

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 444**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2015 PCT/EP2015/066407**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16009041**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2015 E 15738908 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 3169350**

54 Título: **Un polipéptido de interleucina 34 aislado para uso en la prevención del rechazo de trasplante y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

**17.07.2014 EP 14306165**

**16.06.2015 EP 15305935**

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

**25.04.2019**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET  
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)**

**101, rue de Tolbiac**

**75013 Paris, FR y**

**UNIVERSITE DE NANTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GUILLOMNEAU, CAROLE;**

**ANEGON, IGNACIO y**

**BEZIE, SÉVERINE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 710 444 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Un polipéptido de interleucina 34 aislado para uso en la prevención del rechazo de trasplante y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

**CAMPO:**

5 La invención está en el campo de la inmunoterapia.

**ANTECEDENTES:**

10 La inducción de tolerancia inmunitaria es una potente herramienta para controlar respuestas inmunitarias causantes de situaciones patológicas. Se han descrito citocinas, enzimas que controlan las rutas metabólicas y moléculas de superficie celular capaces de inducir tolerancia. A pesar de estos hallazgos, existen evidencias de otros mecanismos no identificados y es por tanto importante identificar nuevos mediadores de la tolerancia inmunitaria.

15 El trasplante de órganos ha mostrado mejoras muy significativas tanto en la prevención como en el tratamiento de rechazo agudo, pero los episodios subclínicos y la disfunción crónica de injerto siguen afectando en gran medida la supervivencia del injerto a medio y largo plazo (1). Las estrategias terapéuticas emergentes, entre ellas inducción de tolerancia ante antígenos del donante, están trasladándose a la clínica después de años de trabajo en modelos experimentales (2, 3). Entre los mecanismos naturales y las estrategias inductivas de tolerancia, diferentes tipos de células reguladoras están entre las más prometedoras (4). Los linfocitos T reguladores CD8<sup>+</sup> (Treg CD8<sup>+</sup>) en el campo de los trasplantes, pero también en otras situaciones patofisiológicas, se han destacado en los últimos años (5-8). También se han descrito citocinas, enzimas que controlan las rutas metabólicas, y moléculas de superficie celular capaces de inducir tolerancia como nuevos mediadores de tolerancia inmunitaria.

20 Una nueva citocina llamada IL-34 se identificó en 2008 (9). Los estudios mostraron que IL-34 comparte homología con M-CSF y actúa a través de un receptor común, CD115, también llamado CSF-1R (9), expresado sobre la superficie celular de monocitos, y en el cerebro a través de un receptor nuevo descrito, proteína-tirosina fosfatasa ζ de tipo receptor (PTP-ζ) (10). Sin embargo, los estudios han demostrado que IL-34 y M-CSF presentaban distinta actividad biológica y activación de señal (11), probablemente debido a la expresión espacial y temporal diferencial de IL-34 y M-CSF (12). La función de IL-34 se ha relacionado principalmente hasta ahora con la supervivencia y función de monocitos y macrófagos (osteoclastos, microglía) así como DC (12). Los datos sobre la expresión de IL-34 en células en reposo se superponían parcialmente, puesto que los ratones con GFP bajo el control del promotor de IL-34 mostraban queratinocitos, folículos pilosos, neuronas, células de túbulo renal proximal y células germinales de túbulo seminífero positivos (12), mientras que los análisis de ARNm y proteína mostraban corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñón, bazo, timo, testículos, ovarios, próstata, colon e intestino delgado y abundante expresión de proteína en pulpa roja de bazo y osteoclastos (9). Tras la inflamación, otras células tales como fibroblastos (13), osteoclastos (14) y células sinoviales articulares (13) regulaban positivamente la expresión de IL-34. Hasta ahora, no se ha descrito ni demostrado la expresión de IL-34 por otras células linfoides y particularmente linfocitos T. De forma similar, no se ha ligado IL-34 con efectos sobre la función inmunitaria de DC o linfocitos T, puesto que la respuesta disminuida ante antígenos de DTH o infecciones víricas del SNC en ratones deficientes de IL-34 estaba ligada a la escasez de células de Langerhan y microglía en piel y SNC, respectivamente (12). Finalmente, no hay hasta la fecha una descripción del papel de IL-34 en la tolerancia en trasplantes.

40 En un modelo de aloinjerto cardiaco en ratas, se ha mostrado anteriormente que el bloqueo de CD40-CD40L, por tratamiento con CD40Ig, induce la supervivencia del injerto a largo plazo mediante la generación de Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> (denominados Treg CD8<sup>+</sup>CD40Ig) (15). Se ha mostrado también que estos Treg CD8<sup>+</sup> imponen tolerancia alógena parcialmente mediante la producción de IFNγ y proteína de tipo fibrinógeno 2 (FGL2) (15, 16) y el reconocimiento de un péptido donante derivado de MHC-II dominante (17). Se sospechó en primer lugar un papel potencial para FGL2 como mecanismo tolerogénico inmunitario cuando la comparación transcriptómica pangenómica de Treg CD8<sup>+</sup>CD40Ig frente a Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> de ratas no expuestas mostró una expresión de FGL2 aumentada (16). El mismo análisis transcriptómico reveló que IL-34 se sobreexpresaba en Treg CD8<sup>+</sup>CD40Ig de receptores a largo plazo frente a Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> de animales no expuestos.

50 Por lo tanto, a pesar de los considerables avances en la prevención del rechazo de trasplante, tal patología sigue asociada a una alta morbilidad y mortalidad y existe una necesidad desesperada de nuevos mediadores de tolerancia inmunitaria y nuevas estrategias inductivas de tolerancia (más particularmente por regulación negativa de las respuestas de linfocitos T) para uso en la prevención o el tratamiento de rechazo de trasplante (o para uso en la inducción de tolerancia a trasplantes) así como enfermedades autoinmunitarias, respuestas inmunitarias indeseadas contra proteínas expresadas en el transcurso de terapia génica y/o proteínas terapéuticas y alergia.

55 Además, existe la necesidad de un biomarcador fácilmente medible que prediga el riesgo de rechazo de trasplante. Tal biomarcador sería por tanto útil para monitorizar los pacientes trasplantados, y también para ajustar su tratamiento inmunosupresor.

Hasta ahora, ningún estudio ha examinado si IL-34 podría inducir tolerancia inmunitaria y predecir si un paciente trasplantado es tolerante o no (presentando por tanto un riesgo aumentado de rechazo de trasplante y requiriendo por

lo tanto un tratamiento inmunosupresor apropiado). De forma similar, IL-34 no se ha ligado con efectos sobre la función inmunitaria de DC o linfocitos T y su potencial supresor en trasplantes no se ha sospechado ni estudiado nunca. Por el contrario, el documento WO2014/036357 divulga el uso de anticuerpos dirigidos a IL-34 para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Se reseñó también que IL-34 aumenta en artritis reumatoide y está implicada en el síndrome de Sjogren (YAMING WANG ET AL: "Interkeukin-34, a cytokine crucial for the differentiation and maintenance of tissue resident macrophages and Langerhans cells", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 44, nº 6, 22 de mayo de 2014 (22-05-2014), páginas 1575-1581).

**COMPENDIO:**

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

- Un polipéptido de interleucina 34 (IL-34) aislado o un polinucleótido que codifica el mismo para uso en la inducción de tolerancia inmunitaria en un paciente necesitado de ello;
- un polipéptido de IL-34 aislado o un polinucleótido que codifica el mismo para uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplante en un paciente necesitado de ello;
- un polipéptido de IL-34 aislado o un polinucleótido que codifica el mismo para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, respuesta inmunitaria indeseada contra proteínas terapéuticas y alergias en un paciente necesitado de ello;
- una composición farmacéutica o una composición de kit de piezas que comprende un polipéptido de IL-34 aislado o un polinucleótido que codifica el mismo y un fármaco inmunosupresor y
- un método *in vitro* para determinar si un paciente está en riesgo de rechazo de trasplante, enfermedades autoinmunitarias, respuesta inmunitaria indeseada contra proteínas terapéuticas o alergias, que comprende una etapa de determinación del nivel de expresión de IL-34 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que la presencia de IL-34 es indicativa de un riesgo reducido de rechazo de trasplante, enfermedades autoinmunitarias, respuesta inmunitaria indeseada contra proteínas terapéuticas o alergias.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA:**

Los inventores demostraron que IL-34 induce inmunosupresión, inhibe respuestas de linfocitos T primarios e induce tolerancia de linfocitos T. Este enfoque es de interés en los campos de autoinmunidad, alergia, trasplantes, tratamiento con proteínas terapéuticas y terapia génica para evitar la degradación de moléculas/tejidos propios o terapéuticos por el sistema inmunitario.

Los inventores demostraron por primera vez la implicación de IL-34 en la función inmunosupresora de Treg CD8<sup>+</sup> *in vitro*. El bloqueo de su receptor CD115, expresado exclusivamente en células mieloides, revertía el efecto supresor de IL-34 sobre la proliferación de linfocitos CD4<sup>+</sup> efectores ante pDC, sugiriendo una supresión indirecta de la respuesta de linfocitos T a través de pDC. Mostraron por primera vez que la sobreexpresión de IL-34 induce células reguladoras *in vivo*, capaces de tolerancia infecciosa. Por consiguiente, identificaron a IL-34 como un nuevo mediador de la supresión por Treg CD8<sup>+</sup>, y como una citocina tolerogénica que inhibe eficazmente el rechazo de aloinjerto.

Los inventores demostraron también que una combinación que comprende IL-34 y un tratamiento inmunosupresor a corto plazo subóptimo (rapamicina) posibilita un aumento sinérgico de la supervivencia del injerto a largo plazo frente a cada tratamiento separadamente. Evaluaron por tanto el potencial inmunoregulador de esta citocina en trasplantes usando sobreexpresión mediada por AAV y demostraron una prolongación significativa de la supervivencia de aloinjerto en asociación con una tanda corta de 10 días de dosis subóptima de rapamicina, conduciendo a un 75 % de supervivencia indefinida, con inhibición total de la producción de aloanticuerpos.

Los inventores demostraron además que IL-34 es útil como biomarcador para predecir el riesgo de rechazo de trasplante.

**Métodos y usos terapéuticos:**

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas y de kit de piezas) para uso en la inducción y/o mantenimiento de tolerancia inmunitaria en un paciente necesitado de ello.

La presente divulgación proporciona también métodos y composiciones para uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplante en un paciente necesitado de ello.

La presente divulgación proporciona además métodos y composiciones para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, respuestas aloinmunitarias y alergias en un paciente necesitado de ello.

En un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a un polipéptido de interleucina 34 (IL-34) aislado para uso en la inducción y/o el mantenimiento de tolerancia inmunitaria en un paciente necesitado de ello.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "tolerancia inmunitaria" hace referencia a un estado de insensibilidad del sistema inmunitario ante sustancias o tejidos que tienen la capacidad de desencadenar una respuesta inmunitaria.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión “respuesta inmunitaria” incluye respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T y/o mediadas por linfocitos B. Las respuestas inmunitarias ejemplares incluyen respuestas de linfocitos T, p. ej. producción de citocina y citotoxicidad celular, además, la expresión respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias que se efectúan indirectamente por la activación de linfocitos T, p. ej. producción de anticuerpos (respuestas humorales) y activación de células sensibles a citocinas, p. ej. macrófagos. Las células inmunitarias implicadas en la respuesta inmunitaria incluyen linfocitos tales como linfocitos B y linfocitos T (células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Th1 y Th2); células presentadoras de antígeno (p. ej., células presentadoras de antígeno profesionales tales como células dendríticas); linfocitos citotóxicos naturales; células mieloides tales como macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

10 Por ejemplo, las respuestas inmunitarias están implicadas en el rechazo de trasplante, así como en el resultado fisiológico concomitante de tales respuestas inmunitarias tal como, por ejemplo, fibrosis intersticial, arteriosclerosis de injerto crónica o vasculitis. Las respuestas inmunitarias están también implicadas en enfermedades autoinmunitarias y en el resultado fisiológico concomitante de tales respuestas inmunitarias, incluyendo infiltración dependiente de linfocitos T y lesión de tejido directa, reclutamiento dependiente de linfocitos T y activación de macrófagos y otras  
15 células efectoras y respuestas de linfocitos B dependientes de linfocitos T que conducen a la producción de autoanticuerpos.

20 Por tanto, los pacientes tratados con un polipéptido de IL-34 en comparación con los pacientes no tratados presentan los siguientes rasgos fisiológicos: a) un nivel disminuido de respuesta inmunitaria (específica o no) (que se cree que está mediada en parte por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> efectores específicos de antígeno); b) un retardo en el inicio o la progresión de una respuesta inmunitaria (específica o no); o c) un riesgo reducido de inicio o progresión de una respuesta inmunitaria (específica o no). Como se usa en la presente memoria, el término tolerancia inmunitaria “específica” aparece cuando se provoca preferentemente tolerancia inmunitaria ante ciertos antígenos en comparación con otros.

25 Se entiende por “paciente necesitado de ello” un individuo que padece o es susceptible de padecer rechazo de trasplante, enfermedades autoinmunitarias, respuestas aloinmunitarias o alergias para tratar. Los individuos para tratar en el marco de la presente divulgación son mamíferos, preferiblemente seres humanos.

En una realización particular, el paciente necesitado de ello es un paciente sometido a trasplante.

En un segundo aspecto, la presente divulgación se refiere a un polipéptido de IL-34 aislado para uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplante en un paciente necesitado de ello.

30 Como se usa en la presente memoria, la expresión “prevenir o reducir el rechazo de trasplante” pretende englobar la prevención o inhibición del rechazo inmunitario de trasplante, así como el retardo del inicio o progresión del rechazo inmunitario de trasplante. La expresión pretende también englobar la prolongación de la supervivencia de un trasplante en un paciente o la reversión del fracaso de un trasplante en un paciente. Además, la expresión pretende englobar la mejora de un síntoma de un rechazo inmunitario de trasplante incluyendo, por ejemplo, la mejora de una complicación inmunológica asociada a rechazo inmunitario tal como, por ejemplo, fibrosis intersticial, aterosclerosis crónica de injerto o vasculitis.  
35

40 Como se usa en la presente memoria, la expresión “rechazo de trasplante” engloba tanto rechazo de trasplante agudo como crónico. “Rechazo agudo” es el rechazo por el sistema inmunitario de un receptor de trasplante de tejido cuando el tejido trasplantado es inmunológicamente ajeno. El rechazo agudo se caracteriza por la infiltración del tejido de trasplante por células inmunitarias del receptor, que llevan a cabo su función efectora y destruyen el tejido de trasplante. El inicio del rechazo agudo es rápido y aparece generalmente en seres humanos al cabo de pocas semanas después de la cirugía de trasplante. Generalmente, el rechazo agudo puede inhibirse o suprimirse con fármacos inmunosupresores tales como rapamicina, ciclosporina, anticuerpo monoclonal anti-CD40L y similares. El “rechazo de trasplante crónico” aparece generalmente en seres humanos al cabo de varios meses a años después del injerto, incluso en presencia de inmunosupresión exitosa del rechazo agudo. La fibrosis es un factor común en el rechazo  
45 crónico de todos los tipos de trasplantes de órganos.

