación constante Se diluyeron los anticuerpos secundarios en tampón de bloqueo (anticuerpo de ratón anti-IgG y anticuerpo de conejo anti-IgG ambos acoplados a HRP, Santacruz) y se incubaron durante 45 minutos. Se adquirió la quimioluminiscencia en una máquina WB de revelado automático (Thermo Scientific).

- 5 Ensayo de formación de colonias. Se sembraron en placa los AM a 10.000 células por 1 ml de MethoCult M3231 (StemCell Technologies) que contenía 100 ng/ml de rGM-CSF (PeproTech) o rM-CSF (PeproTech) si no se indica lo contrario. Se contaron las colonias después de 3 semanas.

- 10 Análisis de la expresión génica. Para el análisis de la expresión génica, se aislaron los macrófagos del líquido de BAL de ratones WT o Csf2rb^{-/-} a través de adherencia al plástico durante 2 horas. Se extrajo el ARN o bien directamente o bien después de la estimulación *in vitro* tal como se especifica en las leyendas de las figuras. Se aisló el ARN total de las células usando el mini kit RNeasy (Qiagen) y columnas Qiashredder (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. En la columna se realizó la digestión del ADN. Se usaron 100 ng de ARN total para la transcripción inversa para dar ADNc usando SuperScript III RT (Thermo), cebadores Oligo(dT) (Thermo) y RNaseOUT (Thermo). La PCR cuantitativa se realizó usando mezcla maestra Fast SYBR Green (Thermo).

Análisis de RNAseq

- 20 Para el análisis de la expresión génica de los AM endógenos o trasplantados, se clasificaron los AM vivos individuales a partir de los homogeneizados de pulmón total según la combinación de marcadores indicada en la leyenda de la figura respectiva en una máquina BD FACSAria III. Se clasificaron las células directamente en tampón de lisis para la extracción de ARN. Se analizaron las repeticiones biológicas de 10-30.000 células de las poblaciones indicadas con el kit de ARN total TruSeq para la secuenciación en un secuenciador HiSeq Illumina. Se alinearon las lecturas truncadas de adaptador y calidad (puntuación de Phred > 20) en la versión mm9 del genoma de ratón usando el paquete Tophat2 y luego se convirtieron en datos de recuento usando HTSeq-count. Se excluyeron los transcritos que tenían recuentos bajos y se normalizaron los recuentos de lectura usando el enfoque de media truncada de valores M. En el análisis de gráficos de corredores, se normalizaron las expresiones génicas mediante millones de lecturas alineadas (CPM). La correlación de rangos de Spearman (CC) se calculó sobre una media de repeticiones para cada condición o para cada comparación por pares.

- 30 Análisis del líquido de BAL. 4 semanas después del trasplante de macrófagos WT o Maf-DKO, se recogió líquido de BAL de ratones Csf2^{-/-} realizando 5 lavados con 1 ml de PBS. Se determinó la concentración de proteínas usando el ensayo de proteínas de Bradford (Biorad). Se determinó la turbidez del BAL midiendo la DO a una longitud de onda de 600 nm.

Resultados

Los AM trasplantados y expandidos *in vitro* pueden mantenerse *in vivo* a largo plazo

- 40 Se ha establecido la autorrenovación de AM *in vivo* a través de experimentos que emplean rastreo de linaje genético y parabiosis (Yona, S. *et al.* Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* 38, 79-91 (2013)) (Hashimoto, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792-804 (2013)) (Guilliams, M. *et al.* Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* 210, 1977-1992 (2013)). Para evaluar si los AM trasplantados pueden mantenerse a largo plazo, se transfirieron AM WT (CD45.2) recién aislados a los pulmones de ratones WT (CD45.1) mediante inyección intratraqueal (i.t.) y se analizaron los pulmones de los ratones huéspedes en diferentes puntos temporales después de la transferencia mediante citometría de flujo (figura 2a). Se identificaron los AM como células CD11c⁺SiglecF⁺ (datos no mostrados) y se encontró que alrededor del 10% de todos los AM se derivaron del injerto 3 días después de la transferencia. Es importante destacar que, aunque la eficiencia de la inyección i.t. es muy variable, este nivel de contribución de los AM derivados del injerto a la población total de AM se mantuvo estable a lo largo del periodo de observación de 15 meses sin ser rebajado o superado por las células derivadas del huésped (figura 2a). Por consiguiente, no se encontró ninguna diferencia en la tasa de proliferación de los AM derivados del injerto y del huésped tal como se evaluó mediante la incorporación de BrdU (figura 2b).

- 60 Los AM expresan niveles excepcionalmente bajos de MafB y cMaf en comparación con otras poblaciones de macrófagos, incluyendo los macrófagos peritoneales (PM) (figura 1A). Informes anteriores han demostrado una autorrenovación ampliada de macrófagos que carecen de MafB y cMaf (Aziz, A., Soucie, E., Sarrazin, S. y Sieweke, M.H. MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science* 326, 867-871 (2009)), así como la proliferación transitoria de AM en respuesta a GM-CSF (Chen, BD, Mueller, M. y Chou, T.H. Role of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the regulation of murine alveolar macrophage proliferation and differentiation. *J Immunol* 141, 139-144 (1988)) (Akagawa, K.S., Kamoshita, K. y Tokunaga, T. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and colony-stimulating factor-1 on the proliferation and differentiation of murine alveolar macrophages. *J Immunol* 141, 3383-3390 (1988)) en el cultivo. Se encontró que los AM cultivados pero no los PM incorporaron BrdU y expresaron el marcador mitótico

fosfohistona H3 (pHH3) en respuesta a GM-CSF (figura 2c, datos no mostrados). Sin embargo, de manera importante y sorprendente, pudieron volver a sembrarse en placa en serie los AM en ensayos de formación de colonias y pudieron expandirse los AM durante al menos 10 duplicaciones de población en cultivo líquido de larga duración en presencia de GM-CSF durante varios meses (Soucie *et al.* Science 2016; figuras 1B,C, datos no mostrados). Los AM expandidos (eAM) *in vitro* mostraron un fenotipo de marcador de superficie similar a los AM recién aislados con la alta expresión característica de SiglecF y CD11c (datos no mostrados). Para someter a prueba si los eAM conservan su capacidad para integrarse en el entorno del tejido pulmonar después de múltiples pases *in vitro*, se transfirieron por vía i.t. los AM que se habían expandido durante más de 4 meses (eAM) en comparación con los AM recién aislados (ambos CD45.2) en los pulmones de ratones WT (CD45.1), y se encontró que 20 semanas después de la transferencia los eAM injertados se integraron en la población de AM del huésped con una eficiencia similar a los AM injertados recién aislados (figura 2d). El fenotipo de expresión del marcador de superficie *in vivo* de los eAM injertados y los AM recién aislados no se distinguía de los AM del huésped 2 meses después de la transferencia tal como se define mediante la expresión del marcador de superficie (figura 2e). Además, el análisis de RNAseq reveló que el perfil de expresión génica de los AM trasplantados que se habían expandido en cultivo durante al menos 4 meses (eAM) era casi idéntico a los AM recién trasplantados 7 meses después del trasplante, así como a los AM endógenos de los ratones trasplantados (figuras 2f,g). En conjunto, estos datos demuestran que los AM amplificados en cultivo de larga duración se integran en las poblaciones de macrófagos normales del tejido de los alvéolos pulmonares tras la transferencia intratraqueal, se mantienen a largo plazo *in vivo* durante al menos $\frac{3}{4}$ de la esperanza de vida del receptor y mantiene la identidad normal de los AM después del trasplante.

La expresión de MafB suprime la autorrenovación de AM

Para someter a prueba si la autorrenovación y el mantenimiento de los AM dependían de la baja expresión de los factores de transcripción MafB, se construyó un vector lentiviral que codifica para MafB marcado con Flag bajo el control de un promotor inducible por tetraciclina y GFP bajo el control de un promotor PGK constitutivo. y funcionalidad confirmada mediante transducción lentiviral de macrófagos que expresan el transactivador controlado por tetraciclina inverso (rtTA) (figura 3a). Se realizó la transducción *in vivo* de AM mediante inyección i.t. de estas partículas lentivirales en ratones transgénicos R26-M2rtTA, que expresan el transactivador controlado por tetraciclina inverso del locus ROSA26 (Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C. y Jaenisch, R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. Cell 121, 465-477 (2005)), lo que dio como resultado la expresión de GFP por los AM infectados (figura 3b). Para someter a prueba si la expresión de MafB inhibe la autorrenovación de AM, se aislaron GFP+ AM infectados y GFP- no infectados de los pulmones de ratones R26-M2rtTA inyectados mediante clasificación celular, y se evaluó la autorrenovación mediante el ensayo de formación de colonias (CFA) (figura 3c). En ausencia de doxiciclina (DOX), la formación de colonias de GFP+ AM infectados fue igual a la de los AM no infectados en presencia o ausencia de DOX, mientras que la formación de colonias de GFP+ AM se bloqueó con la expresión de MafB (figura 3c). La ausencia de colonias no se debió a la muerte celular, ya que pudieron encontrarse células vivas individuales, pero no colonias, en los cultivos (datos no mostrados). Para determinar si MafB también suprime la autorrenovación de AM *in vivo*, se instilaron partículas lentivirales que codifican para MafB inducible o vector vacío (EV) en los pulmones de ratones R26-M2rtTA y se indujo la expresión de MafB complementando el pienso y el agua potable con DOX. El análisis por citometría de la proliferación de AM mediante la tinción con Ki67 y la incorporación de BrdU reveló que la proliferación de GFP+ AM se suprimió específicamente en presencia de MafB, mientras que los AM transducidos con EV o no infectados mostraron niveles inalterados de proliferación en estado estacionario (figura 3d y datos no mostrados). Además, se analizó la contribución a largo plazo de las células GFP+ a la población total de AM después de 3 meses de tratamiento con DOX y no se encontraron AM persistentes infectados con lentivirus MafB, mientras que hasta el 25% de los AM eran GFP+ en el caso de infección por EV (figura 3e). La desaparición de los AM infectados con MafB dependía de la expresión de MafB, ya que los GFP+ AM persistieron en ausencia de tratamiento con DOX (datos no mostrados). La pérdida de AM que expresan MafB no se debió a la muerte celular, ya que no pudo detectarse un aumento en las células muertas entre AM que expresan MafB en comparación con EV (figura 3f). Además, los efectos intrínsecos no celulares eran poco probables, ya que casi todas las células infectadas con lentivirus en el pulmón eran AM (figura 3b). En conjunto, estos resultados demuestran que la expresión de MafB bloquea la autorrenovación de AM *in vitro* e *in vivo*.

Los AM regulan por incremento MafB y cMaf durante la PAP

También se observó que la inhibición de la autorrenovación de AM por parte de MafB también se producía en condiciones fisiopatológicas. La proteinosis alveolar pulmonar (PAP) es una enfermedad provocada por la disfunción de los AM que conduce a la acumulación de tensioactivo en el pulmón. La gran mayoría de los pacientes con PAP padecen la forma adquirida de la enfermedad provocada por autoanticuerpos contra GM-CSF (Trapnell, B.C., Carey, B.C., Uchida, K. y Suzuki, T. Pulmonary alveolar proteinosis, a primary immunodeficiency of impaired GM-CSF stimulation of macrophages. Curr Opin Immunol 21, 514-521 (2009)), que se decidió imitar experimentalmente. Para este fin, se trataron ratones WT con inyecciones i.t. de anticuerpos monoclonales contra GM-CSF (figura 4a) y se analizó el número de AM, la proliferación y la expresión de MafB 1 día después de la última inyección. La neutralización de GM-CSF condujo a una disminución de la frecuencia de AM en los

pulmones de los ratones tratados en comparación con los controles tratados con isotipo (figura 4b). Es importante destacar que también se observó una disminución en la proliferación de AM (figura 4c), que estuvo acompañada por una regulación por incremento de MafB (figura 4d), lo que sugiere una inhibición de la autorrenovación de AM por parte de MafB en PAP autoinmunitaria. El papel de cMaf parece ser menos prominente en esta situación, ya que los niveles de expresión fueron mucho más bajos y no pudo detectarse una regulación por incremento significativa (figura 4d).

Después de identificar el papel de MafB en la regulación de la proliferación de AM durante la PAP autoinmunitaria, también se analizó la proliferación de AM en ratones *Csf2rb*^{-/-}, que representan un modelo para la PAP congénita. Es importante destacar que MafB y, en menor medida, cMaf se regularon por incremento en *Csf2rb*^{-/-} AM (figura 4e) y se inhibió la proliferación (figura 4f), lo que indica que MafB bloquea la autorrenovación de AM en la PAP congénita. En conjunto, se ha demostrado que la inhibición de la autorrenovación de AM durante la patogenia de PAP adquirida y congénita se asocia con una expresión aumentada de MafB. Esto subraya la relevancia fisiopatológica de la regulación mediada por MafB de la autorrenovación de AM. También indica que la inactivación, delección o inhibición de MafB en los AM mejoraría la autorrenovación de AM en situaciones de enfermedad, en las que MafB se regula por incremento de manera anómala y bloquea la autorrenovación de AM. Están realizándose experimentos que muestran que los AM, en los que se ha inactivado MafB, tienen una capacidad de autorrenovación mejorada después del trasplante en modelos de PAP. En conjunto, los presentes datos demuestran que la inactivación de MafB en AM trasplantados puede tener un beneficio terapéutico.

Bibliografía

En toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece la presente divulgación.

1. S. J. Jenkins *et al.*, Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332, 1284 (10 de junio de 2011).
2. C. Schulz *et al.*, A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86 (6 de abril de 2012).
3. S. Yona *et al.*, Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79 (24 de enero de 2013).
4. D. Hashimoto *et al.*, Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* 38, 792 (18 de abril de 2013).
5. M. H. Sieweke, J. E. Allen, Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* 342, 1242974 (22 de noviembre de 2013).
6. E. L. Gautier *et al.*, Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* 13, 1118 (30 de septiembre de 2012).
7. A. Aziz, E. Soucie, S. Sarrazin, M. H. Sieweke, MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science* 326, 867 (6 de noviembre de 2009).
8. G. Fejer *et al.*, Nontransformed, GM-CSF-dependent macrophage lines are a unique model to study tissue macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E2191 (11 de junio de 2013).

REIVINDICACIONES

1. Método de expansión de una población de macrófagos alveolares en un cultivo líquido de larga duración, que comprende cultivar durante al menos 100 días la población de macrófagos alveolares en un medio de cultivo complementado con una cantidad de GM-CSF.
2. Uso del método según la reivindicación 1, para preparar una composición farmacéutica que comprende al menos 1×10^9 de macrófagos alveolares.