50 El término “trasplante” y variaciones del mismo hacen referencia a la inserción de un trasplante (también llamado injerto) en un receptor, ya sea el trasplante singénico (donde donante y receptor son genéticamente idénticos), alogénico (donde donante y receptor son de orígenes genéticos diferentes pero de la misma especie) o xenogénico (donde donante y receptor son de diferentes especies). Por tanto, en un escenario típico, el hospedador es humano y el injerto es un isoinjerto, derivado de un ser humano del mismo o diferente origen genético. En otro escenario, el injerto deriva de una especie diferente de en la que se trasplanta, incluyendo animales de especies ampliamente separadas filogenéticamente, por ejemplo un corazón de mandril trasplantado a un hospedador humano.

55 En una realización, el donante del trasplante es un ser humano. El donante del trasplante puede ser un donante vivo o un donante fallecido, a saber un donante cadáver.

En una realización, el trasplante es un órgano, un tejido o células.

Como se usa en la presente memoria, el término “órgano” hace referencia a un órgano vascularizado sólido que

- efectúa una función específica o grupo de funciones en un organismo. El término órgano incluyen, pero sin limitación corazón, pulmón, riñón, hígado, páncreas, piel, útero, hueso, cartílago, intestino delgado o grueso, vejiga, cerebro, mama, vasos sanguíneos, esófago, trompa de Falopio, vesícula, ovarios, páncreas, próstata, placenta, médula espinal, miembros incluyendo superiores e inferiores, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, uréter, uretra y útero.
- 5 Como se usa en la presente memoria, el término “tejido” hace referencia a cualquier tipo de tejido en ser humano o animales e incluye, pero sin limitación, tejido vascular, tejido cutáneo, tejido hepático, tejido pancreático, tejido neural, tejido urogenital, tejido gastrointestinal, tejido esquelético incluyendo hueso y cartílago, tejido adiposo, tejido conectivo incluyendo tendones y ligamentos, tejido amniótico, tejido coriónico, dura, pericardio, tejido muscular, tejido glandular, tejido facial y tejido oftálmico.
- 10 En una realización particular, el rechazo de trasplante es rechazo de alotrasplante cardiaco.
- Como se usa en la presente memoria, el término “células” hace referencia a una composición enriquecida en células de interés, preferiblemente una composición que comprende al menos un 30 %, preferiblemente al menos un 50 %, incluso más preferiblemente al menos un 65 % de dichas células.
- 15 En ciertas realizaciones, las células se seleccionan del grupo consistente en citoblastos hematopoyéticos multipotentes derivados de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical o células diferenciadas derivadas de citoblastos pluripotentes (concretamente, citoblastos embrionarios (ES) o citoblastos pluripotentes inducidos (iPS)) o multipotentes de diferentes linajes celulares tales como cardiomiocitos, células beta pancreáticas, hepatocitos, neuronas, etc.
- 20 En una realización, la composición celular se usa para trasplante de citoblastos hematopoyéticos alogénicos (HSCT) y por tanto comprende citoblastos hematopoyéticos multipotentes, habitualmente derivados de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical.
- El HSCT puede ser curativo para pacientes con leucemia y linfomas. Sin embargo, es una limitación importante del HCT alogénico el desarrollo de enfermedad de injerto contra hospedador (EICH), que aparece en forma grave en aproximadamente un 30-50 % de los seres humanos que reciben esta terapia.
- 25 Los polipéptidos de la presente divulgación son útiles en la prevención o reducción de la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH).
- Por consiguiente, en una realización, el paciente necesitado de ello está afectado por una enfermedad seleccionada del grupo consistente en leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC), síndrome mielodisplásico (SMD)/síndrome mieloproliferativo, linfomas tales como linfomas de Hodgkin y no de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (LLC) y mieloma múltiple.
- 30 En un tercer aspecto, la presente divulgación se refiere a un polipéptido de IL-34 aislado para uso en la prevención o tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, respuestas inmunitarias indeseadas contra proteínas expresadas en el transcurso de terapia génica o proteínas terapéuticas y alergias en un paciente de las mismas.
- 35 Como se usan en la presente memoria, los términos “previenen”, “prevenir” y “prevención” hacen referencia a la administración de terapia a un individuo que puede manifestar en última instancia al menos un síntoma de una enfermedad, trastorno o afección, pero que todavía no lo ha hecho, para reducir la posibilidad de que el individuo desarrolle el síntoma de la enfermedad, trastorno o afección durante un periodo dado de tiempo. Tal reducción puede reflejarse, por ejemplo, en un inicio retardado de al menos un síntoma de la enfermedad, trastorno o afección en el paciente.
- 40 Como se usan en la presente memoria, los términos “tratan”, “tratar” o “tratamiento” hacen referencia a la administración de terapia a un individuo en un intento por reducir la frecuencia y/o gravedad de los síntomas de una enfermedad, trastorno o afección adversa de un paciente.
- 45 Como se usa en la presente memoria, la expresión “enfermedad autoinmunitaria” hace referencia a una enfermedad en que el sistema inmunitario produce una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta de linfocitos B o linfocitos T) contra un antígeno que es parte del hospedador normal (es decir, un autoantígeno), con posterior lesión de tejidos. En una enfermedad autoinmunitaria, el sistema inmunitario del hospedador no consigue reconocer un antígeno particular como “propio” y se monta una reacción inmunitaria contra los tejidos del hospedador que expresan el antígeno.
- 50 Las enfermedades autoinmunitarias ejemplares que afectan a seres humanos incluyen artritis reumatoide, oligoartritis juvenil, artritis inducida por colágeno, artritis inducida por coadyuvante, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, encefalomielite autoinmunitaria experimental, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), atrofia gástrica autoinmunitaria, pénfigo vulgar, psoriasis, vitíligo, diabetes de tipo 1, diabetes en no obesos, miastenia grave, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, colangitis esclerosante, sialadenitis esclerosante, lupus sistémico eritematoso, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, hemofilia adquirida, púrpura trombocitopénica trombótica y similares.
- 55

Como se usa en la presente memoria, el término “respuesta inmunitaria indeseada contra una proteína terapéutica” hace referencia a cualquier reacción inmunitaria indeseada dirigida a proteínas expresadas en el transcurso de terapia génica y/o proteínas terapéuticas tales como factor VIII (hemofilia A) y otros factores de coagulación, terapias de sustitución hormonal, anticuerpos monoclonales (p. ej., natalizumab, rituximab, infliximab), anticuerpos policlonales, enzimas o citocinas (p. ej. IFN-β).

Por ejemplo, este enfoque puede aplicarse de hecho a suprimir una respuesta inmunitaria, especialmente para prevenir reacciones inmunitarias ante proteínas específicas cuando se restaura su expresión por terapia génica en individuos con las correspondientes deficiencias genéticas. Por tanto, un polipéptido de IL-34 aislado según la presente divulgación puede usarse para prevenir la reactividad inmunitaria hacia proteínas normalmente ausentes en el paciente debido a mutaciones, mientras que se consigue su reconstitución por terapia génica.

Además, la terapia de proteínas es un área de innovación médica que se está volviendo más generalizada, e implica la aplicación de proteínas, tales como enzimas, anticuerpos o citocinas, directamente a pacientes como productos terapéuticos. Uno de los obstáculos principales en el suministro de tales medicamentos implica las respuestas inmunitarias dirigidas contra la proteína terapéutica misma. La administración de terapias basadas en proteína está a menudo acompañada por la administración de inmunosupresores, que se usan para facilitar una vida útil más larga de la proteína y por lo tanto una captación aumentada de la proteína en las células y tejidos del organismo. Los inmunosupresores generales pueden ser sin embargo desventajosos debido a la naturaleza inespecífica de la inmunosupresión que se lleva a cabo, dando como resultado efectos secundarios indeseados en el paciente. Por lo tanto, este enfoque puede aplicarse a suprimir una respuesta inmunitaria contra proteínas y péptidos terapéuticos, tales como anticuerpos terapéuticos, citocinas, enzimas o cualquier otra proteína administrada a un paciente.

Como se usa en la presente memoria, el término “alergia” o “alergias” hace referencia a un trastorno (o reacción incorrecta) del sistema inmunitario. Las reacciones alérgicas aparecen ante sustancias ambientales normalmente inocuas conocidas como alérgenos; estas reacciones son adquiridas, predecibles y rápidas. Estrictamente, la alergia es una de las cuatro formas de hipersensibilidad y se llama hipersensibilidad de tipo I (o inmediata). Se caracteriza por una activación excesiva de ciertos glóbulos blancos llamados mastocitos y basófilos por un tipo de anticuerpo conocido como IgE, dando como resultado una respuesta inflamatoria extrema. Las reacciones alérgicas comunes incluyen eczema, urticaria, fiebre del heno, asma, alergias alimentarias y reacciones al veneno de insectos picadores tales como avispas y abejas.

Como se usan en la presente memoria, las expresiones “polipéptido de interleucina 34” o “polipéptido de IL-34” son bien conocidas en la materia y hacen referencia a una citocina que promueve la proliferación, supervivencia y diferenciación de monocitos y macrófagos. La expresión incluye isoformas de IL-34 de origen natural (p. ej. Q6ZMJ4 y Q6ZMJ4-2 con y sin Q81), variantes (p. ej. las variantes rs8046424 y rs7206509) y formas modificadas de las mismas. La proteína IL-34 humana de origen natural tiene una secuencia aminoacídica de 242 aminoácidos proporcionada en la base de datos UniProt con el número de acceso Q6ZMJ4 y se muestra como sigue (SEQ ID NO: 1) o un polipéptido que tiene una secuencia al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 1:

MPRGFTWLRYLGI FLGVALGNEPLEMWPLTQNEECTVTGFLRDKLQYRSRLQ  
 YMKHYFPINYKISVPYEGVFRIANVTRLQRAQVSERELRYLWVLVSLSATSVQDVL  
 LEGHPSWKYLQEVETLLLNVQQGLTDVEVSPKVESVLSLLNAPGPNLKLVRPKALLD  
 NCFRVMELLYCSCCKQSSVLNWQDCEVPSPQSCSPEPSLQYAATQLYPPPPWSPSSPP  
 HSTGSRVPVRAQGEGLLP

Como se usa en la presente memoria, el término “polipéptido” hace referencia a un polímeros de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sea producido de forma natural o sintética, que no tiene una longitud específica. Por tanto, los péptidos, oligopéptidos y proteínas se incluyen en la definición de polipéptido y estos términos se usan intercambiabilmente a lo largo de la memoria descriptiva, así como en las reivindicaciones. El término polipéptido no excluye modificaciones postraduccionales que incluyen, pero sin limitación, fosforilación, acetilación, glicosilación y similares. El término se aplica también a polímeros de aminoácidos en que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y un polímero de aminoácidos de origen no natural.

Se entiende por un polipéptido “aislado” que el polipéptido no está presente en un organismo vivo, p. ej. en el cuerpo humano. Sin embargo, el polipéptido aislado puede ser parte de una composición o un kit. El polipéptido aislado está preferiblemente purificado. Tal polipéptido está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteicas asociadas al polipéptido en la naturaleza. Típicamente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, concretamente al menos aproximadamente un 80 % pura, al menos aproximadamente un 90 % pura, al menos aproximadamente un 95 % pura,

más de un 95 % pura tal como un 96 %, 97 % o 98 % o más pura, o más de un 99 % pura. Un modo de mostrar que una preparación de proteína particular contiene un polipéptido aislado es por la aparición de una única banda después de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de la preparación de proteína y tinción con azul brillante de Coomassie del gel.

5 La expresión “polipéptido de IL-34” se define en la presente memoria por incluir el polipéptido de IL-34 humano de origen natural y las variaciones alélicas de origen natural del polipéptido. Las variaciones alélicas son cambios de base de origen natural en la población de la especie que pueden dar como resultado un cambio de aminoácido o no en un polipéptido o proteína. Adicionalmente, los polipéptidos de IL-34 según la presente divulgación no solo engloban polipéptidos que comprenden o consisten en IL-34 de longitud completa y variantes de la misma, sino también  
10 polipéptidos consistentes en fragmentos de la misma, a condición de que los fragmentos sean biológicamente activos. Están incluidos adicionalmente en esta definición las versiones tanto recombinante como sintética del polipéptido de IL-34, que pueden contener modificaciones inducidas en el polipéptido y secuencias de ADN del mismo. Por consiguiente, la expresión polipéptido de IL-34 pretende englobar los equivalentes funcionales del polipéptido de IL-34 codificado por la secuencia SEQ ID NO: 1.

15 Como se usa en la presente memoria, un “equivalente funcional” hace referencia a una molécula (p. ej., un polipéptido recombinante) que retiene la actividad biológica y especificidad del polipéptido parental. Por lo tanto, la expresión “equivalente funcional del polipéptido de IL-34” incluye variantes y fragmentos del polipéptido al que se hace referencia (concretamente, el polipéptido de IL-34) a condición de que los equivalentes funcionales exhiban al menos una, preferiblemente todas las actividades biológicas del polipéptido de referencia, como se describe a continuación. Los  
20 equivalentes funcionales del polipéptido de IL-34 se han descrito anteriormente (40).

Una “variante” de polipéptido hace referencia a un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia aminoacídica con el polipéptido de secuencia nativa. Tales variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden o eliminan uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N o C del polipéptido. Normalmente, una variante tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia aminoacídica, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia aminoacídica e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia aminoacídica con el polipéptido de secuencia nativa.  
25

Se entiende por un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica al menos, por ejemplo, un 95 % “idéntica” a una secuencia aminoacídica de consulta de la presente divulgación que la secuencia aminoacídica del polipéptido en cuestión sea idéntica a la secuencia de consulta excepto porque la secuencia polipeptídica en cuestión puede incluir hasta 5 alteraciones de aminoácido por cada 100 aminoácidos de la secuencia aminoacídica de consulta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia aminoacídica al menos un 95 % idéntica a una secuencia aminoacídica de consulta, hasta el 5 % (5 de 100) de los residuos aminoacídicos en la secuencia en cuestión pueden insertarse, eliminarse o sustituirse por otro aminoácido.  
30

En el marco de la solicitud, se calcula el porcentaje de identidad usando un alineamiento global (concretamente, se comparan las dos secuencias en su longitud completa). Los métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la materia. Puede usarse, por ejemplo, el programa “Needle”, que usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970 J. Mol. Biol, 48: 443-453) para encontrar el alineamiento óptimo (incluyendo huecos) de dos secuencias cuando se considera su longitud completa.  
35 El programa Needle está por ejemplo disponible en el sitio [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk). El porcentaje de identidad de acuerdo con la presente divulgación se calcula preferiblemente usando el programa EMBOSS::needle (global) con un parámetro de “apertura de hueco” igual a 10,0, un parámetro de “extensión de hueco” igual a 0,5 y una matriz Blosum62.  
40

Los polipéptidos que consisten en una secuencia aminoacídica “al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica” a una secuencia de referencia pueden comprender mutaciones tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. El polipéptido consistente en una secuencia aminoacídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de referencia puede corresponder a una variante alélica de la secuencia de referencia. Puede comprender por ejemplo solo sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. Las sustituciones corresponden preferiblemente a sustituciones conservativas como se indica en la tabla siguiente.  
45

| Sustituciones conservativas            | Tipo de aminoácido   |
|--|--|
| Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp | Aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas alifáticas    |
| Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys                | Aminoácidos con cadenas laterales no cargadas pero polares |
| Asp, Glu                               | Aminoácidos con cadenas laterales ácidas                   |
| Lys, Arg, His                          | Aminoácidos con cadenas laterales básicas                  |
| Gly                                    | Cadena lateral neutra                                      |

5 Como se usa en la presente memoria polipéptido, un “fragmento” hace referencia a un polipéptido biológicamente activo que es más corto que un polipéptido de referencia (concretamente, un fragmento del polipéptido de IL-34). Por tanto, el polipéptido según la presente divulgación engloba polipéptidos que comprenden o consisten en fragmentos de IL-34, a condición de que los fragmentos sean biológicamente activos.