10

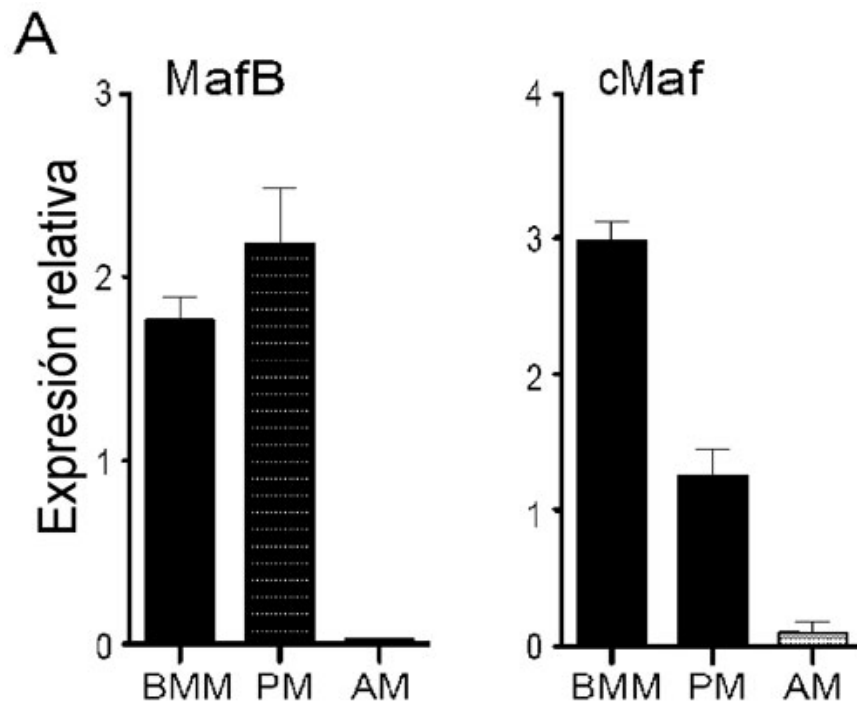


Figura 1A

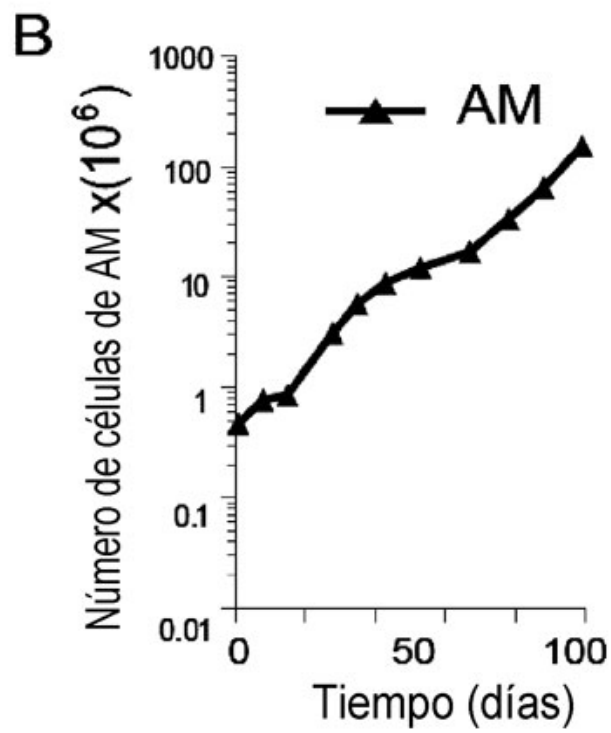


Figura 1B

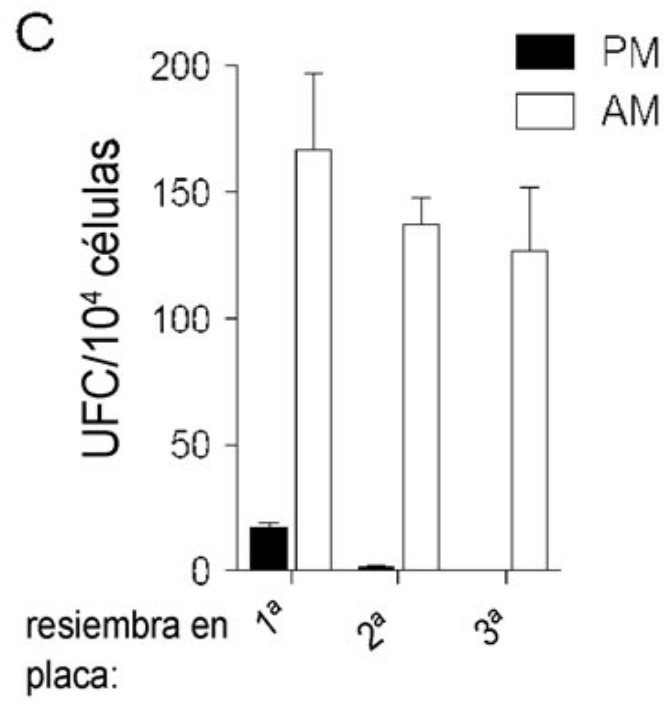


Figura 1C

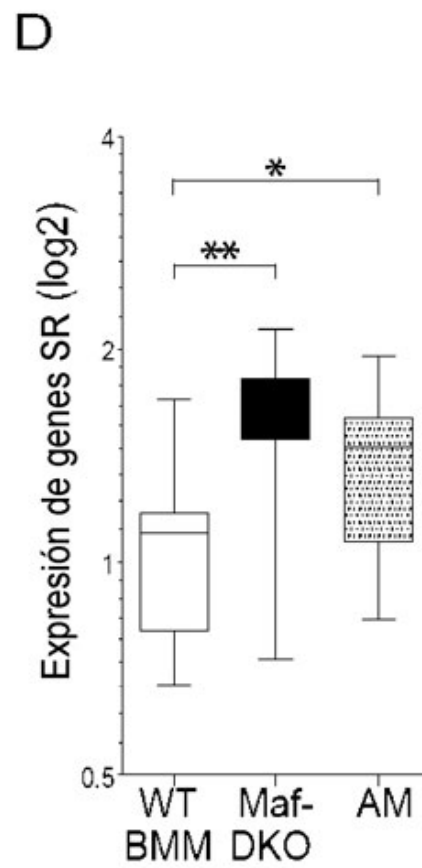
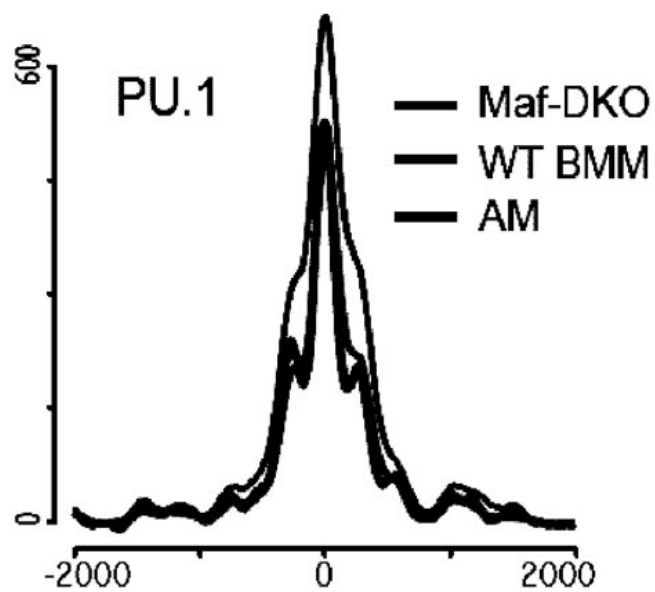


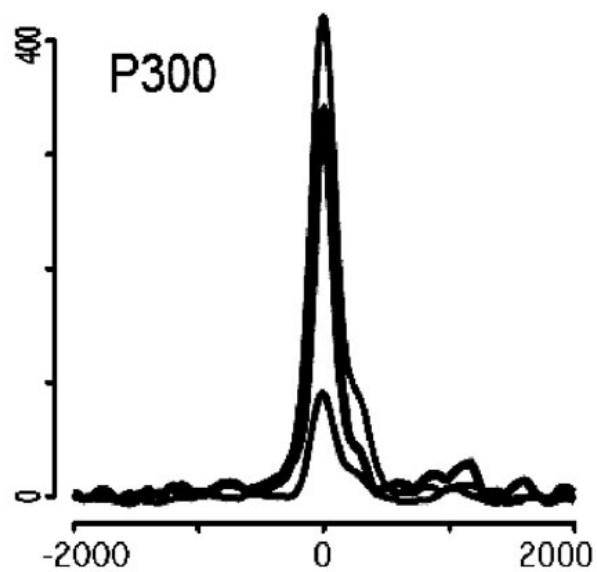
Figura 1D

E



F

	PU.1	
Maf-DKO	0.814	0.767
WT BMM		0.748
		AM



	P300	
Maf-DKO	0.498	0.570
WT BMM		0.393
		AM

Figuras 1E y 1F

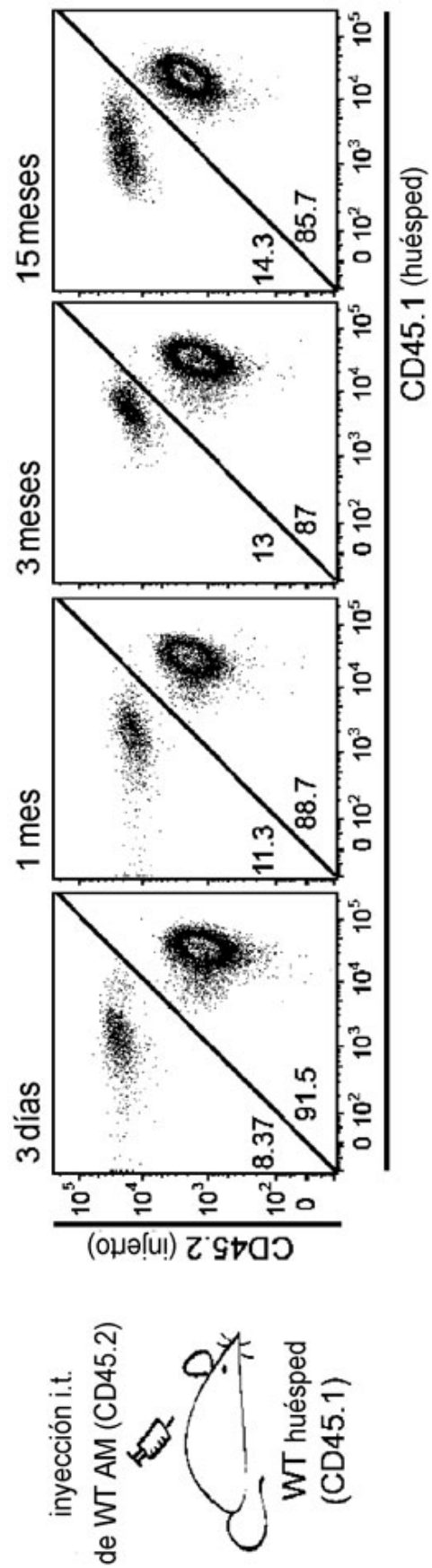


Figura 2A (primera parte)

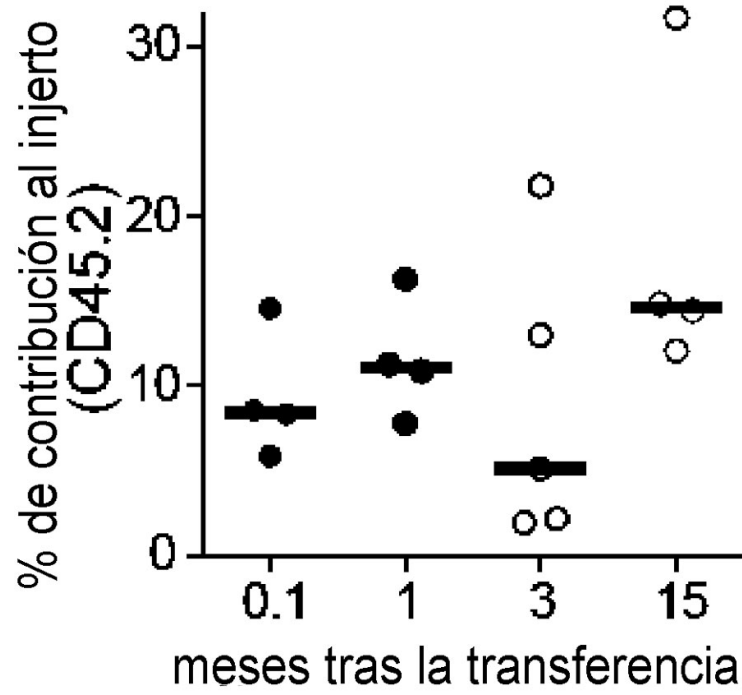


Figura 2A (segunda parte)

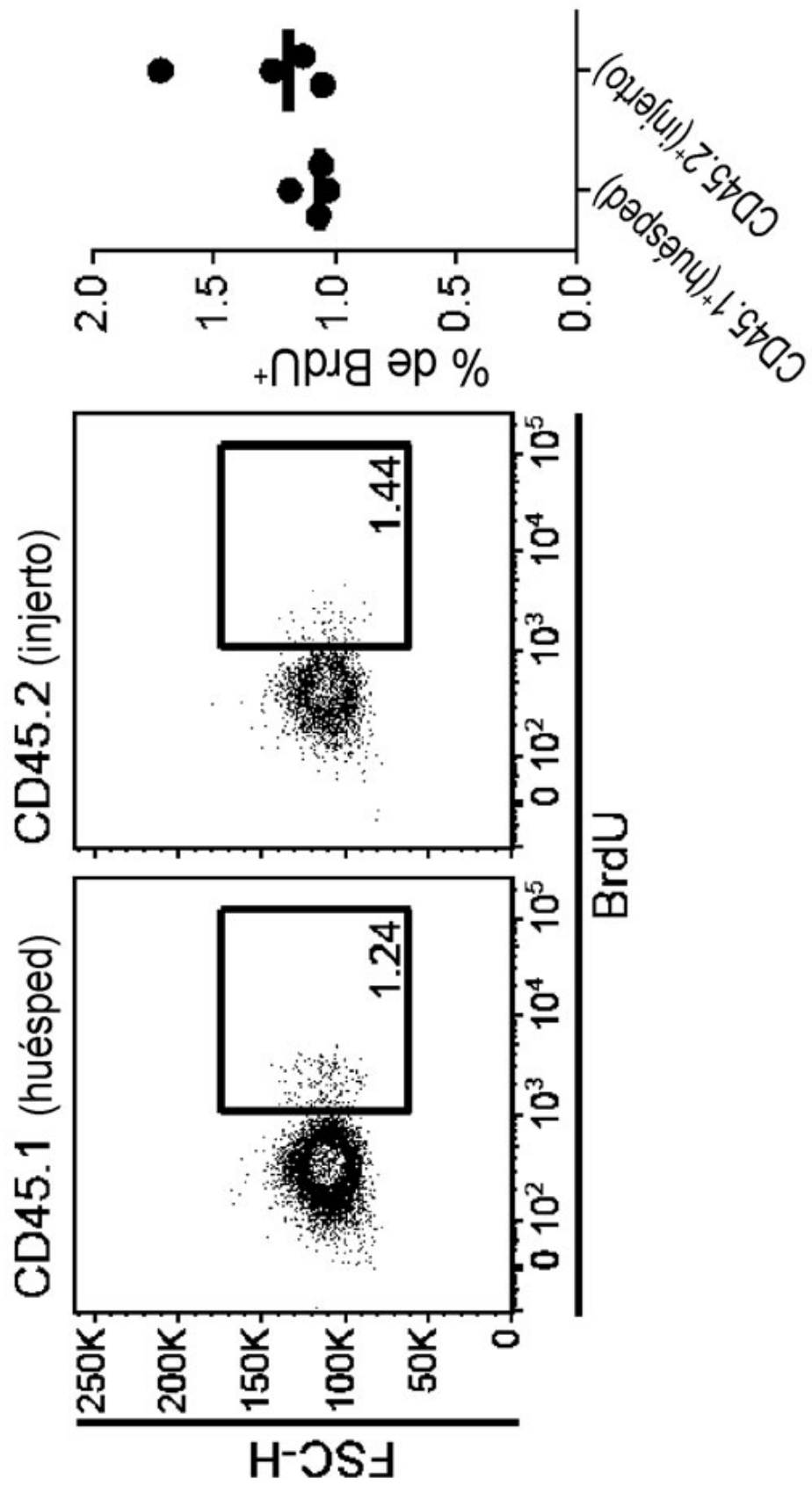


Figura 2B

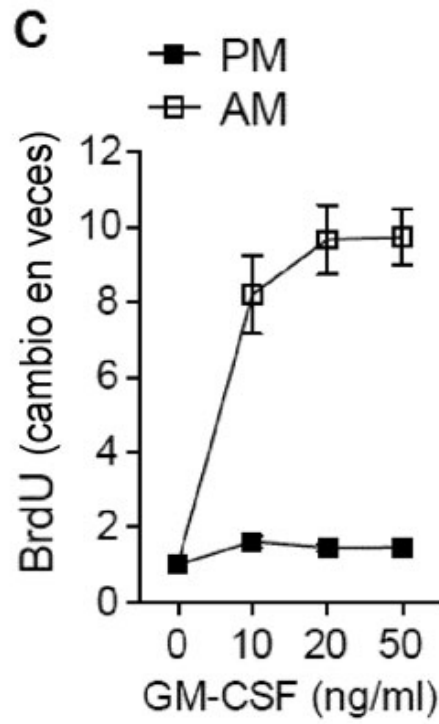


Figura 2C

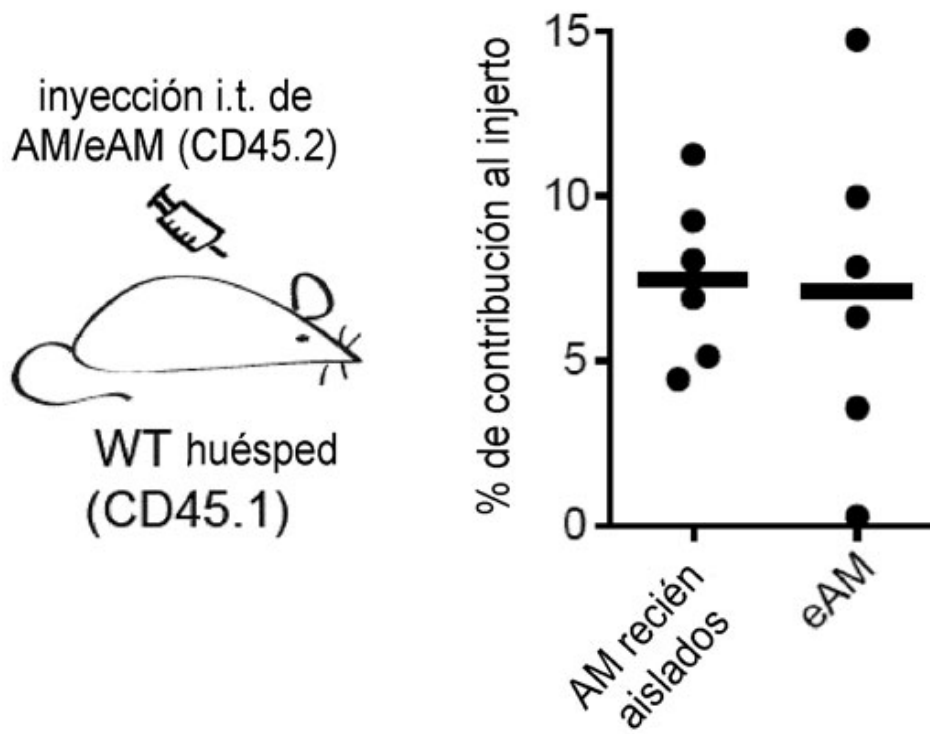


Figura 2D

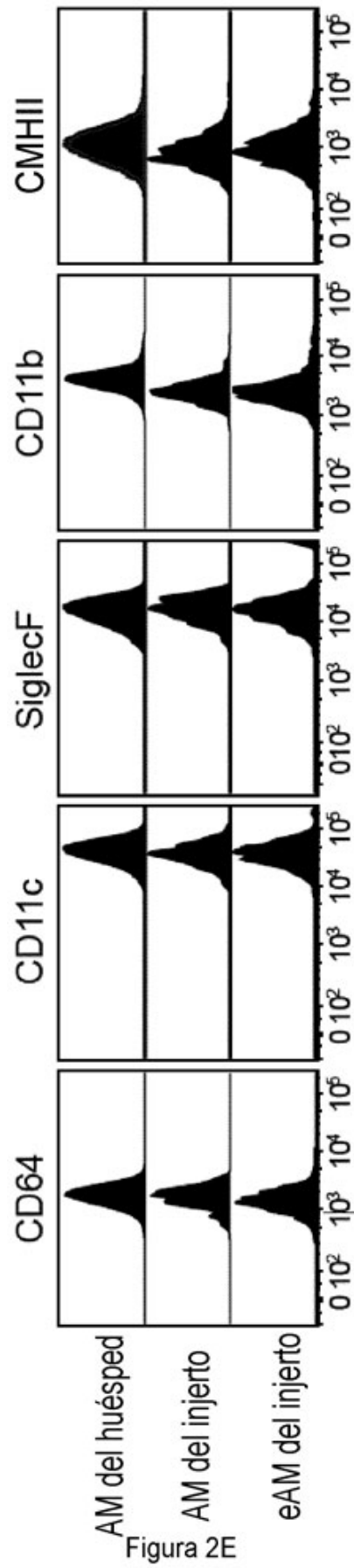


Figura 2E

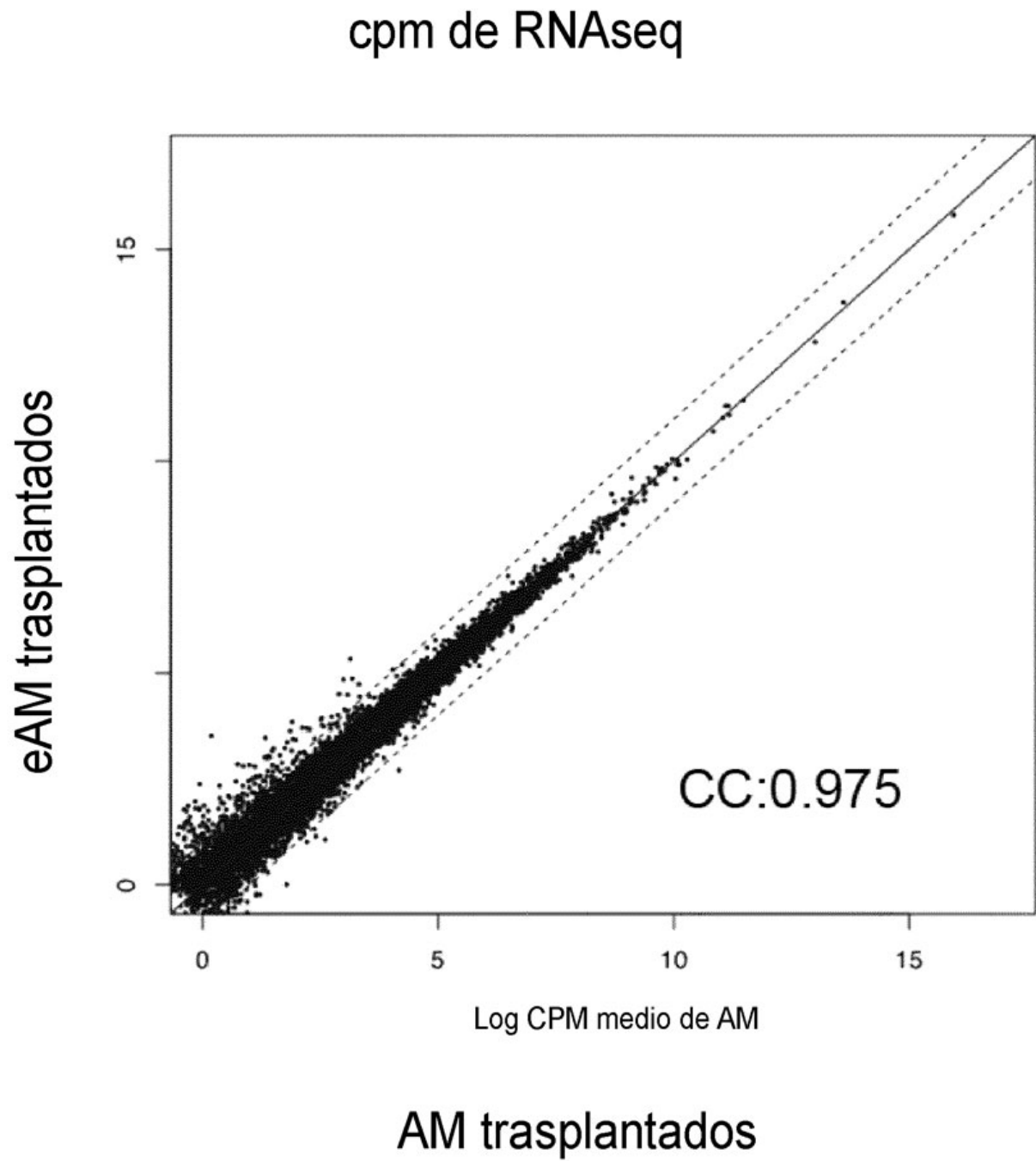


Figura 2F

0.9714	0.969	0.97	0.9783	0.9799	1	AM2 traspl.
0.966	0.9715	0.9725	0.9786	1	0.9799	AM1 traspl.
0.9617	0.9701	0.9829	1	0.9786	0.9783	eAM2 traspl.
0.9554	0.9698	1	0.9829	0.9725	0.97	eAM1 traspl.
0.9709	1	0.9698	0.9701	0.9715	0.969	AM2
1	0.9709	0.9554	0.9617	0.966	0.9714	AM1
AM1	AM2	eAM1 traspl.	eAM2 traspl.	AM1 traspl.	AM2 traspl.	

Figura 2G

pLV-tetO-FlagMafB-PGK-GFP
(pLV-tetO-MafB)