En el marco de la presente divulgación, el fragmento biológicamente activo puede comprender por ejemplo al menos 175, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235 o 240 aminoácidos consecutivos del polipéptido de IL-34.

Se entiende por “actividad biológica” de IL-34 o un equivalente funcional del mismo:

10 (i) la capacidad de inducir y/o mantener (al menos 120 días en rata) la tolerancia inmunitaria (como se describe en la Sección de Ejemplos; concretamente la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en una reacción de linfocitos mixtos (MLR); y/o

(ii) la capacidad de prevenir el rechazo de trasplante en un modelo de alotrasplante de órgano (modelo de alotrasplante cardíaco).

15 El especialista en la materia puede determinar fácilmente si un equivalente funcional del polipéptido de IL-34 es biológicamente activo. Para comprobar si los polipéptidos recién generados inhiben la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en una MLR y/o previenen el rechazo de trasplante en un modelo de alotrasplante de órgano, puede efectuarse un análisis FACS o un análisis de perfil de expresión génica de célula única (véase en la sección de Ejemplos) para cada polipéptido. Además, para comprobar si los polipéptidos recién generados previenen el rechazo de trasplante, puede usarse un modelo de alotrasplante de órgano (véase en la sección de Ejemplos). Adicionalmente, el curso  
20 temporal y la respuesta a la dosis efectuados *in vitro* o *in vivo* (p. ej., usando un modelo de alotrasplante de órgano) determinarán las condiciones óptimas para cada polipéptido.

25 En una realización, los polipéptidos de la presente divulgación pueden comprender un marcaje. Un marcaje es una secuencia que contiene epítipo que puede ser útil para la purificación de los polipéptidos. Se enlaza mediante una variedad de técnicas tales como cromatografía de afinidad, para la localización de dicho polipéptido en una muestra de célula o tejido usando técnicas de inmunomarcaje, la detección de dicho polipéptido por inmunotransferencia, etc. Los ejemplos de marcajes empleados comúnmente en la materia son el marcaje GST (glutatión-S-transferasa), el marcaje FLAG<sup>™</sup>, el marcaje Strep<sup>™</sup>, marcaje V5, marcaje myc, marcaje His (que consiste típicamente en seis residuos de histidina), etc.

30 En otra realización, los polipéptidos de la presente divulgación pueden comprender modificaciones químicas que mejoran su estabilidad y/o su biodisponibilidad. Tales modificaciones químicas apuntan a obtener polipéptidos con una protección aumentada de los polipéptidos frente a degradación enzimática *in vivo*, y/o una capacidad aumentada de cruzar barreras de membrana, aumentando por tanto su semivida y manteniendo o mejorando su actividad biológica. Puede emplearse cualquier modificación química conocida en la materia según la presente divulgación. Tales modificaciones químicas incluyen, pero sin limitación:

- 35
- Un reemplazo o reemplazos de un aminoácido por un aminoácido modificado y/o inhabitual, p. ej. un reemplazo de un aminoácido por un aminoácido inhabitual como Nle, Nva u Om; y/o
  - modificaciones en los extremos N-terminal y/o C-terminal de los péptidos tales como, p. ej., acilación (preferiblemente acetilación) o desaminación N-terminal, o modificación del grupo carboxilo C-terminal a un grupo amida o alcohol;

40

  - modificaciones en el enlace amida entre dos aminoácidos: acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación (preferiblemente metilación) en el átomo de nitrógeno o el carbono alfa del enlace amida que liga dos aminoácidos;
  - modificaciones en el carbono alfa del enlace amida que liga dos aminoácidos tales como, p. ej., acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación (preferiblemente metilación) en el carbono alfa del enlace amida  
45 que liga dos aminoácidos;
  - cambios de quiralidad tales como, p. ej., reemplazo de uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) por los correspondientes enantiómeros D;
  - retroinversiones en que se reemplazan uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) por los correspondientes enantiómeros D, junto con inversión de la cadena aminoacídica (del extremo C-terminal al  
50 extremo N-terminal);
  - azapéptidos, en que se reemplaza uno o más de los carbonos alfa por átomos de nitrógeno; y/o
  - betapéptidos, en que se une el grupo amino de uno o más aminoácidos al carbono β en lugar de al carbono α.

55 Otra estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros hidrosolubles. Se ha mostrado que diversos polímeros hidrosolubles modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de barreras fisiológicas y modifican la tasa de aclaramiento del cuerpo. Para conseguir un efecto diana o bien de liberación mantenida, se han sintetizado polímeros hidrosolubles que contienen restos



farmacológicos como grupos terminales, como parte del esqueleto o como grupos pendientes en la cadena polimérica.

El polietilenglicol (PEG) se ha usado ampliamente como portador farmacológico, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. Se ha mostrado que el enlazamiento con diversos fármacos, proteínas y liposomas mejora el tiempo de residencia y disminuye la toxicidad. El PEG puede acoplarse con agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y a través de otros métodos químicos; sin embargo, el PEG mismo está limitado a como máximo dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, se exploraron copolímeros de PEG y aminoácidos como biomateriales novedosos que retendrían las propiedades de biocompatibilidad del PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de enlace por molécula (proporcionando mayor carga de fármaco) y que podrían diseñarse sintéticamente para adecuarse a una variedad de aplicaciones.

Los especialistas en la materia son conocedores de las técnicas de PEGilación para la modificación eficaz de fármacos. Por ejemplo, se han usado polímeros de suministro de fármaco que consisten en polímeros alternados de PEG y monómeros trifuncionales tales como lisina por VectraMed (Plainsboro, N.J.). Las cadenas de PEG (típicamente de 2000 dáltones o menos) están ligadas a los grupos amino a y e de la lisina a través de grupos de enlace de uretano estables. Tales copolímeros retienen las propiedades deseables del PEG, mientras que proporcionan grupos pendientes reactivos (los grupos ácido carboxílico de lisina) a intervalos estrictamente controlados y predeterminados a lo largo de la cadena polimérica. Los grupos pendientes reactivos pueden usarse para derivatización, reticulación o conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles en la producción de profármacos estables de larga circulación al variar el peso molecular del polímero, el peso molecular de los segmentos de PEG y el grupo de enlace escindible entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta al espaciado del complejo de fármaco/grupo de enlace y a la cantidad de fármaco por peso molecular de conjugado (los fragmentos de PEG menores proporcionan mayor carga de fármaco). En general, aumentar el peso molecular global del conjugado de copolímero de bloque aumentará la semivida circulatoria del conjugado. No obstante, el conjugado debe ser fácilmente degradable o bien tener un peso molecular por debajo de la filtración glomerular limitante de umbral (p. ej., menor de 60 kDa).

Además de ser importante el esqueleto polimérico en el mantenimiento de la semivida circulatoria y la biodistribución, pueden usarse ligadores para mantener el agente terapéutico en forma de profármaco hasta que se libera del polímero del esqueleto por un desencadenante específico, típicamente actividad enzimática en el tejido diana. Por ejemplo, este tipo de suministro de fármaco activado por tejido es particularmente útil cuando se requiere el suministro a un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico se libera en o cerca del sitio de patología. Las colecciones de grupo ligador para uso en el suministro de fármaco activado son conocidas por los especialistas en la materia y pueden estar basadas en la cinética enzimática, la prevalencia de la enzima activa y la especificidad de escisión de las enzimas específicas de enfermedad seleccionadas. Tales ligadores pueden usarse en la modificación de los polipéptidos descritos en la presente memoria para suministro terapéutico.

En aún otra realización, los polipéptidos de la presente divulgación pueden fusionarse con un polipéptido heterólogo (concretamente, polipéptido derivado de una proteína no relacionada, por ejemplo de una proteína inmunoglobulina).

Como se usa en la presente memoria, los términos "fusionado" y "fusión" se usan intercambiamente. Estos términos hacen referencia a la unión conjunta de dos elementos o componentes más por cualquier medio, incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión en marco" hace referencia a la unión de dos o más marcos abiertos de lectura (ORF) de polinucleótidos para formar un ORF más largo continuo de manera que se mantenga el marco de lectura traduccional correcto de los ORF originales. Por ejemplo, una proteína de fusión recombinante puede ser una proteína única que contiene dos o más segmentos que corresponden a los polipéptidos codificados por los ORF originales (cuyos segmentos no están normalmente unidos así en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace por tanto continuo a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden estar física o espacialmente separados, por ejemplo, por una secuencia ligadora en marco.

Como se usa en la presente memoria, "proteína de fusión de IL-34" hace referencia a un polipéptido que comprende el polipéptido de IL-34 o un equivalente funcional del mismo fusionado con un polipéptido heterólogo. La proteína de fusión de IL-34 compartirá generalmente al menos una propiedad biológica en común con el polipéptido de IL-34 (como se describe anteriormente).

Es un ejemplo de una proteína de fusión de IL-34 una inmunoadhesina de IL-34.

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

La secuencia de inmunoglobulina preferible, pero no necesariamente, es un dominio constante de inmunoglobulina (región Fc). Las inmunoadhesinas pueden poseer muchas de las propiedades químicas y biológicas valiosas de los anticuerpos humanos. Puesto que las inmunoadhesinas pueden construirse a partir de una secuencia de proteína humana con una especificidad deseada ligada con una secuencia de bisagra y dominio constante (Fc) de inmunoglobulina humana apropiada, puede conseguirse la especificidad de unión de interés usando componentes enteramente humanos. Tales inmunoadhesinas son mínimamente inmunogénicas para el paciente, y son seguras para uso crónico o repetido. En una realización, la región Fc es una región Fc de secuencia nativa. En otra realización, la región Fc es una región Fc variante. En aún otra realización, la región Fc es una región Fc funcional. La porción de secuencia de IL-34 y la porción de secuencia de inmunoglobulina de la inmunoadhesina de IL-34 pueden ligarse por un ligador mínimo. La secuencia de inmunoglobulina preferible, pero no necesariamente, es un dominio constante de inmunoglobulina. El resto de inmunoglobulina en las quimeras de la presente divulgación puede obtenerse de los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM, pero preferiblemente IgG1 o IgG3.

Como se usa en la presente memoria, "región Fc" se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para abarcar del residuo aminoacídico en posición Cys226, o Pro230, al extremo carboxilo de la misma.

Es otro ejemplo de una proteína de fusión de IL-34 una fusión del polipéptido de IL-34 con anticuerpos de dominio de unión a seroalbúmina humana (AlbudAb) según la plataforma de tecnología AlbudAb™ como se describe en Konterman et al. 2012 AlbudAb™ Technology Platform-Versatile Albumin Binding Domains for the Development of Therapeutics with Tunable Half-Lives.

En otra realización, los polipéptidos de la presente divulgación pueden combinarse/formularse con un sistema de suministro de fármaco adecuado para proteínas terapéuticas.

Los ejemplos de tales sistemas de suministro de fármaco que pueden usarse incluyen diversos microportadores así como nanoportadores como microesferas/micropartículas, liposomas, nanopartículas, dendrímeros, niosomas y nanotubos de carbono para el suministro orientado de proteínas terapéuticas. En una realización particular, tal sistema de suministro de fármaco es un sistema de suministro de fármaco adecuado para el suministro de fármaco mediado por células, en particular suministro de fármaco mediado por monocitos y/o macrófagos como se divulga en Jain et al., 2013 (42).

Como alternativa, los polipéptidos de la presente divulgación pueden encapsularse en glóbulos rojos o eritrocitos. Se han descrito diversos métodos para permitir la incorporación de ingredientes activos a glóbulos rojos, incluyendo el método descrito en la solicitud EP 1773452, que es el método que ofrece actualmente el mejor desempeño y tiene la ventaja de ser reproducible y de mejorar el rendimiento de encapsulación del ingrediente activo.

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden producirse mediante cualquier medio adecuado, como resultará evidente para los especialistas en la materia. Para producir suficientes cantidades de IL-34 para uso de acuerdo con la presente divulgación, puede conseguirse convenientemente la expresión cultivando en condiciones apropiadas células hospedadoras recombinantes que contienen el polipéptido de la presente divulgación. Preferiblemente, el polipéptido se produce por medios recombinantes, por expresión a partir de una molécula de ácido nucleico codificante. Son bien conocidos los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células hospedadoras.

Cuando se expresa en forma recombinante, el polipéptido se genera preferiblemente por expresión de un ácido nucleico codificante en una célula hospedadora. Puede usarse cualquier célula hospedadora, dependiendo de los requisitos individuales de un sistema particular. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células de planta, levadura y sistemas de baculovirus. Las estirpes celulares de mamífero disponibles en la materia para expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster neonato y muchas otras. Las bacterias son también hospedadores preferidos para la producción de proteína recombinante, debido a la facilidad con que las bacterias pueden manipularse y crecer. Es un hospedador bacteriano común preferido *E coli*.

Además, debería señalarse que la mayoría de los productos biofarmacéuticos basados en proteína ostentan alguna forma de modificación postraducciona que puede afectar profundamente las propiedades de la proteína relevantes para su aplicación terapéutica. La glicosilación de proteína representa la modificación más común (aproximadamente un 50 % de las proteínas humanas están glicosiladas). La glicosilación puede introducir una considerable heterogeneidad en una composición de proteína mediante la generación de diferentes estructuras de glicano en las proteínas de la composición. Tales estructuras de glicano se elaboran mediante la acción de diversas enzimas de la maquinaria de glicosilación a medida que la glicoproteína circula por el retículo endoplásmico (RE) y el complejo de Golgi (cascada de glicosilación). La naturaleza de la estructura o estructuras de glicano de una proteína tiene impacto sobre el plegamiento, estabilidad, vida útil, tráfico, farmacodinámica, farmacocinética e inmunogenicidad de la proteína. La estructura de glicano tiene un gran impacto sobre la actividad funcional primaria de la proteína. La glicosilación puede afectar la estructura local de la proteína y puede ayudar a dirigir el plegamiento de la cadena

polipeptídica. Una clase importante de estructuras de glicano son los llamados N-glicanos. Se generan por enlazamiento covalente de un oligosacárido con el grupo amino (N) de residuos de asparagina en la secuencia de consenso NXS/T de la cadena polipeptídica naciente. Los N-glicanos pueden participar además en la clasificación o direccionamiento de una proteína a su diana final: el N-glicano de un anticuerpo, por ejemplo, puede interactuar con componentes complementarios. Los N-glicanos sirven también para estabilizar una glicoproteína, por ejemplo potenciando su solubilidad, apantallando los parches hidrófobos sobre su superficie, protegiendo de proteólisis y dirigiendo interacciones estabilizantes intracatenarias. La glicosilación puede regular la semivida de proteínas, por ejemplo, en seres humanos la presencia de ácidos siálicos terminales en N-glicanos puede aumentar la semivida de proteínas circulantes en la corriente sanguínea.

Como se usa en la presente memoria, el término "glicoproteína" hace referencia a cualquier proteína que tenga uno o más N-glicanos enlazados con la misma. Por tanto, el término hace referencia tanto a proteínas que se reconocen generalmente en la materia como una glicoproteína como a proteínas que se han genomanipulado para contener uno o más sitios de glicosilación N-ligados. Como se usa en la presente memoria, los términos "N-glicano" y "glicofoma" se usan intercambiamente y hacen referencia a un oligosacárido N-ligado, por ejemplo aquel que está enlazado por un grupo de enlace asparagina-N-acetilglucosamina con un residuo de asparagina de un polipéptido. Las glicoproteínas N-ligadas contienen un residuo de N-acetilglucosamina ligado al nitrógeno de amida de un residuo de asparagina de la proteína. Los azúcares predominantes encontrados en glicoproteínas son glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico (p. ej., ácido N-acetilneuramínico (NANA)). El procesamiento de los grupos de azúcar aparece cotraduccionalmente en el lumen del RE y continúa postraduccionalmente en el aparato de Golgi para glicoproteínas N-ligadas.

Una serie de levaduras, por ejemplo *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Saccharomyces cerevisiae*, están últimamente en desarrollo para usar las ventajas de tales sistemas pero eliminando las desventajas con respecto a la glicosilación. Varias cepas están en desarrollo genético para producir estructuras de glicano de tipo humano definidas en una proteína. Los métodos para genomanipular levadura para producir N-glicanos de tipo humano se describen en las patentes de EE. UU. n.º 7.029.872 y 7.449.308 junto con los métodos descritos en las solicitudes publicadas de EE. UU. n.º 20040230042, 20050208617, 20040171826, 20050208617 y 20060286637. Estos métodos se han usado para construir levaduras recombinantes que pueden producir glicoproteínas terapéuticas que tienen N-glicanos predominantemente complejos de tipo humano o híbridos en las mismas en lugar de N-glicanos de tipo levadura. Como se describe anteriormente, la glicosilación de tipo humano se caracteriza principalmente por estructuras de N-glicano "complejas" que contienen N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa y/o ácido N-acetilneuramínico. Por tanto, se han genomanipulado varias cepas de levaduras para producir glicoproteínas que comprenden uno o más N-glicanos complejos de tipo humano o híbridos de tipo humano tales como GlcNAcMan3GlcNAc2.

Como alternativa, puede usarse un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente divulgación (tal como el polipéptido de IL-34 como se muestra en la SEQ ID NO: 1) o un vector que comprende tal ácido nucleico o una célula hospedadora que comprende tal vector.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico que codifica una secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 1 como se describe aquí anteriormente, o un vector que comprende dicho ácido nucleico o una célula hospedadora que comprende tal vector, para uso en la inducción y/o el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria en un paciente necesitado de ello.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico que codifica una secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 1 como se describe aquí anteriormente, o un vector que comprende dicho ácido nucleico o una célula hospedadora que comprende tal vector, para uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplante en un paciente necesitado de ello.

Aún otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico que codifica una secuencia aminoacídica que comprende la SEQ ID NO: 1 como se describe aquí anteriormente, o un vector que comprende tal ácido nucleico o una célula hospedadora que comprende tal vector, para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, respuestas aloinmunitarias y alergias en un paciente de las mismas.

Los ácidos nucleicos de la presente divulgación pueden producirse mediante cualquier técnica conocida en sí en la materia, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, sola o en combinación o combinaciones.

En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia de un ácido nucleico a las células. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con degradación reducida respecto a la extensión de la degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, plásmidos, fagémidos, virus y otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de secuencias del ácido nucleico de interés. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus tales como virus de leucemia de murino Moloney, virus de sarcoma de murino Harvey, virus de tumor mamario de murino y virus de sarcoma de Roux; adenovirus, virus adenoasociados; virus de tipo SV40; poliomavirus; virus de Epstein-Barr; papilomavirus; herpesvirus; virus vaccinia; poliovirus y virus de ARN tales como

un retrovirus. Pueden emplearse fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la materia.

Los vectores víricos preferidos están basados en virus eucarióticos no citopáticos en que se han reemplazado genes no esenciales por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (p. ej., lentivirus), cuyo ciclo vital implica la transcripción inversa de ARN vírico genómico a ADN con posterior integración provírica en ADN celular del hospedador. Los retrovirus se han aprobado para ensayos de terapia génica humana. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes de replicación (concretamente, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retrovíricos genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Se proporcionan protocolos estándares para producir retrovirus deficientes de replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno a un plásmido, transfección de una estirpe celular de empaquetamiento con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la estirpe celular de empaquetamiento, recogida de partículas víricas de medios de cultivo de tejido e infección de las células diana con partículas víricas) en KRIEGLER (A Laboratory Manual," W.H. Freeman C.O., Nueva York, 1990) y en MURRY ("Methods in Molecular Biology," vol.7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991).

Son virus preferidos para ciertas aplicaciones los adenovirus y virus adenoasociados, que son virus de ADN bicatenario que se han aprobado ya para uso humano en terapia génica. Los virus adenoasociados pueden genomanipularse para ser deficientes de replicación y ser capaces de infectar un amplio intervalo de tipos celulares y especies. Tiene además ventajas tales como estabilidad térmica y en disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hematopoyéticas y falta de inhibición de superinfección, permitiendo así series múltiples de transducciones. Aparentemente, el virus adenoasociado puede integrarse en ADN celular humano de manera específica de sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis de inserción y la variabilidad de la característica de expresión génica insertada de infección retrovírica. Además, las infecciones con virus adenoasociados de tipo silvestre se han seguido en cultivo de tejido durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, implicando que la integración genómica de virus adenoasociado es un evento relativamente estable. El virus adenoasociado puede funcionar también de forma extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores de plásmido. Los vectores de plásmido se han descrito extensamente en la materia y son bien conocidos por los especialistas en la materia. Véase, p. ej. SANBROOK et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años, se han usado vectores de plásmido como vacunas de ADN para suministrar genes que codifican antígeno a células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto debido a que no tienen los mismos problemas de seguridad que con muchos de los vectores víricos. Estos plásmidos, sin embargo, al tener un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado operativamente en el plásmido. Algunos plásmidos usados comúnmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos por los especialistas en la materia. Adicionalmente, los plásmidos pueden diseñarse a medida usando enzimas de restricción y reacciones de ligación para retirar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos pueden suministrarse por una variedad de vías parenteral, mucosa y tópica. Por ejemplo, el plásmido de ADN puede inyectarse por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras. Puede administrarse también por pulverizadores o gotas intranasales, supositorio rectal y por vía oral. Puede administrarse también a la epidermis o una superficie mucosa usando una pistola génica. Los plásmidos pueden darse en solución acuosa, secados sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de suministro de ADN incluyendo, pero sin limitación, liposomas, dendrímeros y microencapsulación.

Según la presente divulgación, son ejemplos de células hospedadoras que pueden usarse los monocitos o macrófagos humanos (particularmente aquellos obtenidos de los sujetos para tratar).

Los medios por los que el vector portador del gen puede introducirse en las células incluyen, pero sin limitación, microinyección, electroporación, transducción o transfección usando DEAE-dextrano, lipofección, fosfato de calcio u otros procedimientos conocidos por un especialista en la materia.

#### **Composiciones farmacéuticas:**

La presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de IL-34 aislado o un polinucleótido que codifica el mismo.

La presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de IL-34 aislado o un polinucleótido que codifica el mismo y un fármaco inmunosupresor.

La presente divulgación se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se define en la presente memoria (o un ácido nucleico que codifica el mismo, un vector de expresión o una célula hospedadora como se define anteriormente) y un fármaco inmunosupresor para uso en la inducción y/o mantenimiento de tolerancia inmunitaria en un paciente necesitado de ello.

La presente divulgación se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se define en la presente memoria (o un ácido nucleico que codifica el mismo, un vector de expresión o una célula hospedadora como se define anteriormente) y un fármaco inmunosupresor para uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplante en un paciente necesitado de ello.

La presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se define en la presente memoria (o un ácido nucleico que codifica el mismo, un vector de expresión o una célula hospedadora como se define anteriormente) y un fármaco inmunosupresor para uso en un paciente necesitado de ello.

5 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de la presente divulgación incluyen todas las composiciones en las que el polipéptido está contenido en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. Además, las composiciones farmacéuticas pueden contener portadores fisiológicamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos a preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente.

10 El término "portador fisiológicamente aceptable" pretende englobar cualquier portador que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el hospedador al que se administra. Los portadores fisiológicamente aceptables adecuados son bien conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences de Remington (Mack Publishing Company, Easton, EE. UU., 1985), que es un texto de referencia estándar en este campo. Por ejemplo, para administración parenteral, los ingredientes activos anteriores pueden formularse en forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, seroalbúmina y solución de Ringer.

15 Aparte del portador fisiológicamente aceptable, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender también cantidades menores de aditivos tales como estabilizadores, excipientes, tampones y conservantes. La composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender además un fármaco inmunosupresor.

20 En una realización, el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo consistente en cistostáticos tales como inhibidores de la diana de rapamicina de mamífero (mTOR) y rapamicina (sirolimús); agentes alquilantes (ciclofosfamida) y antimetabolitos (azatioprina, mercaptopurina y metotrexato); anticuerpos terapéuticos (tales como anticuerpos monoclonales anti-CD40L, anticuerpos monoclonales anti-IL-2R, anticuerpos monoclonales anti-CD3, globulina antilinfocítica (GAL) y globulina antitimocítica (GAT)); inhibidores de calcineurina (ciclosporina); glucocorticoides y micofenolato de mofetilo.

25 En una realización, el fármaco inmunosupresor es rapamicina (sirolimús).

30 Los polipéptidos de la presente divulgación pueden administrarse mediante cualquier medio que consiga el fin pretendido. Por ejemplo, la administración puede conseguirse mediante una serie de diferentes vías incluyendo, pero sin limitación, uso subcutáneo, intravenoso, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intratecal, intranasal, oral, rectal, transdérmico, bucal, tópico, local, inhalativo o subcutáneo. Se prefieren particularmente las vías parenteral y tópica,

35 Las dosificaciones para administrar dependen de las necesidades del individuo, del efecto deseado y de la vía de administración elegida. Se entiende que la dosificación administrada dependerá de la edad, sexo, salud y peso del receptor, del tratamiento concurrente, si lo hubiera, de la frecuencia de tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado. La dosis total requerida para cada tratamiento puede administrarse por múltiples dosis o en una dosis única.

40 Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros, y en particular en función del modo de administración usado, de la patología relevante o, como alternativa, de la duración deseada del tratamiento. Por ejemplo, está dentro de las habilidades de la materia empezar con dosis de los compuestos a niveles menores de los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consigue el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los polipéptidos puede variar en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto al día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al sujeto para tratar. Un medicamento contiene típicamente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Se suministra normalmente una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal al día.

45 En una realización, se administra el fármaco inmunosupresor al paciente necesitado de ello a una dosis disminuida (comparativamente a la dosis administrada habitualmente).

50 En una realización, se administra el fármaco inmunosupresor al paciente necesitado de ello a una dosis subóptima.

En una realización particular, se administra rapamicina (sirolimús) al paciente necesitado de ello a una dosis subóptima.

55 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para inducir y/o mantener la tolerancia inmunitaria en un paciente necesitado de ello, que comprende una etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-34 o un polinucleótido que codifica el mismo.

En una realización, el método para inducir y/o mantener la tolerancia inmunitaria en un paciente necesitado de ello comprende una etapa de administración a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-34 o un polinucleótido que codifica el mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunosupresor.

5 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para prevenir o reducir el rechazo de trasplante en un paciente necesitado de ello, que comprende una etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-34 o un polinucleótido que codifica el mismo simultánea y/o posteriormente al trasplante.

10 En una realización, el método para prevenir o reducir el rechazo de trasplante en un paciente necesitado de ello comprende una etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-34 o un polinucleótido del mismo y de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunosupresor simultánea y/o posteriormente al trasplante.

Como se usa en la presente memoria, el término "simultáneamente" significa que el polipéptido de interés se administra al paciente receptor el mismo día que el trasplante.

15 Como se usa en la presente memoria, "posteriormente" significa que el polipéptido de interés se administra al paciente receptor después del trasplante, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después del trasplante.

En aún otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias, respuestas inmunitarias indeseadas o anti-proteínas terapéuticas y alergias en un paciente necesitado de ello, que comprende una etapa de administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-34 o un polinucleótido que codifica el mismo.

20 Se entiende por "cantidad terapéuticamente eficaz" una cantidad suficiente para conseguir una concentración de polipéptido que sea capaz de prevenir, tratar o retardar la enfermedad para tratar. Tales concentraciones pueden determinarse rutinariamente por los especialistas en la materia. La cantidad de polipéptido administrada realmente se determinará típicamente por un médico o un veterinario a la vista de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección para tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, peso y respuesta del  
25 paciente, la gravedad de los síntomas del sujeto y similares. Se apreciará también por los especialistas en la materia que la dosificación puede ser dependiente de la estabilidad del polipéptido administrado.

En una realización, el tratamiento con un polipéptido de IL-34 se administra en más de un ciclo, concretamente la administración de un polipéptido de IL-34 se repite al menos una vez.

30 Por ejemplo, pueden administrarse 2 a 10 ciclos o incluso más, dependiendo del estado y respuesta del paciente específicos. Los intervalos, concretamente el tiempo entre el inicio de dos ciclos consecutivos, son típicamente de varios días.

**Composiciones de kit de piezas:**

El polipéptido de IL-34 puede combinarse en una formulación y administrarse simultáneamente,

35 El polipéptido de IL-34 y el fármaco inmunosupresor pueden combinarse en una formulación y administrarse simultáneamente. Sin embargo, pueden administrarse también separadamente, usando composiciones separadas. Se señala además que pueden administrarse en diferentes momentos.

La presente divulgación se refiere también a una composición de kit de piezas que comprende un polipéptido de IL-34 aislado o un polinucleótido que codifica el mismo y un fármaco inmunosupresor para uso en la inducción y/o mantenimiento de tolerancia inmunitaria en un paciente necesitado de ello.

40 La presente divulgación se refiere además a una composición de kit de piezas que comprende un polipéptido de IL-34 aislado o un polinucleótido que codifica el mismo y un fármaco inmunosupresor para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, respuestas aloinmunitarias y alergias en un paciente necesitado de ello.

45 Los términos "kit", "producto" o la expresión "preparación combinada", como se usan en la presente memoria, definen especialmente un "kit de piezas" en el sentido de que los copartícipes de combinación como se definen anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distintas de los copartícipes de combinación, concretamente simultáneamente o en diferentes puntos temporales. Las piezas del kit de piezas pueden administrarse entonces, p. ej., simultáneamente o escalonadas cronológicamente, es decir en diferentes puntos temporales y con intervalos temporales iguales o diferentes para cualquier pieza del kit de piezas.  
50 La relación de cantidades totales de los copartícipes de combinación para administrar en la preparación combinada puede variar. Los copartícipes de combinación pueden administrarse por la misma vía o por diferentes vías. Cuando la administración es secuencial, el primer copartícipe puede administrarse por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días antes del segundo copartícipe.

**Métodos de pronóstico:**

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método *in vitro* para determinar si un paciente está en riesgo de rechazo de trasplante, enfermedades autoinmunitarias, respuesta inmunitaria indeseada contra proteínas terapéuticas o alergias, que comprende una etapa de determinación del nivel de expresión de IL-34 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que la presencia de IL-34 es indicativa de un riesgo reducido de rechazo de trasplante, enfermedades autoinmunitarias, respuesta inmunitaria indeseada contra proteínas terapéuticas o alergias.