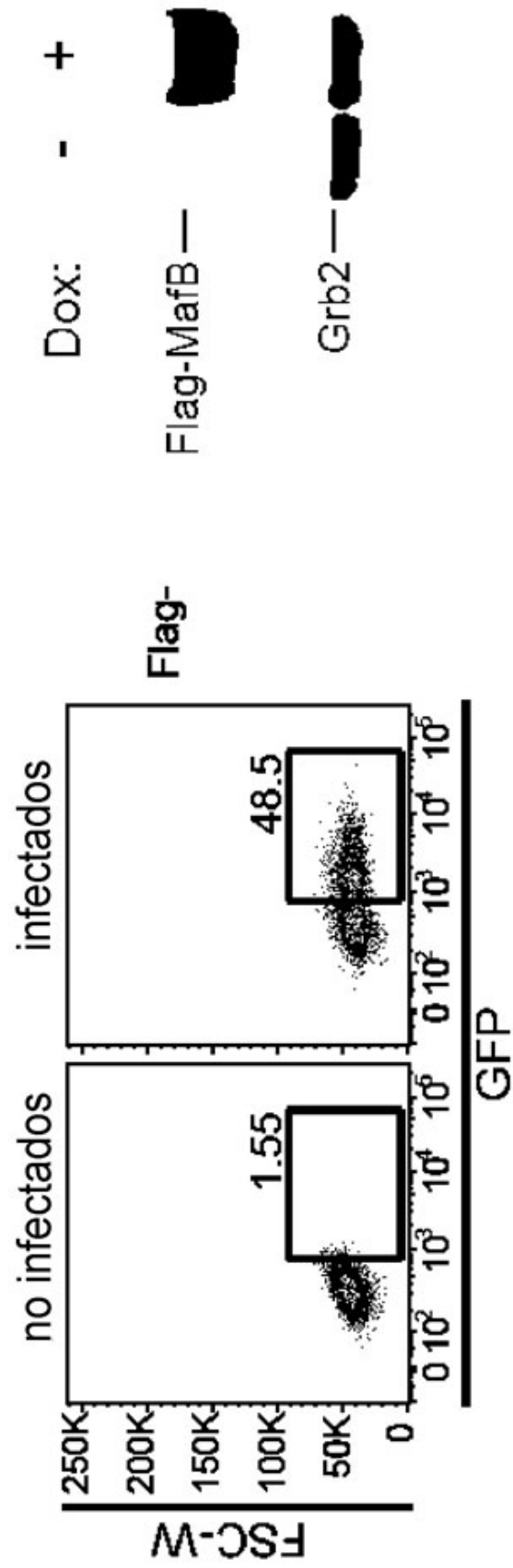


Figura 3A

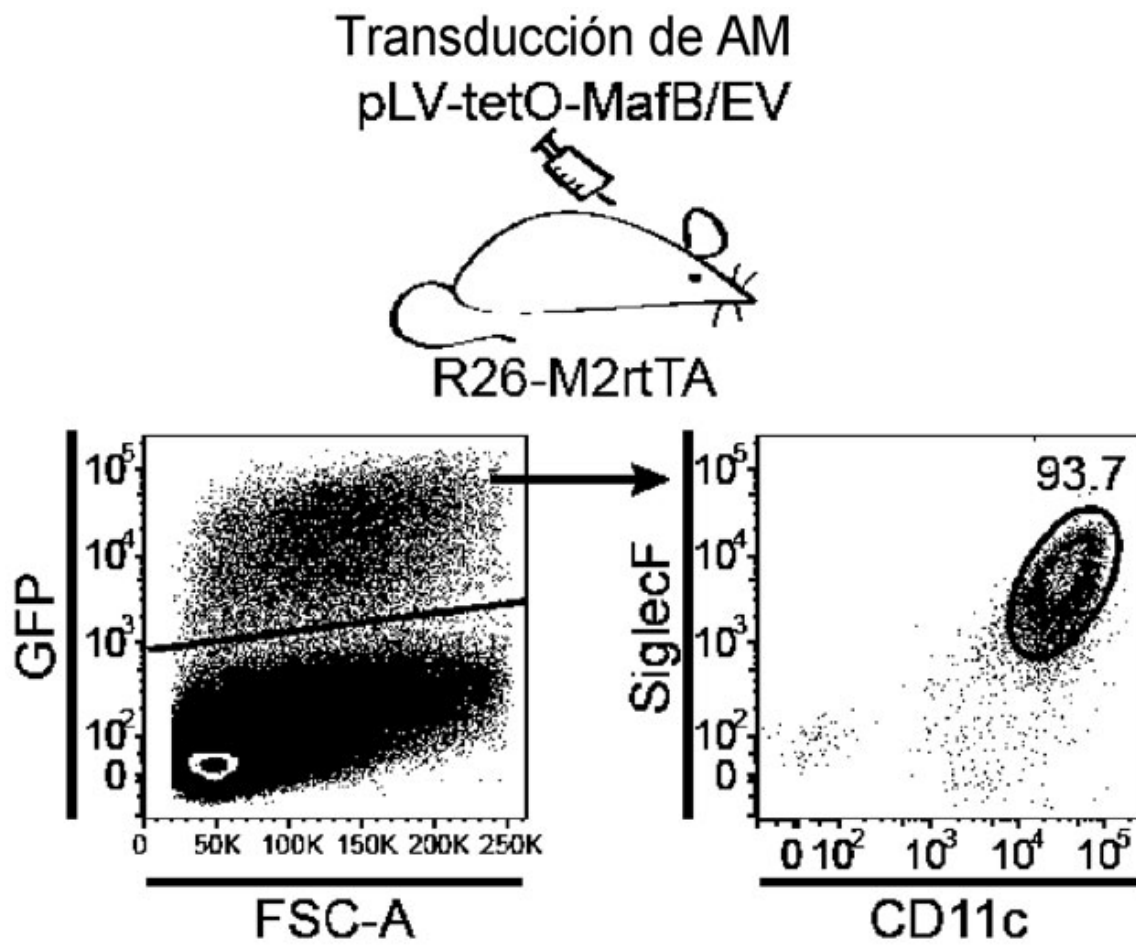


Figura 3B

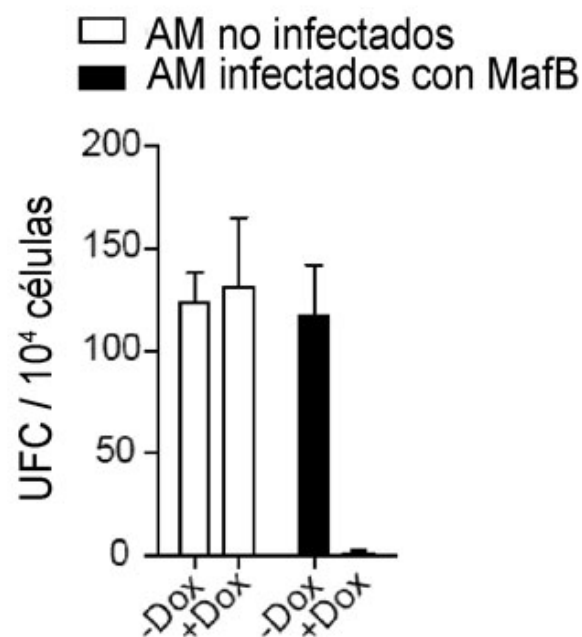


Figura 3C

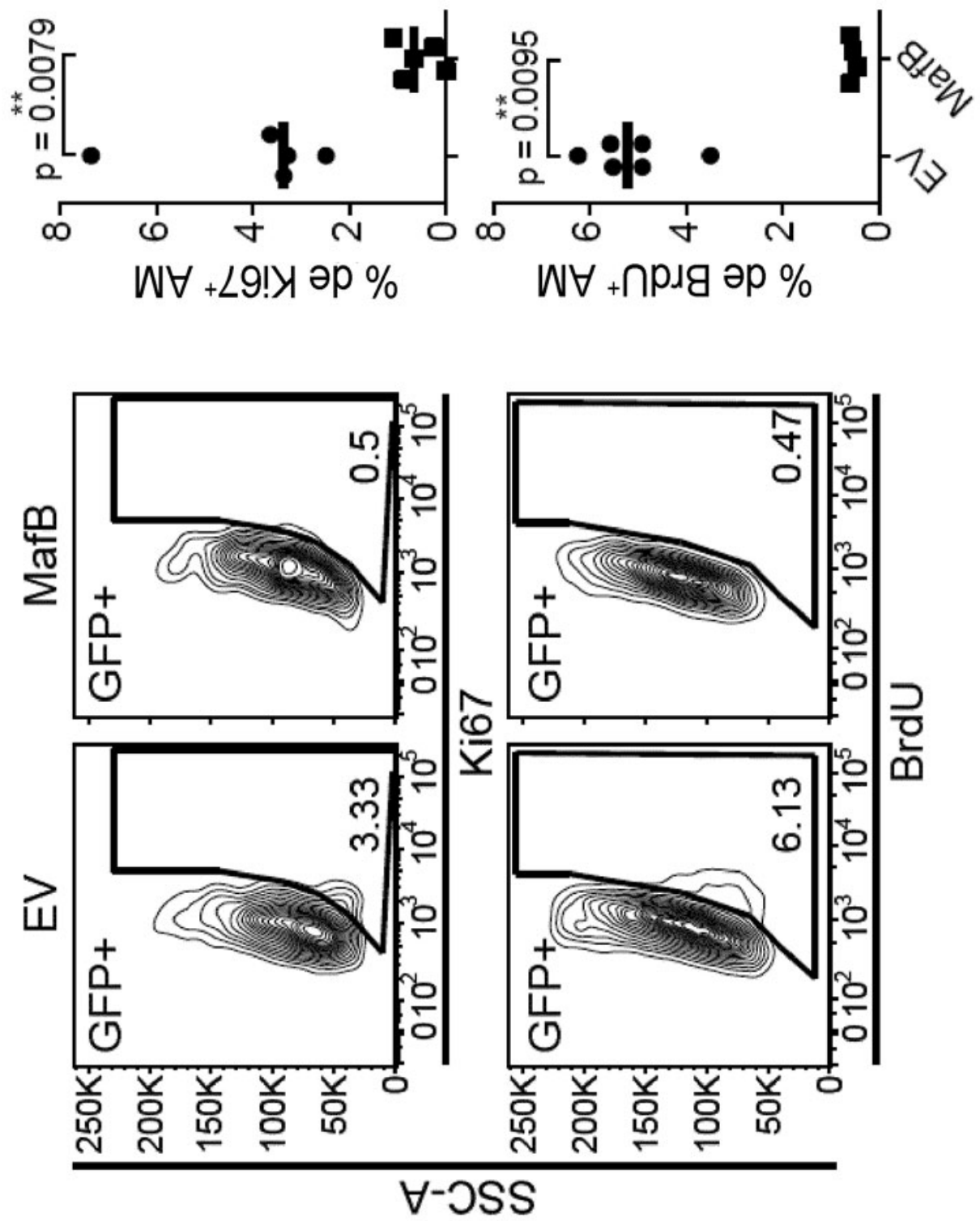


Figura 3D

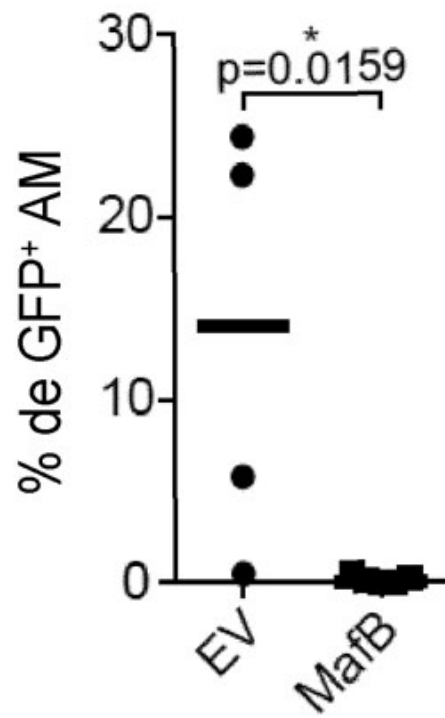
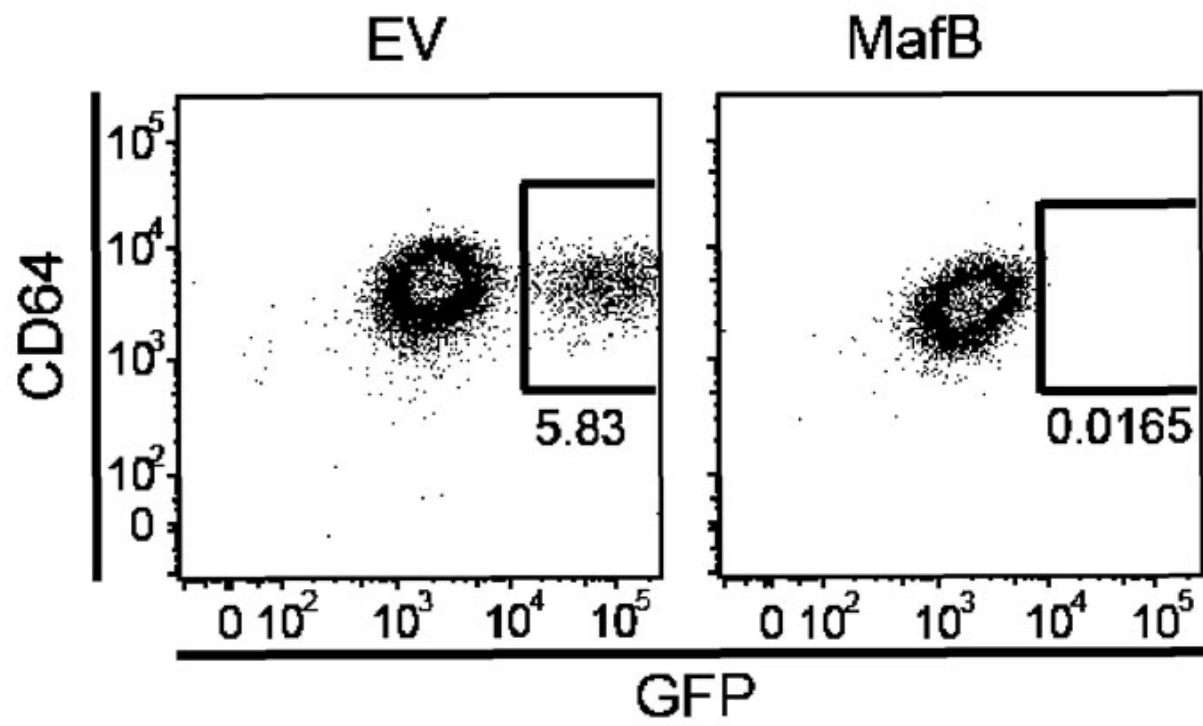