Como se usa en la presente memoria, el término “riesgo” hace referencia a la probabilidad de que aparezca un evento durante un periodo de tiempo específico, tal como el inicio de rechazo de trasplante, y puede significar un riesgo “absoluto” o riesgo “relativo” del sujeto. El riesgo absoluto puede medirse con referencia a la observación real después de la medida de la cohorte temporal relevante, o con referencia a valores de índice desarrollados a partir de cohortes históricas estadísticamente válidas que se han seguido durante el periodo de tiempo relevante. El riesgo relativo hace referencia a la relación de riesgos absolutos de un paciente en comparación con los riesgos absolutos de cohortes de bajo riesgo o el riesgo de población media, que pueden variar según cómo se valoren los factores de riesgo clínico. Se usan también comúnmente los cocientes de posibilidades, la proporción de eventos positivos a eventos negativos para un resultado de prueba dado (las posibilidades son según la fórmula  $p/(1-p)$  donde  $p$  es la probabilidad del evento y  $(1-p)$  es la probabilidad de no evento) sin conversión.

“Determinación del riesgo” en el contexto de la presente divulgación engloba hacer una predicción de la probabilidad, posibilidad o expectativa de que pueda aparecer un evento. La determinación del riesgo puede comprender también la predicción de parámetros clínicos futuros, valores de factor de riesgo de laboratorio tradicionales tales como edad, disparidad de sexos, ensayo de HLA, etc.; en términos absolutos o bien relativos con referencia a una población medida anteriormente. Los métodos de la presente divulgación pueden usarse para hacer medidas categóricas del riesgo de rechazo de trasplante, definiendo por tanto el espectro de riesgos de una categoría de paciente trasplantado definido como el riesgo de rechazo de trasplante.

En aún otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método *in vitro* para determinar si un paciente trasplantado (receptor) es tolerante, que comprende una etapa de determinación del nivel de expresión de IL-34 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente de trasplante, en el que la presencia de IL-34 es indicativa de tolerancia.

Como se usa en la presente memoria, el término “determinar” incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (concretamente, la detección y/o medida del nivel de expresión) con o sin referencia a un control o un valor predeterminado. Como se usa en la presente memoria, “detectar” significa determinar si IL-34 está presente o no en una muestra biológica y “medir” significa determinar la cantidad de IL-34 en una muestra biológica. Típicamente, el nivel de expresión puede determinarse por ejemplo por inmunoensayos tales como un ELISA efectuado en una muestra biológica.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “muestra biológica” tiene su significado general en la materia y hace referencia a cualquier muestra que pueda obtenerse de un paciente con el fin de evaluación *in vitro*. Es una muestra biológica preferida una muestra de sangre (p. ej., muestra de sangre completa, muestra de suero o muestra de plasma).

Métodos para determinar el nivel de expresión del biomarcador de la presente divulgación:

La determinación del nivel de expresión de IL-34 puede efectuarse mediante una variedad de técnicas. Generalmente, el nivel de expresión determinado es un nivel de expresión relativo.

Por ejemplo, la determinación del nivel de expresión de IL-34 puede comprender una etapa de poner en contacto de la muestra biológica con reactivos selectivos tales como anticuerpos, y detectar así la presencia, o medir la cantidad, del polipéptido de interés originalmente en dicha muestra biológica. La puesta en contacto puede efectuarse en cualquier dispositivo adecuado, tal como una placa, disco de microvaloración, tubo de ensayo, pocillo, vidrio, columna y demás.

En una realización, la puesta en contacto se efectúa sobre un sustrato recubierto con el reactivo. El sustrato puede ser un sustrato sólido o semisólido tal como cualquier soporte adecuado que comprenda vidrio, plástico, nailon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede ser de diversas formas y tamaños, tales como un portaobjetos, una membrana, una perla, una columna, un gel, etc. La puesta en contacto puede hacerse en cualquier condición adecuada para que se forme un complejo detectable, tal como un complejo de anticuerpo-antígeno, entre el reactivo y los polipéptidos de la muestra biológica.

La presencia del polipéptido de IL-34 puede detectarse usando técnicas electroforéticas e inmunodiagnósticas estándares, incluyendo inmunoensayos tales como ensayos de competición, reacción directa o de tipo sándwich. Tales ensayos incluyen, pero sin limitación, transferencias Western; pruebas de aglutinación; inmunoensayos marcados y mediados por enzimas tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación, etc. Las reacciones incluyen generalmente marcajes reveladores tales como marcajes fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivos, enzimáticos o moléculas de tinte, u otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos con los que reaccionan. Son conocidos en la materia marcajes que proporcionan generalmente (directa o bien indirectamente) una señal.

Como se usa en la presente memoria, el término “marcado” con respecto al anticuerpo o aptámero pretende englobar el marcaje directo del anticuerpo o aptámero por acoplamiento (concretamente, ligamiento físico) de una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5), al anticuerpo o aptámero, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo (p. ej., peroxidasa de rábano picante, HRP) por reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero puede marcarse también con una molécula radiactiva mediante cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, las moléculas radioactivas incluyen, pero sin limitación, átomos radioactivos para estudios escintigráficos tales como  $I^{123}$ ,  $I^{124}$ ,  $In^{111}$ ,  $Re^{186}$  y  $Re^{188}$ . Los ensayos anteriormente mencionados implican generalmente la separación de proteína no unida en una fase líquida de un soporte en fase sólida al que se unen los complejos de antígeno-anticuerpo. Los soportes sólidos que pueden usarse en la práctica de la presente divulgación incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (p. ej., en forma de membrana o pocillo de microvaloración); poli(cloruro de vinilo) (p. ej., láminas o pocillos de microvaloración); látex de poliestireno (p. ej., perlas o placas de microvaloración); poli(fluoruro de vinilideno); papel diazotizado; membranas de nailon; perlas activadas, perlas sensibles magnéticamente, etc.

Más particularmente, puede usarse un método ELISA en el que los pocillos de una placa de microvaloración se recubren con un anticuerpo contra la proteína para ensayar. Se añade entonces una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene el biomarcador a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos de anticuerpo-antígeno, la placa o placas pueden lavarse para retirar los restos no unidos y añadirse una molécula de unión secundaria marcada detectablemente. La molécula de unión secundaria se permite reaccionar con cualquier proteína marcadora de la muestra capturada, se lava la placa y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria usando métodos bien conocidos en la materia.

El reactivo selectivo es generalmente un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferiblemente monoclonal. Los anticuerpos policlonales dirigidos contra IL-34 son bien conocidos por el especialista en la materia, tales como los anticuerpos comercializados por Abnova PAB16574.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL-34 son también bien conocidos tales como el anticuerpo monoclonal comercializado por Abnova MAB10698.

Adicionalmente, los kits ELISA de IL-34 son también bien conocidos tales como aquellos comercializados por Abnova KA2217 Kit o por R&D Systems (Human IL-34 Quantikine ELISA).

En una realización particular, se determina el nivel de expresión de IL-34 midiendo la concentración de IL-34 en dicha muestra biológica.

Por consiguiente, los métodos según la presente divulgación comprenden una etapa de puesta en contacto de la muestra de sangre con un copartícipe de unión capaz de interactuar selectivamente con el polipéptido de IL-34 en dicha muestra de sangre.

El copartícipe de unión puede ser generalmente un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferiblemente monoclonal. Los anticuerpos policlonales dirigidos contra IL-34 pueden crearse según métodos conocidos administrando el antígeno o epítipo apropiado a un animal hospedador seleccionado, p. ej., de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones entre otros. Pueden usarse diversos coadyuvantes conocidos en la materia para potenciar la producción de anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación pueden prepararse y aislarse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por estirpes celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y aislamiento incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Cote *et al.*, 1983) y la técnica de hibridoma de EBV (Cole *et al.*, 1985). Como alternativa, pueden adaptarse las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase p. ej. la patente de EE. UU. nº 4.946.778) para producir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos útiles en la práctica de la presente divulgación incluyen fragmentos que incluyen, pero sin limitación, fragmentos  $F(ab')_2$  que pueden generarse por digestión por pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos  $F(ab')_2$ . Como alternativa, pueden construirse colecciones de expresión de Fab y/o scFv para permitir una identificación rápida de fragmentos que tienen la especificidad deseada. Por ejemplo, puede usarse presentación en fago de anticuerpos. En tal método, los Fv monocatenarios (scFv) o fragmentos Fab se expresan sobre la superficie de un bacteriófago adecuado, p. ej. M13. Brevemente, se retiran las células de bazo de un hospedador adecuado, p. ej. ratón, que se ha inmunizado con una proteína. Se obtienen las regiones codificantes de las cadenas VL y VH a partir de estas células que producen el anticuerpo deseado contra la proteína. Estas regiones codificantes se fusionan entonces con un extremo de una secuencia de fago. Una vez se inserta el fago en un portador adecuado, p. ej. bacterias, el fago presenta el fragmento de anticuerpo. La presentación en fago de anticuerpo puede proporcionarse también por métodos combinatorios conocidos por los especialistas en la materia. Los fragmentos de anticuerpo presentados por un fago pueden usarse entonces como parte de un inmunoensayo.

En otra realización, el copartícipe de unión puede ser un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias



oligonucleotídicas u oligopeptídicas con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden aislarse mediante evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una colección de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La colección de secuencias aleatorias es obtenible por síntesis química combinatoria de ADN. En esta colección, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una única secuencia. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en regiones variables de anticuerpo limitadas conformacionalmente presentadas por una proteína de plataforma, tal como tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan de colecciones combinatorias por métodos de dos híbridos (Colas *et al.*, 1996).

En otras realizaciones, la medida de la concentración de IL-34 puede incluir también la separación de las proteínas: centrifugación basada en el peso molecular de la proteína; electroforesis basada en masa y carga; HPLC basada en la hidrofobicidad; cromatografía de exclusión por tamaño basada en el tamaño y afinidad en fase sólida basada en la afinidad de la proteína por la fase sólida particular que está en uso. Una vez separada, IL-34 puede identificarse basándose en el "perfil de separación" conocido, p. ej. tiempo de retención, para esa proteína y medido usando técnicas estándar. Como alternativa, las proteínas separadas pueden detectarse y medirse, por ejemplo, por un espectrómetro de masas.

#### **Métodos para ajustar un tratamiento inmunosupresor:**

La presente divulgación proporciona además métodos para desarrollar planes de tratamiento personalizado. La información lograda mediante los métodos descritos anteriormente puede usarse para desarrollar un plan de tratamiento personalizado para un receptor de trasplante.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para ajustar el tratamiento inmunosupresor administrado a un paciente necesitado de ello, que comprende las siguientes etapas de (i) efectuar el método para determinar el riesgo según la presente divulgación y (ii) ajustar el tratamiento inmunosupresor.

Los métodos pueden llevarse a cabo, por ejemplo, usando cualquiera de los métodos para determinar el riesgo descritos anteriormente y, en consideración de los resultados obtenidos, diseñando un plan de tratamiento para el receptor de trasplante. Si IL-34 no está presente en la muestra biológica obtenida a partir de un paciente de interés, esto indica que dicho paciente está en riesgo de un resultado clínico indeseable (p. ej., rechazo de trasplante). Por lo tanto, dicho paciente es un candidato a tratamiento con una cantidad eficaz de un tratamiento inmunosupresor (p. ej., por un agente antirrechazo). Por el contrario, la presencia de IL-34 en la muestra biológica es indicativa de un riesgo reducido de rechazo de trasplante. Además, dependiendo del nivel de expresión de IL-34 (concretamente, bajo nivel o alto nivel de IL-34 en la muestra biológica analizada), el paciente puede requerir un régimen de tratamiento que sea más o menos agresivo que un régimen estándar, o puede determinarse que es más adecuado para el paciente un régimen estándar. Por ejemplo, un paciente con un alto nivel de IL-34 puede evitar un tratamiento inmunosupresor (o requerir un régimen menos agresivo) y sus efectos secundarios asociados.

La invención se ilustrará adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deberían interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

#### **FIGURAS:**

**Figura 1: Expresión de IL-34 aumentada en injertos y Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> esplénicos después de tratamiento con CD40lg. A.** Se analizó en Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> clasificados por FACS Aria del bazo de receptores no expuestos o tratados con AdCD40lg de 120 días de edad (n= 6) la expresión de ARNm de IL-34 por RT-PCR cuantitativa. Se comparó la expresión de ARNm de IL-34 en los injertos cardiacos (**B**) y esplénicos (**C**) de receptores tratados con AdCD40lg el día 5 (n= 3) y 120 (n= 7) después del trasplante con los injertos de receptores no tratados el día 5 (n= 8), el día 7 (n= 8) y el día 120 (n= 6) y los corazones nativos de animales no expuestos (n= 7). (**D**) Se clasificaron Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> del bazo de ratas tratadas con CD40lg y se analizó su expresión de IL-34 (negro) después de 7 horas de estimulación con PMA-ionomicina (24 µg/ml). El histograma en gris representa la tinción de control isotópico. Mann Whitney, \*p< 0,05, \*\* p<0,01.

**Figura 2: IL-34 y CD115, pero no M-CSF, estaban implicados en la supresión mediada por Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup>.** Se analizó la proporción relativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en división LEW.1A marcados con CFSE estimulados con pDC LEW.1W de donante después de 6 días de cultivo, en presencia de Treg LEW.1A CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> a una relación de efector:supresor de 1:1. Se evaluó la proliferación después de la adición de un Ab bloqueante anti-IL-34 (**A**), un Ab bloqueante anti-M-CSF (**B**) o un Ab bloqueante anti-CD115 (**C**) en comparación con control isotópico (n= 4 por triplicado). Los resultados se expresan como media ± EEM de porcentaje normalizado de proliferación frente a proliferación en ausencia de Treg CD8<sup>+</sup> (100 %).\*, p<0,01.

**Figura 3: Detección de IL-34 usando un AAV-IL-34 e inhibición de las respuestas de alofocitos T. A.** Se ensayó en sobrenadantes de células transducidas con AAV-IL-34 o AAV-GFP la supresión de la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en respuesta a pDC alogénicas y se analizó por citometría de flujo la dilución de CFSE después de 5 días de cultivo. Se usaron Treg CD8<sup>+</sup> como control positivo de supresión. n= 3 por duplicado. Los resultados se expresan como media ± EEM del porcentaje normalizado de proliferación frente a la proliferación en ausencia de Treg

CD8<sup>+</sup> (100 %). Histograma representativo de 1 experimento; en gris: proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> cocultivados con pDC con sobrenadante de células transducidas con AAV-GFP al 20 %; línea negra: con sobrenadante de células transducidas con AAV-IL-34 al 20 %. **B.** Se ensayó en la dilución en serie de sueros de ratas tratadas con AAV-IL-34 o AAV-GFP o animales no expuestos la supresión de la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en respuesta a pDC alogénicos y se analizó por citometría de flujo la dilución de CFSE después de 5 días de cultivo. Se usaron Treg CD8<sup>+</sup> como control positivo de supresión. n= 3 por duplicado. Los resultados se expresan como media ± EEM del porcentaje normalizado de proliferación frente a la proliferación en ausencia de Treg CD8<sup>+</sup> (100 %). \*, p< 0,01; \*\*, p< 0,001; \*\*\*, p< 0,0001 frente a sueros de animales no expuestos.

**Figura 4: La transferencia génica de IL-34 prolonga la supervivencia de aloinjerto de manera dominante.** Los receptores recibieron por vía intravenosa 10<sup>12</sup> vg/rata de AAV-IL-34 o AAV no codificante o no tratado, se injertaron 30 días después sin tratamiento adicional o en combinación con una dosis subóptima de rapamicina (14 días, día de inicio 0). Se evaluó la supervivencia del injerto por palpación a través de la pared abdominal. \*\*\*p< 0,0001.

**Figura 5: Tolerancia en serie mediada por Treg después de la inducción de IL-34. A.** Se irradiaron subletalmente (4,5 Gy) receptores LEW.1A el día -1 y recibieron aloinjertos cardiacos e inyecciones i.v. de 1,5x10<sup>8</sup> esplenocitos de un receptor de larga supervivencia o animales no expuestos el día 0. Se monitorizó la supervivencia del injerto por palpación abdominal. **B.** Se irradiaron subletalmente (4,5 Gy) receptores LEW.1A el día -1 y recibieron aloinjertos cardiacos e inyecciones i.v. de esplenocitos totales o subpoblaciones purificadas (linfocitos T: 4x10<sup>7</sup>; linfocitos T: 6x10<sup>7</sup>, células CD11b/c+: 1,5x10<sup>7</sup>; Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup>: 4x10<sup>6</sup>; Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>alto</sup>: 4x10<sup>6</sup>) de un receptor de larga supervivencia el día 0. Se monitorizó la supervivencia del injerto por palpación abdominal. Prueba de rangos logarítmicos, \*\*p< 0,01, \*p< 0,05.

**Figura 6: Supresión dependiente de la dosis mediada por M-CSF de las respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> efectoras antidonantes. (A)** Se analizó en Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> clasificados por FACS Aria de bazo de receptores no expuestos o tratados con AdCD40lg de 120 días de edad (n= 6) la expresión de ARNm de M-CSF por RT-PCR cuantitativa. \*p< 0,05. **(B)** Se ensayó en M-CSF de rata (0,1 a 2 µg/ml de concentración final) la actividad supresora de la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> marcados con CFSE después de 6 días de cultivo. Se usaron Treg CD8<sup>+</sup> como control positivo de supresión. n= 3 por triplicado. Los resultados se expresan como media ± EEM de porcentaje normalizado de proliferación frente a proliferación en ausencia de Treg CD8<sup>+</sup> (100 %). \*, p< 0,01.

**Figura 7: Acumulación de transcrito en macrófagos después de tratamiento con IL-34.** Se valoró la expresión de ARNm por PCR cuantitativa instantánea en macrófagos clasificados de bazo no tratado o bazo tratado con AAV-IL34, sangre e injerto de receptores el día 15 después del trasplante. Se normalizan los resultados a HPRT y se expresan como 2<sup>-ddCt</sup>±EEM. Prueba de Kruskal Wallis y posterior de Dunn, \*, p< 0,01.

**Figura 8: El agotamiento de macrófagos daba como resultado el rechazo de injerto después del tratamiento con IL-34.** Los receptores recibieron el día -30 por vía intravenosa 10<sup>12</sup> vg/rata de AAV-IL-34 o AAV no codificante o no se trataron con o sin administración intraperitoneal semanal de liposomas de clodronato del día -25 al día 3, y se injertaron el día 0 en combinación con una dosis subóptima de rapamicina (10 días, día de inicio 0). Se evaluó la supervivencia del injerto por palpación a través de la pared abdominal. Prueba de rangos logarítmicos, \*\*p< 0,01.

**Figura 9: IL-34 está implicada en la actividad supresora de Treg CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> humanos, que pueden inhibir respuestas inmunitarias antidonantes. (A)** Se ensayó en IL-34 soluble la supresión de la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en respuesta a PBMC con linfocitos T alogénicos agotados y se analizó por citometría de flujo la dilución de CFSE después de 5 días de cultivo. n= 2 a 5 por duplicado. Los resultados se expresan como media ± EEM de la proporción relativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en división. **(B)** Se analizó la proporción relativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en división marcados con CFSE estimulados con PBMC con linfocitos T alogénicos agotados después de 5 días de cultivo en presencia de Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>alto</sup> a relaciones de efector:supresor 1:1. Se evaluó la proliferación después de la adición de Ab bloqueante anti-IL-34 y se comparó con el control isotópico (n= 5-6 por triplicado). La proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en división en condiciones de proliferación de control con PBMC con linfocitos T alogénicos agotados representaba solo aproximadamente un 60 % de las células el día 5 y se le dio un valor de 100 en cada experimento. Los resultados se expresan como media ± EEM de la proporción relativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en división.

## EJEMPLO 1: INTERLEUCINA 34, UN NUEVO MEDIADOR DE CITOCINA ESPECÍFICO DE TREG DE LA TOLERANCIA A TRASPLANTE

### Material y Métodos

**Recogida de sangre de voluntarios sanos y separación de PBMC:** Se recogió sangre de donante sanos, después de dar el consentimiento informado, en el Etablissement Français du Sang (Nantes, Francia). Se diluyó la sangre 2 veces con PBS antes de aislar las PBMC por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque (Eurobio) a 2000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente sin frenado. Se lavaron las PBMC recogidas con 50 ml de PBS a 1800 rpm durante 10 min.

**Modelos animales y de trasplante cardiaco:** Se efectuó el alotrasplante de corazón entre ratas macho LEW-1W (donantes) y LEW-1A (receptores) de MHC incompatible como se describe anteriormente (15). Se evaluó la

supervivencia del corazón por palpación a través de la pared abdominal y se graduó el latido cardiaco de +++ a-. Los experimentos se aprobaron por el comité ético regional para experimentación animal.

**RT-PCR cuantitativa de IL-34:** Se han descrito el aislamiento y retrotranscripción de ARNm así como la cuantificación de los niveles de ARNm específicos usando la tecnología Taqman después de normalización a los valores de HPRT (15). Las secuencias de sonda eran para el cebador directo

5' CTGGCTGTCCTCTACCCTGA 3' (SEQ ID NO: 2)

y para el cebador inverso

5' TGTCGTGGCAAGATATGGCAA 3' (SEQ ID NO: 3).

**Clasificación celular, anticuerpos monoclonales y citometría de flujo:** Se clasificaron los macrófagos en células negativas TCR $\alpha\beta$  (R7/3) y TCR $\gamma\delta$  (V65), células positivas CD45RA-FITC (OX33) y CD11b/c-APC (OX42). Se clasificaron los subconjuntos de linfocitos T LEW.1A CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> no expuestos, pDC LEW.1W y Treg LEW.1A CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> como se describe anteriormente (16). Se obtuvieron los anticuerpos usados para clasificación de linfocitos T (TCR $\alpha\beta$ , clon R7/3), linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (clones OX35 y OX39), linfocitos T CD8<sup>+</sup> (clon OX8), linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> (clones OX8 y OX22), y pDC CD4<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup>85C7<sup>+</sup> (clones His24, OX35 y 85C7) de la European Collection of Cell Culture (Salisbury, RU). Se visualizaron todos los mAb marcados con biotina usando estreptavidina-PE-Cy7 (BD Biosciences) o estreptavidina-Alexa405. Se clasificaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> humanos por selección de poblaciones en células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (clones SKY7, L-200 y MA251), los Treg CD4<sup>+</sup> por selección de poblaciones en células CD25<sup>alto</sup> y CD127<sup>bajo</sup> (clon HIL7-R M21) y los Treg CD8<sup>+</sup> por selección de poblaciones en células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> (clon MT2). Se detectó IL-34-Myc usando un anticuerpo anti-myc (9E10, Sigma). Se bloquearon IL-34, CD115 y MCSF con los anticuerpos anti-IL-34 (PAB16574, Abnova), anti-CD115 (MCA1898, Serotec) y anti-M-CSF (AB-416-NA, R&D System). Se analizaron los anticuerpos contra linfocitos B MHC-II (OX6), CD11b y CD45RA<sup>+</sup> (OX33) para caracteriza el fenotipo celular. Se usaron los anticuerpos contra CD3-PeCy7 (SKY7), CD4-PercPCy5.5 (L200), CD25-APCCy7 (M-A251), CD127-PE (HIL7-R M21, BD Bioscience), CD45RC-FITC (MT2, IQ Product), Foxp3-APC (236A/E7, Ebiosciences) e IL34-PE (578416, R&D) para caracterizar los fenotipos celulares humanos. Se usó un FACS ARIA I (BD Biosciences, Mountain View, CA) para clasificar células. Se usó un citómetro Canto II (BD Biosciences, Mountain View, CA) para medir la fluorescencia y se analizaron los datos usando el software FLOWJO (Tree Star, Inc. EE. UU.). En primer lugar, se seleccionaron poblaciones de células por su morfología, excluyendo las células muertas al seleccionar células viables por DAPI.

**Generación y uso de AAV in vitro e in vivo:** Se colocaron la secuencia de ADNc completa de Q81 que contiene IL-34 de rata (9), o GFP como control, en dirección 3' de un promotor RSV. Se ensayaron en primer lugar los plásmidos en células HEK293T transfectadas con reactivo Lipofectamine (Life Technologies, Carlsbad, Nuevo México). Se analizaron las células por GFP y expresión de IL-34-myc 48 horas después por FACS con Ab anti-myc. Se usaron entonces plásmidos para producir vectores de AAV de serotipo 8 (plataforma LTG, INSERM UMR 1089, Nantes). Se transdujeron células HEK293T con 10.000, 100.000 a 1.000.000 de MOI de copias genómicas del vector/célula de AAV-IL-34 o AAV-GFP y 5.000 de MOI de AdLacZ. 24 h después, se recolectaron las células, se analizó la expresión de IL-34-Myc por FACS y se ensayó en el sobrenadante la actividad de supresión sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup> que responden a pDC alogénicas, a una dilución de 1/10 y 1/5. Se inyectaron vectores AAV-IL-34 y AAV-GFP recombinantes (4,5x10<sup>10</sup>, 1x10<sup>12</sup> y 2x10<sup>12</sup> genomas de vector/rata) *i.v.* en ratas de 4 semanas de edad un mes antes del trasplante para permitir una expresión óptima de vectores AAV (23). Se tomaron muestras de sangre para la cuantificación de anticuerpos aloespecíficos de donante.

**Transferencia adoptiva de células:** Se clasificaron las células de rata como se describe anteriormente (5, 8) por FACS Aria (BD Biosciences, Mountain View, CA) por selección de poblaciones en células positivas TCR $\alpha\beta$ -APC (R7/3), CD45RA-FITC (OX33) y CD11b/c-biotina-estreptavidina PE-Cy7 (OX42). Los receptores que recibieron esplenocitos de ratas tratadas con IL-34 se definen como 1<sup>o</sup> transferidos y las transferencias iterativas se definieron entonces como 2<sup>o</sup> a 3<sup>o</sup> transferido. Se transfirieron adoptivamente *i.v.* los esplenocitos totales (1,5x10<sup>8</sup> células) y linfocitos B CD45RA<sup>+</sup> clasificados por FACS-Aria (6x10<sup>7</sup>), linfocitos T (4x10<sup>7</sup>), células CD11b/c<sup>+</sup> (1,5x10<sup>7</sup>), Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>alto</sup> (4x10<sup>6</sup>) o Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> (4x10<sup>6</sup>) el día antes del trasplante de corazón a receptores LEW-1A no expuestos que habían recibido 4,5 Gy de irradiación de cuerpo entero el mismo día.

**Reacción de linfocitos mixtos:** Se clasificaron subconjuntos de linfocitos T Lewis 1A CD4<sup>+</sup> no expuestos, pDC Lewis 1W no expuestos y Treg Lewis 1A CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> tratados con AdCD40Ig como se describe anteriormente (16). Se añadió suero de receptores tratados con AAV-IL-34, tratados con AdCD40Ig y ratas no expuestas en cocultivo para alcanzar 3,12 %, 6,25 % y 12,5 % de concentración final. Se añadió sobrenadante de células transducidas a linfocitos T CD4<sup>+</sup> y pDC de 10 % a 20 % de concentración final para la prueba de actividad supresora. Se ensayó en Ab bloqueantes de IL-34, CD115 o M-CSF de rata o control isotópico la actividad bloqueante de 1,25 a 30  $\mu$ g/ml en presencia o no de Treg CD8<sup>+</sup>CD40Ig. Se ensayó proteína M-CSF (ab56288, ABCAM) de 0,1 a 2  $\mu$ g/ml. Se analizó la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> marcados con CFSE por citometría de flujo 6 días después, por selección de poblaciones de células TCR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (R7/3-APC, OX35-PECY7) entre las células vivas (negativas de DAPI).

Se sembraron linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> humanos clasificados por triplicado con PBMC con linfocitos T humanos

allogénicos agotados en 200 µl de medio RPMI-1640 completo en placas de 96 pocillos de fondo redondo o cónico, respectivamente, a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se usó Ab de IL-34 humano a 50 µg/ml y se añadieron números variables de Treg. Se usó Ab de control isotópico a la máxima concentración presentada en la gráfica respectiva. Se ensayó la proteína M-CSF (ab56288, ABCAM) de 0,1 a 2 µg/ml. Se añadió IL-34 humana soluble (eBiosciences) a una concentración de 1, 2 o 5 µg/ml para la prueba de actividad supresora.

**Cuantificación de aloanticuerpos específicos de donante:** Se digirieron bazo donantes con colagenasa D, se detuvo con 400 µl de EDTA 0,1 mM y se lisaron los glóbulos rojos. Se añadió suero de receptores a esplenocitos donantes a una dilución 1/8 y se incubó con IgG-FITC anti-rata (Jackson ImmunoResearch Labs INC, Baltimore, EE. UU.), IgG1 anti-rata (MCA 194, Serotec), IgG2a anti-rata (MCA 278, Serotec) o bien IgG2b anti-rata (STAR114F, Serotec) y anti-Ms Ig-FITC (115-095-164, Jackson ImmunoResearch). Se usó un FACS Canto (BD Biosciences, Mountain View, CA) para medir la fluorescencia y se analizaron los datos usando el software FLOWJO (Tree Star, Inc. EE. UU.). Se dividió la media geométrica de fluorescencia (MFI) de los sueros ensayados entre la MFI media de 5 sueros de Lewis 1A no expuestos como control.

**Análisis estadístico:** Se usaron la prueba de Kruskal Wallis de ANOVA de una cola y la prueba posterior de Dunn para experimentos de PCR y cocultivo. Se aplicaron la prueba ANOVA de dos colas y las pruebas posteriores de Bonferroni para anticuerpos dirigidos a donante y caracterización del fenotipo de esplenocitos, y se usó la prueba de Mantel Cox para analizar las curvas de supervivencia.

**Tratamiento *in vivo* con liposomas de clodronato:** Se adquirieron liposomas de clodronato para agotamiento de macrófagos en Vrije University, Holanda ([www.clodronateliposomes.org](http://www.clodronateliposomes.org)) y se prepararon como se recomienda (5041). Brevemente, se administraron semanalmente por vía intraperitoneal 2,5 ml de solución suspendida del día -25 al día 3.

**RT-PCR cuantitativa:** Se aisló ARN total de células usando el reactivo Trizol (Invitrogen) o un kit RNeasy Mini (Qiagen). Se amplificó el ARN de macrófagos con el kit de amplificación MessageAmpTMII aRNA según las instrucciones del fabricante (Life Technologies) y se transcribió de forma inversa con cebadores aleatorios y transcriptasa inversa de M-MLV (Life Technologies). Se realizó la PCR instantánea usando la tecnología Fast SYBR Green en un volumen de reacción final de 20 µl que contiene 10 µl de mezcla maestra 2X (Life Technologies), 0,6 µl de cebadores (10 µM), 1 µl de ADNc y 8,4 µl de agua. Se efectuó la reacción en Applied Biosystems StepOne™ (Life Technologies). Las condiciones térmicas fueron las siguientes: 3 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 15 s a TM-5 °C con un paso de curva de fusión final.