Figura 3E

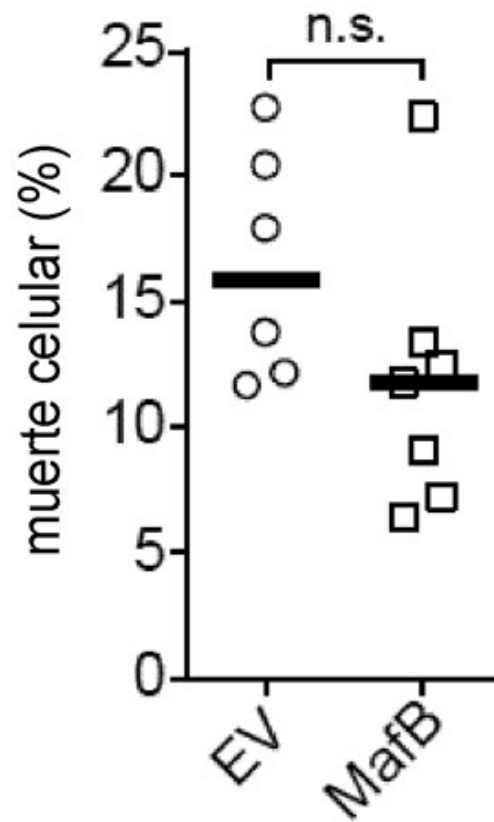


Figura 3F

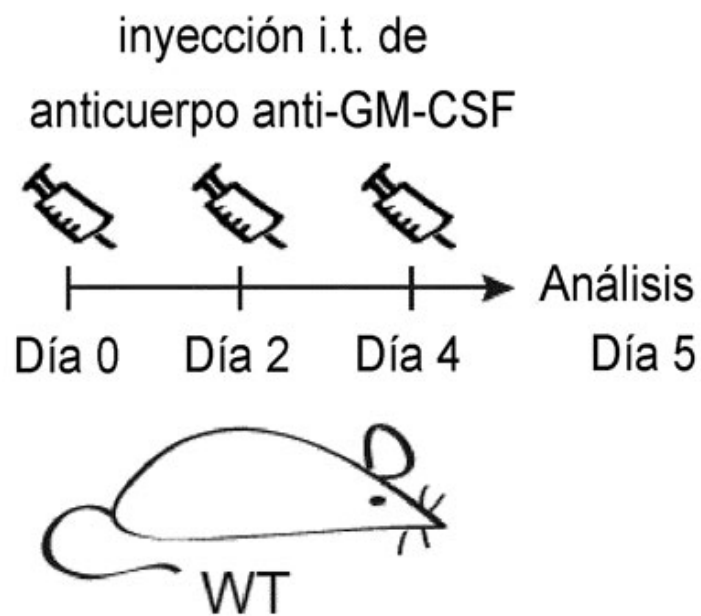


Figura 4A

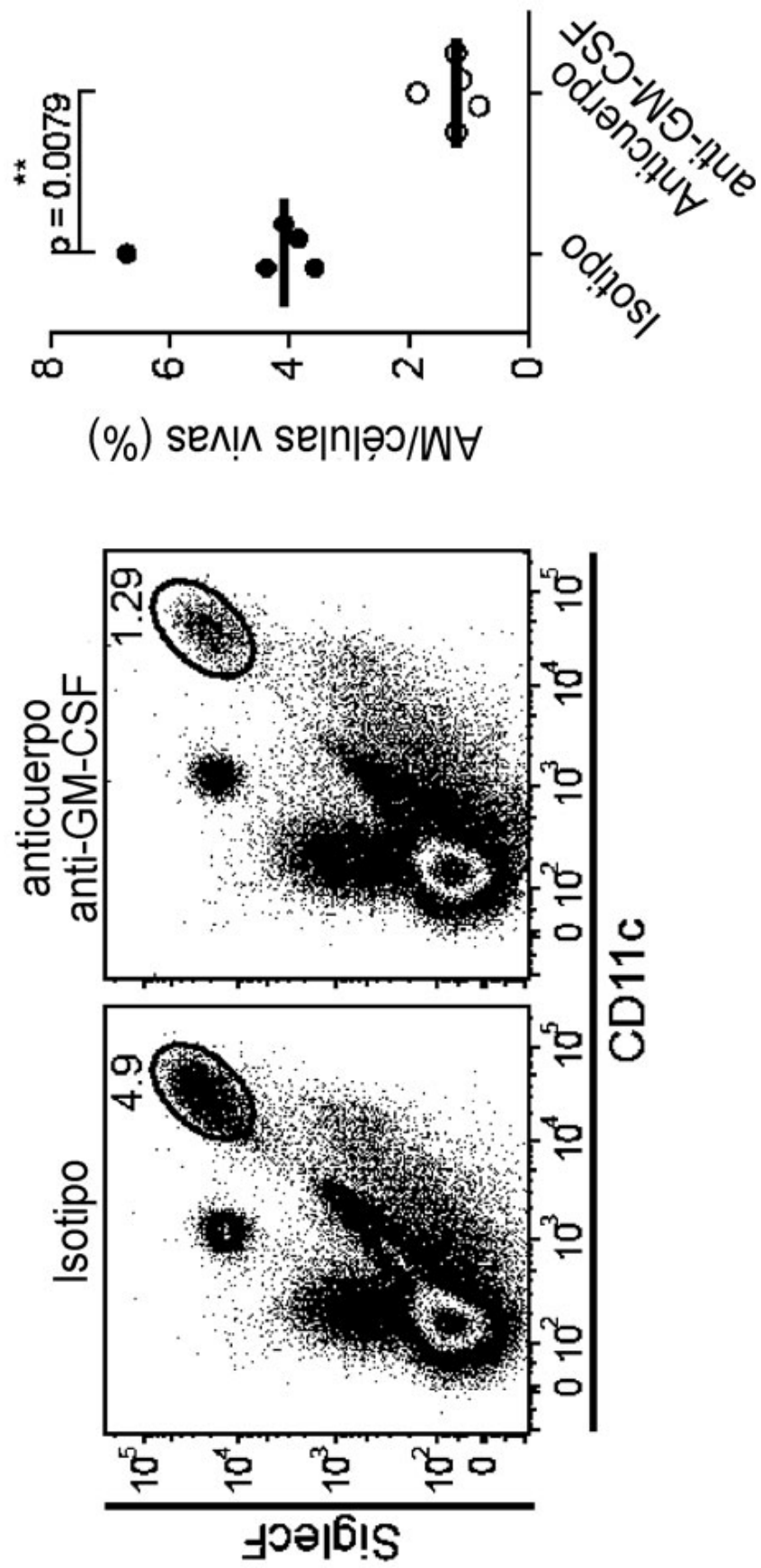


Figura 4B