## Resultados

**IL-34 se expresaba por Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> esplénico y el aloinjerto tolerante:** El análisis de micromatriz de ADN de Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg frente a Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> no expuestos de bazo destacaba la regulación positiva de IL-34 (entre los genes más regulados positivamente) por Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg, con un cambio en veces de 4,05. Esta regulación positiva se confirmaba por qPCR con un aumento > 11 veces de la expresión de ARNm de IL-34 en Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg esplénicos a largo plazo en comparación con Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> no expuestos (p<0,05, **Figura 1A**).

Viendo los órganos enteros, el ARNm de IL-34 se expresaba endógenamente en bazo y corazón de animales no expuestos (como se observa por Lin *et al.* (18)) (**Figura 1B**), y disminuía ligeramente durante el rechazo de aloinjerto agudo tanto en bazo como en injerto (**NT, Figuras 1B y 1C**). En correlación con las observaciones anteriores de que los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg se acumulaban en el injerto durante la primera semana (16), la expresión de ARNm de IL-34 aumentaba significativamente el día 5 en injerto y bazo tratados con AdCD40lg (**Figura 1B y 1C**). Este aumento significativo era aún detectable en injerto tratado con AdCD40lg 120 días después del trasplante; sin embargo, en el bazo total, el nivel de ARNm de IL-34 había vuelto a la normalidad.

Para confirmar la expresión de proteína de IL-34, se marcaron Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg con un anticuerpo de ratón anti-IL-34 de rata (Ab) que se generó. Con este Ab, se confirmó la expresión significativa de IL-34 por Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg en comparación con Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> no expuestos (**Figura 1D**).

En conjunto, estos resultados demostraron por primera vez que IL-34 puede expresarse por Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> inducidos, así como aloinjerto tolerado. Además, la expresión temprana de IL-34 en injerto y bazo sugiere su implicación temprana en la inhibición del rechazo de injerto agudo y por tanto el establecimiento de tolerancia a aloinjerto.

**La IL-34 expresada por Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup>, pero no por M-CSF, está implicada en la supresión medida por Treg:** Se demostró anteriormente que los Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg suprimen la proliferación anti-donante de linfocitos T efectoros CD4<sup>+</sup> en respuesta a pDC allogénicas *ex vivo* (16). Además, se demostró la implicación de IFN<sub>γ</sub> y FGL2 en este proceso; sin embargo, permanecía algo de supresión después del bloqueo del efecto inhibitor de IFN<sub>γ</sub> y FGL2 (15, 16). Para abordar si IL-34 estaba implicada en la supresión de Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg, se ensayó un anticuerpo neutralizante anti-IL-34 en el ensayo de MLR supresor (**Figura 2A**). La adición a concentración aumentada de Ab anti-IL-34 bloqueante daba como resultado una reversión aumentada dependiente de la dosis de la proliferación de CD4<sup>+</sup> de hasta un 59 % de la inhibición mediada por Treg CD8<sup>+</sup>.

Dado que IL-34 tiene similitudes con M-CSF, que se observó una expresión significativa de M-CSF por Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg en comparación con Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> no eritados (**Figura 6A**) y que compite por el mismo receptor (18, 19), se quería abordar la posibilidad de que M-CSF pudiera desempeñar un papel en la inhibición de la proliferación de linfocitos T efectores. En primer lugar, se ensayó el potencial supresor de M-CSF en el ensayo de MLR descrito anteriormente. De forma interesante, se observó que M-CSF suprimía eficazmente de manera dependiente de la dosis hasta un 93,5 % de la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (**Figura 6B**), sugiriendo que la supresión mediada por M-CSF, como para IL-34, actúa a través de pDC que expresan CSF1-R (20, 21). Sin embargo, la adición de un Ab anti-M-CSF bloqueante en ensayos supresores de cocultivo en presencia de Treg CD8<sup>+</sup> no restauraba la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, demostrando que M-CSF no estaba implicado en la supresión mediada por Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg (**Figura 2B**).

Se ensayó a continuación la implicación de CSF1-R, el único receptor periférico descrito hasta ahora para IL-34 (18, 19) expresado por monocitos/macrófagos, cDC y pDC (20,21). Por tanto, se usó un Ab bloqueante anti-CSF1-R que se había mostrado anteriormente que inhibía las acciones de M-CSF tanto en ratas como en ratones (22). Se demostró que el bloqueo de CSF1-R anulaba significativamente la supresión mediada por Treg CD8<sup>+</sup> de la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de pDC (**Figura 2C**).

En conclusión, se demostró la implicación de las interacciones IL-34/CSF1-R, pero no las interacciones M-CSF/CSF1-R, en el efecto supresor de Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg.

**Generación de un vector vírico adenoasociado (AAV) para expresión mantenida de IL-34:** Para analizar adicionalmente la actividad supresora de IL-34, y puesto que la citocina de rata IL-34 recombinante no estaba comercialmente disponible y era difícil de producir para experimentos *in vivo*, se generó un vector AAV recombinante que codifica la molécula IL-34 de rata, como se ha hecho para otras moléculas en primates ratas (24). En este vector, se fusionó el ADNc de IL-34 de rata con un marcaje Myc C-terminal y se usaron en primer lugar tanto plásmido (pIL-34) como lentivirus para transfectar o transducir establemente estirpes de linfocitos T HEK293. La expresión de IL-34 se indicaba en citometría de flujo por el marcaje Myc. La tinción con Myc no era detectable en linfocitos T HEK293 no transfectados o transducidos con AAV-GFP, así como en linfocitos T HEK293 teñidos con Ab de control isotópico. Sin embargo, los linfocitos T HEK293 transfectados con pIL-34 o transducidos con AAV-IL-34 expresaban una fuerte cantidad de proteína IL-34 de manera dependiente de la dosis, demostrando la secreción de IL-34 y la funcionalidad del vector.

Se ensayó entonces el potencial supresor del sobrenadante de cultivo de linfocitos T HEK293 transducidos con AAV-IL-34 (**Figura 3A**) y los sueros de ratas tratadas con AAV-IL-34 (**Figura 3B**), que contenían ambos una alta cantidad de proteína IL-34, como se muestra anteriormente. Se observó que tanto el sobrenadante de células transducidas con AAV-IL-34 como los sueros de ratas tratadas con AAV-IL34 inhibían significativamente la respuesta proliferativa de linfocitos T efectores CD4<sup>+</sup> estimulada por pDC alogénicas (de manera dependiente de la dosis) en comparación con los controles (**Figuras 3A y 3B**).

En conjunto, estos resultados demostraban la funcionalidad del vector y la eficacia supresora de IL-34 en la inhibición de la proliferación de linfocitos T efectores, sugiriendo por tanto su potencial *in vivo* en trasplantes.

**Efecto terapéutico de IL-34 en la inducción de tolerancia de aloinjerto:** Para determinar adicionalmente el potencial supresor de IL-34 *in vivo* como estrategia terapéutica, se trataron receptores con 1x10<sup>12</sup> vg/ratade AAV-IL-34 o un AAV no codificante de control, *i.v.*, un mes antes del trasplante. Tal tratamiento con IL-34 sola daba como resultado una prolongación significativa de la supervivencia de aloinjerto (tiempo medio de supervivencia 32,6 ± 7,8 días) frente a controles inyectados con AAV no codificantes (14,2±1,8 días) o receptores no tratados (7,8±0,6 días) (**Figura 4**). Para mejorar la supervivencia de aloinjerto, se trataron entonces los receptores con una dosis subóptima de rapamicina (durante 14 días) además del vector AAV. 14 días de rapamicina sola no extendían significativamente la supervivencia del aloinjerto (**Figura 4, círculo negro**). En contraposición, se observó una supervivencia de aloinjerto indefinida en un 75 % de los receptores que habían recibido la terapia combinada de AAV-IL-34 y rapamicina en comparación con los controles (p< 0,001, **Figura 4**). El análisis en el injerto de receptores de larga supervivencia de signos de rechazo crónico reveló una ausencia completa de lesiones vasculares, concretamente una estructura de vasos normal y ausencia de infiltración leucocítica en el miocardio en todos los receptores analizados. Además, el análisis de la presencia de anticuerpos anti-donante en los sueros de receptores de larga supervivencia reveló una inhibición significativa de los Av IgG, IgG1, IgG2a y IgG2b totales anti-donante frente al receptor tratado con el AAV no codificante.

En conjunto, pudo demostrarse por primera vez que IL-34 es una estrategia terapéutica valiosa para la inducción de tolerancia en combinación con rapamicina y que daba como resultado una anulación de todas las respuestas inmunitarias alogénicas.

**IL-34 induce potentemente linfocitos T reguladores capaces de tolerancia infecciosa:** Como se demuestra anteriormente, IL-34 se produce específicamente por Treg CD8<sup>+</sup>CD40lg. Se valoró a continuación si se inducían células reguladoras en el contexto del tratamiento con IL-34 y estaban implicadas en la supervivencia de aloinjerto a largo plazo generada por la combinación de AAV-IL-34 y rapamicina. Para hacer eso, se efectuaron experimentos de transferencia celular adoptiva usando esplenocitos de receptores de larga supervivencia en receptores irradiados

inertados no expuestos, como se ha hecho antes (15). La primera transferencia adoptiva de  $1,5 \times 10^8$  esplenocitos en receptores irradiados inertados no expuestos secundarios daba como resultado una prolongación significativa de la supervivencia del aloinjerto del 60 % de los receptores (**Figura 5A**), demostrando que IL-34 induce eficazmente células reguladoras. Se investigó el estado anatomopatológico del injerto de receptores de esplenocitos a largo plazo transferidos adoptivamente por primera vez y se observó una ausencia completa de lesiones y obstrucciones vasculares (concretamente, sin signos de rechazo crónico). Se determinó entonces si esta prolongación de la supervivencia de aloinjerto puede transferirse en serie a segundos y terceros receptores y se observó que la tolerancia puede transferirse en serie al menos 3 veces a receptores irradiados inertados no expuestos (**Figura 5, 2ª y 3ª transferencia**).

Dado que se ha descrito recientemente que IL-34 induce macrófagos reguladores (25), se investigó la población reguladora que permite la transferencia de tolerancia adoptiva en serie incluyendo macrófagos. Para hacer esto, se purificaron subpoblaciones de los diferentes subconjuntos principales (linfocitos B, linfocitos T y macrófagos) de receptores tolerantes tratados con IL-34 y se efectuó la transferencia celular adoptiva a receptores inertados irradiados no expuestos (**Figura 5B**). Con sorpresa, se observó que la transferencia de tolerancia se conseguía solo con transferencia de linfocitos T, y no de macrófagos como se sugiere por otros, demostrando por primera vez que IL-34 puede inducir linfocitos T reguladores y que, en este modelo, los macrófagos no eran suficientemente potentes para inhibir el rechazo agudo de aloinjerto. Sin embargo, los linfocitos T reguladores no expresan el receptor de IL-34, sugiriendo que los macrófagos son un intermedio necesario en las funciones de linfocitos T reguladores. Para determinar adicionalmente cuál población de Treg (concretamente, linfocitos T  $CD4^+CD25^{\text{alto}}$  o  $CD8^+CD45RC^{\text{bajo}}$ ) podría dar tolerancia a receptores recién inertados, se clasificaron Treg  $CD4^+CD25^{\text{alto}}$  y  $CD8^+CD45RC^{\text{bajo}}$  y se efectuó la transferencia celular adoptiva (**Figura 5B**). Se observó que tanto las transferencias adoptivas de Treg  $CD4^+CD25^{\text{alto}}$  como  $CD8^+CD45RC^{\text{bajo}}$  daban como resultado un 50 % de supervivencia del aloinjerto a largo plazo en receptores, sugiriendo que ambas poblaciones de Treg se habían potenciado igualmente por los macrófagos modificados por IL-34.

En conjunto, estos resultados in vivo demuestran que se generan Treg eficaces después del tratamiento con IL-34 en el contexto de inflamación reducida y trasplante, y que esos Treg pueden inducir tolerancia en serie de forma dominante.

**La inducción de Treg está mediada por macrófagos modificados por IL-34 que se infiltran en el injerto:** En un intento de identificar adicionalmente el papel de los macrófagos inducidos por IL-34 en la inducción de tolerancia, se caracterizó el efecto de IL-34 sobre macrófagos en el contexto de inducción de tolerancia a un aloinjerto. Se clasificaron primero los macrófagos de bazo, sangre e injerto de receptores tratados con AAV-IL-34 el día 15 después del trasplante (concretamente, día 45 después de la inyección de AAV) y macrófagos de ratas no expuestas y se analizaron por qPCR una serie de genes (**Figura 7**). De forma interesante, se observó que los macrófagos en el injerto de receptores tratados con AAV-IL-34 regulaban positivamente con fuerza arginasa 1 y NO sintasa inducible (iNOS), ambas implicadas en el metabolismo de aminoácidos esenciales y descritas como un mecanismo común de inmunoregulación de macrófagos supresores al limitar la proliferación de linfocitos T (34), en comparación con macrófagos no expuestos. Se observó también una expresión aumentada de CD14 y una expresión disminuida de CD23, CD86 e IL10, sobre todo en el injerto, pero también en el bazo y la sangre de macrófagos tratados con AAV-IL34 en comparación con macrófagos no expuestos. Finalmente, no se observaron diferencias significativas para la expresión de CD16, CD32, IL1, TGF $\beta$  and TNF $\alpha$ . Es también interesante señalar que había diferencias significativas entre los macrófagos localizados en la sangre frente al injerto, sugiriendo que los macrófagos reguladores modificados por IL-34 migran y se localizan en el injerto rápidamente después del trasplante. Se agotaron adicionalmente las poblaciones de macrófagos usando liposomas cargados con clodronato del día -25 antes del trasplante al día 3 después del trasplante y se trataron simultáneamente con IL-34 o AAV no codificante más dosis subóptima de rapamicina durante 10 días, como se describe anteriormente por otros. Desgraciadamente, esta terapia daba como resultado en sí misma la supervivencia del injerto y no pudo usarse para revelar el papel de los macrófagos inducidos por IL-34. Al hacer esto, los AAV-IL-34 inyectados 30 días antes del trasplante no pudieron actuar a través de macrófagos, que se agotaron al mismo tiempo. De forma significativa, para el momento en que se inició el agotamiento de liposomas, la mayoría del serotipo 8 de AAV se había integrado en los hepatocitos del hígado. Se observó que los receptores tratados con liposomas cargados con clodronato rechazaban su injerto más rápidamente después del trasplante en comparación con el grupo de control, demostrando que los macrófagos son esenciales en la inducción de tolerancia por IL-34 (**Figura 8**).