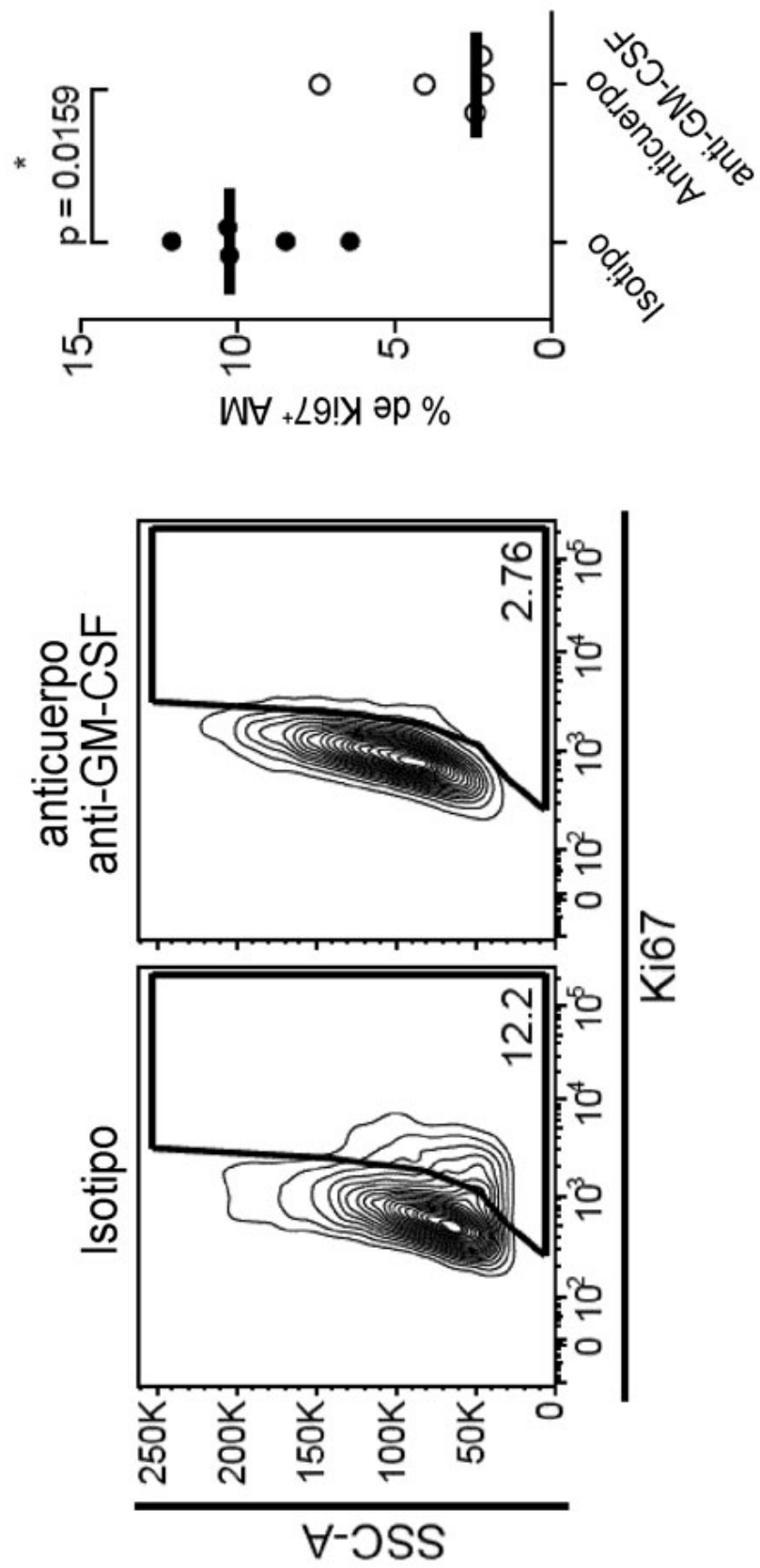


Figura 4C

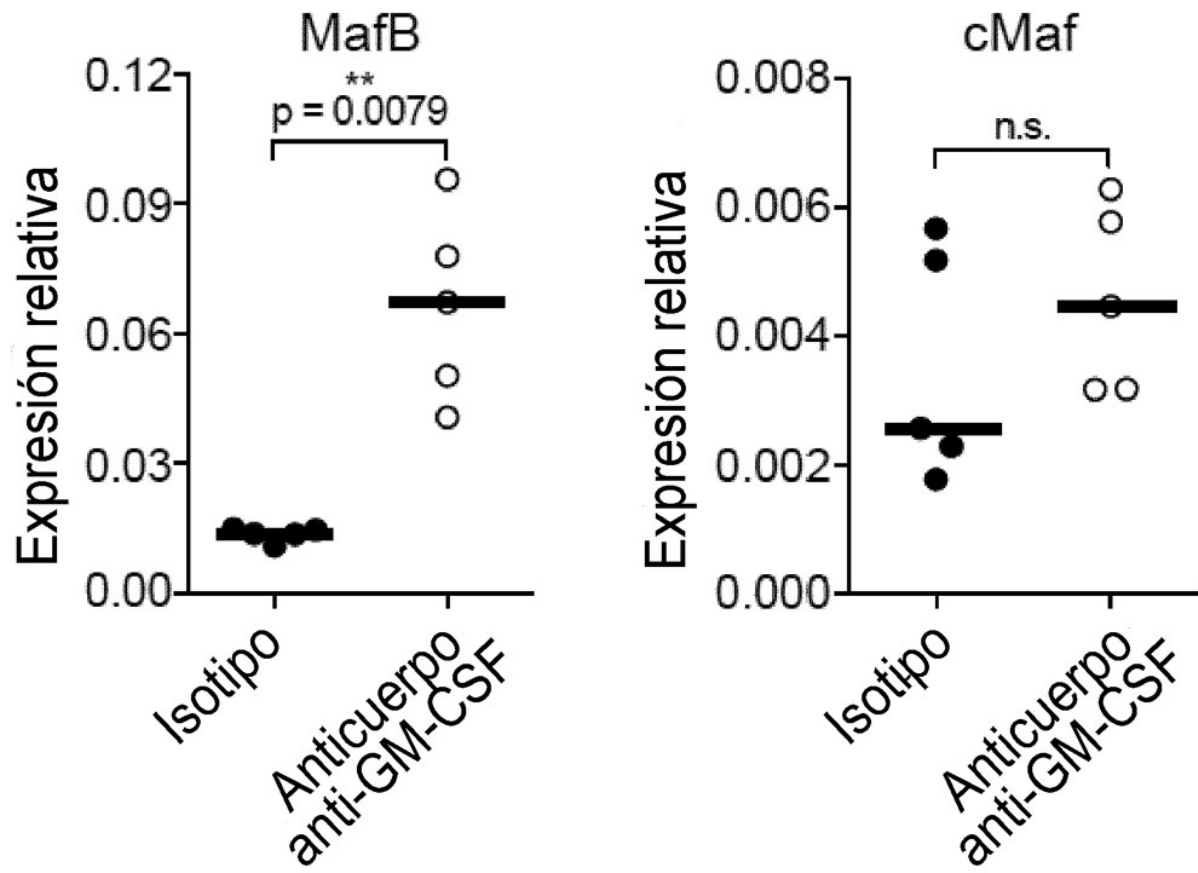


Figura 4D

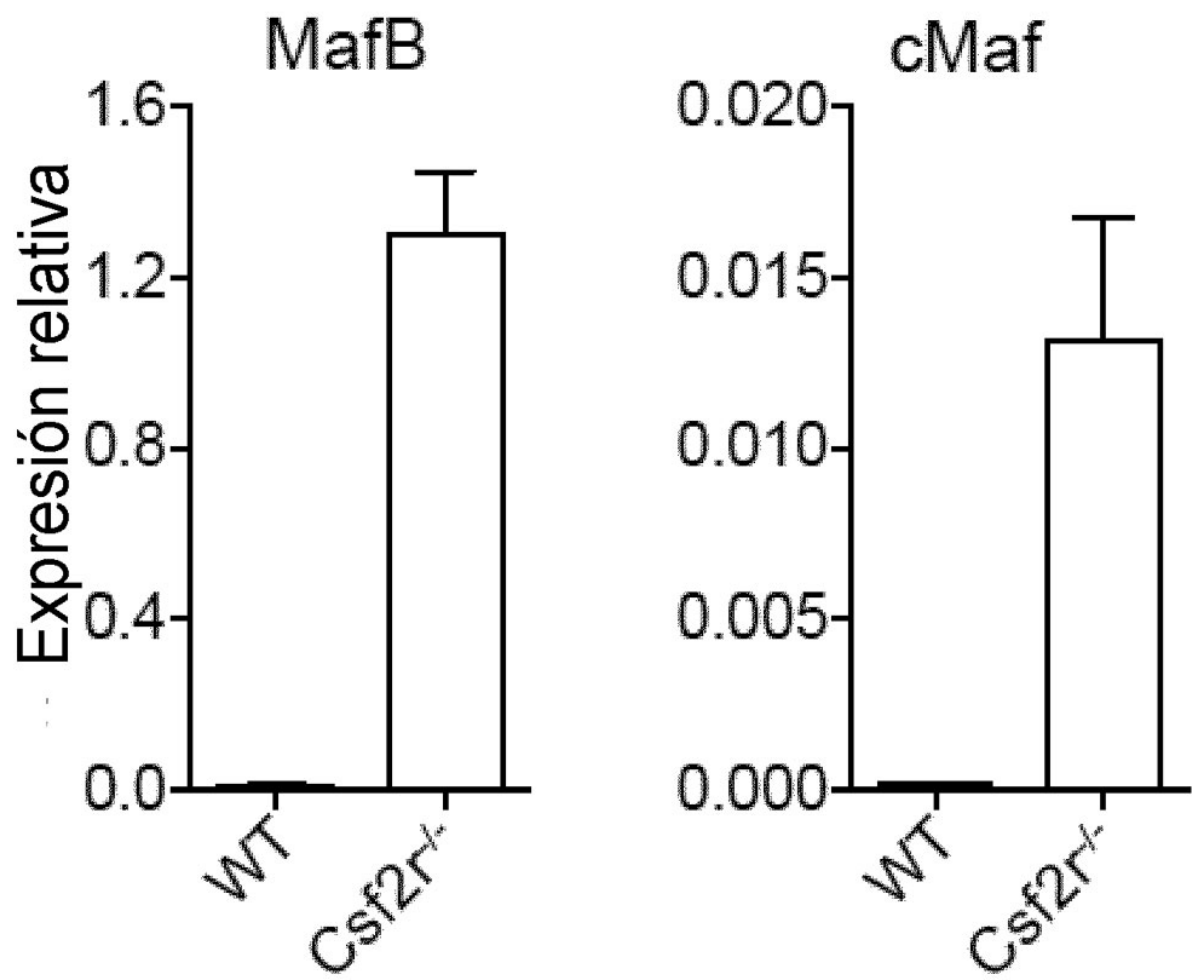


Figura 4E

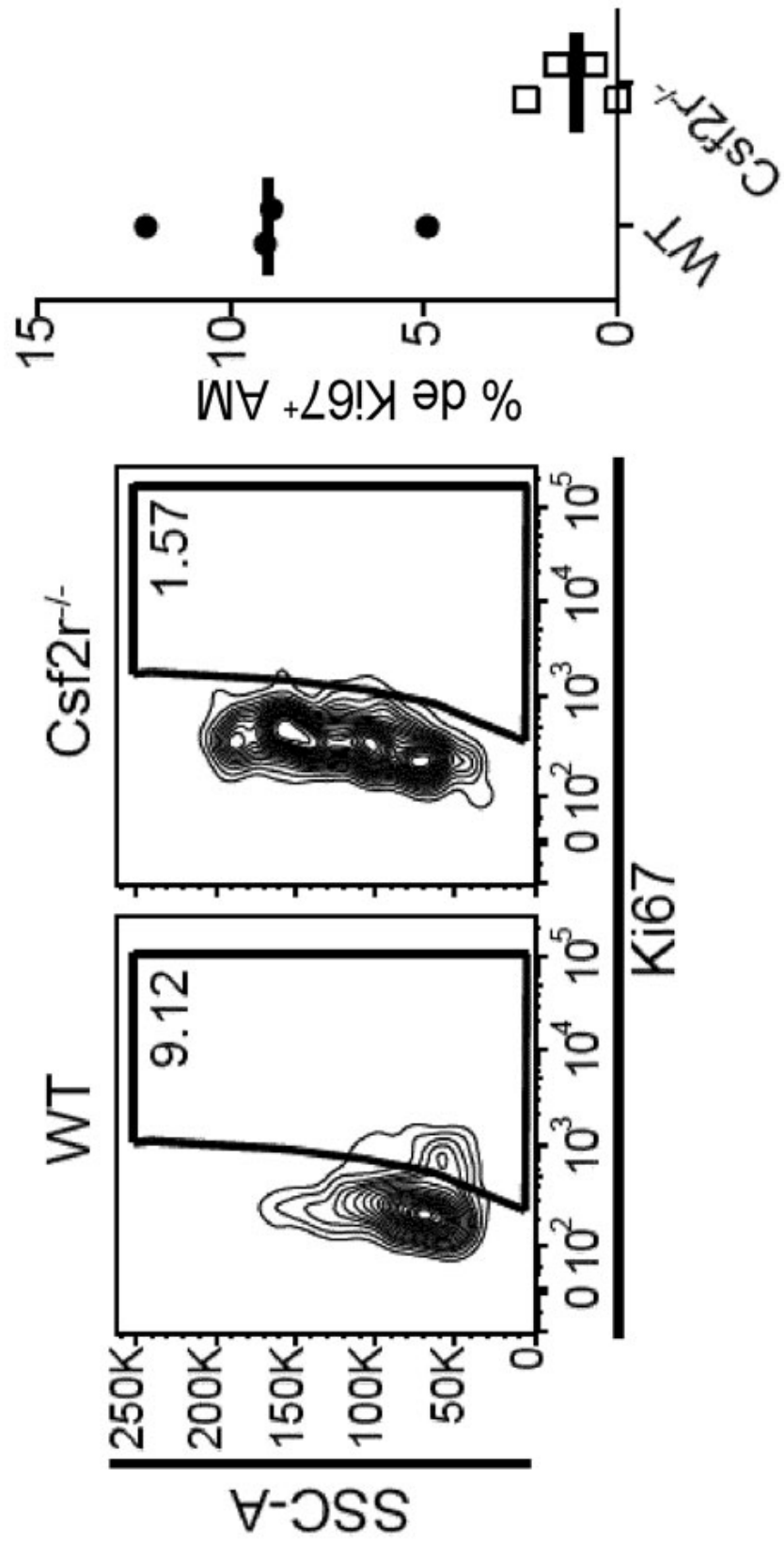


Figura 4F