**IL-34 posee un fuerte potencial supresor:** Como se sospechaba un potencial supresor de IL-34 en seres humanos, se añadieron diferentes dosis de IL-34 humana soluble a una MLR, donde se cultivaron linfocitos T efectores  $CD4^+CD25^-$  marcados con CFSE en presencia de PBMC alogénicas con linfocitos T agotados como APC (**Figura 9A**). Se observó una inhibición significativa dependiente de la dosis de la proliferación de linfocitos T efectores en presencia de IL-34, confirmando por tanto el potencial supresor de IL-34 sobre la respuesta inmunitaria anti-donante. Finalmente, para demostrar la implicación de IL34 en la actividad supresora mediada por Treg  $CD4^+CD25^{\text{alto}}CD127^{\text{bajo}}$  y  $CD8^+CD45RC^{\text{bajo}}$  sobre las respuestas inmunitarias anti-donante, se añadió Ab bloqueante anti-IL-34 humana o bien Ab de isotipo de control a una MLR donde se inhibía por Treg la proliferación de linfocitos T efectores  $CD4^+CD25^-$  marcados con CSFE en presencia de PBMC con linfocitos T alogénicos agotados (**Figura 9B**). Se observó que bloquear IL-34 revertía significativamente la supresión mediada por Treg tanto de Treg  $CD4^+$  como  $CD8^+$  en

comparación con el Ab de control de isotipo, demostrando el papel clave de IL-34 en la actividad supresora de Treg.

En conjunto, estos datos prueban la relevancia de estos hallazgos y proporcionan la prueba de concepto de IL-34 como una proteína específica de Treg y una diana terapéutica potencial en la manipulación de la respuesta inmunitaria anti-donante.

## 5 DISCUSIÓN

La relevancia biológica de IL-34 permanece hasta la fecha desconocida en gran medida y es controvertida. La comprensión actual del papel de IL-34 estaba impulsada sobre todo por el estudio en situaciones patológicas en que se encontraba que IL-34 ejercía funciones inflamatorias, tales como M-CSF. Diversos estudios han mostrado que la administración de M-CSF aumenta la inflamación en un modelo de AR inducida por colágeno (26) y que IL-34 se correlaciona con la gravedad de sinovitis, inflamación en un modelo de AR (13) y puede inducirse por  $TNF\alpha$ , como M-CSF (27). Además, tanto IL-34 como M-CSF inducen citocinas proinflamatorias como IL-6, IP10/CXCL10, IL-8/CXCL8, MCP1/CCL2 (28). En contraposición con estos estudios, se ha mostrado también que M-CSF, y más recientemente IL-34, solas o en combinación con otras citocinas, pueden inducir macrófagos reguladores (25, 29-32). En trasplantes, se ha demostrado que el pretratamiento con M-CSF de ratones expande los macrófagos e inhibe la EICH (33). Además, la combinación de M-CSF e  $IFN\gamma$  diferencia los monocitos a macrófagos reguladores capaces de prolongar la supervivencia de aloinjerto cardiaco de manera dependiente de iNOS (34). Estos estudios subrayan el papel paradójico de IL-34. En este estudio, en un intento de desentrañar los complejos mecanismos de inducción de tolerancia en trasplantes, se proporcionan evidencias, por primera vez, de las propiedades inesperadas de IL-34 como regulador maestro de las respuestas y tolerancia inmunitarias. Se proporciona también la primera prueba de que IL-34 puede expresarse por aloinjertos tolerados y Treg  $CD8^+CD45RC^{bajo}$ , y lo más importante puede inducir linfocitos T reguladores potentes.

Se demostró anteriormente que el tratamiento de receptores de injerto cardiaco con un adenovirus que codifica CD40Ig conduce a una supervivencia de aloinjerto indefinida en el 93 % de los receptores, y que esta aceptación estaba mediada por Treg  $CD8^+CD45RC^{bajo}$  de manera dependiente de  $IFN\gamma$ ,IDO y FGL2. Se demostró más recientemente que los Treg  $CD8^+CD45RC^{bajo}$  recombinaban un repertorio de  $V\beta 11$  restringido sesgado para reconocer un péptido derivado de MHC de clase II dominante, y que este péptido induce Treg reguladores e induce tolerancia (17). En la presente memoria descriptiva, se muestra que IL-34 se expresaba a alto nivel por injertos tolerados de receptores tratados con AdCD40Ig, y de forma importante, también por Treg  $CD8^+CD45RC^{bajo}$  esplénicos de los mismos receptores. Además, la supresión mediada por Treg  $CD8^+CD45RC^{bajo}$  puede anularse parcialmente por el bloqueo de IL-34. Por tanto, IL-34 posee propiedades inmunosupresoras que no se han estudiado nunca hasta ahora, y actúa en sinergia con FGL2, IDO e  $IFN\gamma$  en el modelo de CD40Ig de supresión mediada por Treg  $CD8^+CD45RC^{bajo}$  (16).

Se demostró también que esta propiedad era específica de IL-34, puesto que se observó que M-CSF no estaba implicado en este modelo. Las evidencias acumuladas sugieren que IL-34 y M-CSF exhiben propiedades específicas y no redundantes. Esto se resalta por la comparación del análisis estructural, que muestra que IL-34 y M-CSF se unen diferentemente a CD115 (11, 19). La identificación más recientemente de un segundo receptor distinto para IL-34 refuerza esta interpretación (10). Muy recientemente, se han generado ratones deficientes de IL-34 y han mostrado la desaparición de ciertos subconjuntos celulares tales como células de Langerhan y microglía (12), efectos que no se habían observado en ratones con desactivación génica de M-CSF y demostrando no solo un papel de expresión temporal y espacial diferente, sino también efectos funcionales diferentes para IL-34 frente a M-CSF.

El valor terapéutico de esta molécula se evidenció con la generación de un AAV que codifica IL-34. Con este vector, se pudieron mostrar por primera vez las potentes propiedades inmunosupresoras de IL-34 in vitro y, lo más importante in vivo, donde se obtuvo una supervivencia de aloinjerto indefinida en el 80 % de los receptores cuando se combinaba con una dosis subóptima de rapamicina. Se demostró también que tal terapia daba como resultado la anulación de respuestas inmunitarias alogénicas y la inducción de tolerancia. Estudios anteriores demostraron que tanto M-CSF como IL-34 pueden diferenciar monocitos en macrófagos reguladores (25, 34) y que los macrófagos reguladores inducidos in vitro por M-CSF e  $IFN\gamma$  pueden usarse in vivo para prolongar la supervivencia de aloinjerto cardiaco en ratones (34). Otro estudio demostró en ratones que la administración de M-CSF antes del trasplante puede expandir macrófagos y por tanto limitar la expansión de linfocitos T donantes y la EICH (33). Chen et al. mostraron en ratones tratados con proteína IL-34 soluble un aumento de la población de  $CD11b^+$  (35). Además, otros estudios señalaron una disminución de pDC y cDC en ratones osteopetróticos deficientes en CSF-1 (21), y un aumento inducido por CFS1 en el número de DC (20). Sorprendentemente, y en contraposición con otros estudios, el efecto tolerogénico de IL-34 in vivo después de la administración estaba mediado por linfocitos T reguladores. Es más, se demostró que la tolerancia obtenida en receptores tratados con AAV-IL-34 podía transferirse a receptores irradiados recién injertados durante al menos 3 generaciones y que este efecto estaba mediado por Treg pero, a pesar del aumento observado de la población de  $CD11b^+$ , no por macrófagos. Sin embargo, puesto que los Treg no expresan el receptor de IL-34, puede plantearse la hipótesis de que IL-34 mediaba su efecto sobre Treg mediante macrófagos, ya que se ha mostrado en la bibliografía que los macrófagos reguladores pueden anergizar los linfocitos T efectoros  $CD4$  (36), convirtiendo linfocitos T en Treg (37) o inhibiendo otra presentación de APC (38). No pudo concluirse que IL-34 induzca macrófagos reguladores en este modelo, pero estos son intermedios necesarios en los Treg inducidos por IL-34. Estos resultados destacan las diferencias funcionales de IL-34 y M-CSF y la controversia sobre este tema, ya que varios estudios mostraron el papel proinflamatorio de M-CSF, que aumenta la proliferación de macrófagos y la acumulación en

aloinjerto renal rechazado (39).

En conclusión, se ha descrito aquí el papel en la tolerancia al trasplante de una nueva citocina, IL-34, y se ha revelado su potencial como terapia en trasplantes o como biomarcador asociado a un mejor pronóstico en trasplantes, pero también por extensión en otras enfermedades. Se ha demostrado también por primera vez que esta citocina puede producirse por Treg CD8<sup>+</sup> y que puede, a su vez, inducir Treg capaces de inducción de tolerancia de manera dominante, abriendo nuevas posibilidades en la generación de Treg transferibles a un entorno humano.

#### REFERENCIAS:

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

1. Nankivell BJ, *et al.* (2003) The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349(24): 2326-2333.
2. Srinivas TR y Kaplan B (2012) Transplantation in 2011: New agents, new ideas and new hope. *Nat Rev Nephrol* 8(2): 74-75.
3. Londono MC, *et al.* (2012) A need for biomarkers of operational tolerance in liver and kidney transplantation. *Am J Transplant* 12(6): 1370-1377.
4. Wood KJ, Bushell A y Hester J (2012) Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 12(6): 417-430.
5. Niederkorn JY (2008) Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. *Curr Opin Immunol* 20(3): 327-331.
6. Picarda E, Anegon I y Guillonneau C (2011) T-cell receptor specificity of CD8(+) Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy* 3(4 Supl): 35-37.
7. Guillonneau C, Picarda E y Anegon I (2010) CD8+ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 15(6): 751-756.
8. Menoret S, *et al.* (2011) Phenotypic and functional characterization of CD8(+) T regulatory cells. *Methods Mol Biol* 677: 63-83.
9. Wei S, *et al.* (2010) Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J Leukoc Biol* 88(3): 495-505.
10. Nandi S, *et al.* (2013) Receptor-type protein-tyrosine phosphatase zeta is a functional receptor for interleukin-34. *J Biol Chem* 288(30): 21972-21986.
11. Chihara T, *et al.* (2010) IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ* 17(12): 1917-1927.
12. Wang Y, *et al.* (2012) IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol* 13(8): 753-760.
13. Chemel M, *et al.* (2012) Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 71(1): 150-154.
14. Baud'huin M, *et al.* (2010) Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Pathol* 221(1): 77-86.
15. Guillonneau C, *et al.* (2007) CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117(4): 1096-1106.
16. Li XL, *et al.* (2010) Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol* 185(2): 823-833.
17. Picarda E, *et al.* (2014) MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8+ Tregs and suppresses organ rejection. *J Clin Invest*.
18. Lin H, *et al.* (2008) Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 320(5877): 807-811.
19. Garceau V, *et al.* (2010) Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J Leukoc Biol* 87(5): 753-764.
20. Fancke B, Suter M, Hochrein H y O'Keeffe M (2008) M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood* 111(1): 150-159.



21. MacDonald KP, *et al.* (2005) The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J Immunol* 175(3): 1399-1405.
22. Gilmore GL y Shadduck RK (1995) Inhibition of day-12 spleen colony-forming units by a monoclonal antibody to the murine macrophage/monocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood* 85(10): 2731-2734.
- 5 23. Toromanoff A, *et al.* (2008) Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol Ther* 16(7): 1291-1299.
24. Le Texier L, *et al.* (2012) Immunoregulatory function of IL-27 and TGF-beta1 III cardiac allograft transplantation. *Transplantation* 94(3): 226-233.
- 10 25. Foucher ED, *et al.* (2013) IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN-gamma. *PLoS One* 8(2): e56045.
26. Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ y Hamilton JA (2000) The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J Leukoc Biol* 68(1): 144-150.
- 15 27. Hamilton JA (2008) Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8(7): 533-544.
28. Eda H, *et al.* (2010) Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood. *Cytokine* 52(3): 215-220.
29. Doyle AG, Halliday WJ, Barnett CJ, Dunn TL y Hume DA (1992) Effect of recombinant human macrophage colony-stimulating factor 1 on immunopathology of experimental brucellosis in mice. *Infect Immun* 60(4): 1465-1472.
- 20 30. Sakurai T, Wakimoto N, Yamada M, Shimamura S y Motoyoshi K (1998) Effect of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on mouse immune responses in vivo. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20(1): 79-102.
31. Sakurai T, Yamada M, Simamura S y Motoyoshi K (1996) Recombinant human macrophage-colony stimulating factor suppresses the mouse mixed lymphocyte reaction. *Cell Immunol* 171(1): 87-94.
- 25 32. Duluc D, *et al.* (2007) Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 110(13): 4319-4330.
33. Hashimoto D, *et al.* (2011) Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Exp Med* 208(5): 1069-1082.
34. Riquelme P, *et al.* (2013) IFN-gamma-induced iNOS expression in mouse regulatory macrophages prolongs allograft survival in fully immunocompetent recipients. *Mol Ther* 21(2): 409-422.
- 30 35. Chen Z, Buki K, Vaaraniemi J, Gu G y Vaananen HK (2011) The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLoS One* 6(4): e18689.
36. Tzachanis D, Berezovskaya A, Nadler LM y Boussiotis VA (2002) Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood* 99(4): 1465-1473.
- 35 37. Liu G, *et al.* (2011) An instructive role of donor macrophages in mixed chimeras in the induction of recipient CD4(+)Foxp3(+) Treg cells. *Immunol Cell Biol* 89(8): 827-835.
38. Holt PG, Schon-Hegrad MA y Oliver J (1988) MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J Exp Med* 167(2): 262-274.
- 40 39. Jose MD, Le Meur Y, Atkins RC y Chadban SJ (2003) Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allograft rejection. *Am J Transplant* 3(3): 294-300.
- 40 40. Ma X, Lin WY, Chen Y, Stawicki S, Mukhyala K, Wu Y, Martin F, Bazan JF, Starovasnik (2012) MA Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure* 4 de abril; 20(4): 676-87.
- 45 41. Van Rooijen, N. y Sanders, A. 1994. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174: 83-93.
42. Jain NK, Mishra V, Mehra NK. Targeted drug delivery to macrophages. *Expert Opin Drug Deliv.* marzo de 2013; 10(3): 353-67.

Lista de secuencias

5 <110> INSERM  
UNIVERSITE DE NANTES

10 <120> UN POLIPÉPTIDO DE INTERLEUKIN-34 AISLADO PARA SU USO EN LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO DE  
TRASPLANTES Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

15 <130> BIO13308GUILLONNEAU

20 <150> EP14306165.3  
<151> 2014-07-17

25 <150> EP15305935.7  
<151> 2015-06-16

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 242  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

30

ES 2 710 444 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Pro

5 <210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Cebador hacia delante IL-34 cuantitativo RT-PCR

15 <400> 2  
ctggctgtcc tctaccctga 20

<210> 3  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Cebador reverso IL-34 cuantitativo RT-PCR

25 <400> 3  
tgtcgtggca agatatggca a 21

30 <210> 4  
<211> 256  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

35 <400> 4  
Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu  
1 5 10 15

ES 2 710 444 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5  
 <211> 554  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

ES 2 710 444 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 710 444 T3

Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser  
 245 250 255  
 Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser  
 260 265 270  
 Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn  
 275 280 285  
 Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val  
 290 295 300  
 Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly  
 305 310 315 320  
 Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu  
 325 330 335  
 Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala  
 340 345 350  
 Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro  
 355 360 365  
 Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro  
 370 375 380  
 Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro  
 405 410 415  
 Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly  
 420 425 430  
 Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp  
 435 440 445  
 Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala  
 450 455 460  
 Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly  
 465 470 475 480  
 His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser  
 485 490 495

ES 2 710 444 T3

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

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

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

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

<210> 6  
 <211> 438  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 710 444 T3

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala  
 165 170 175  
 Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His  
 195 200 205  
 Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu  
 210 215 220  
 Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro  
 225 230 235 240  
 Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser  
 245 250 255  
 Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser  
 260 265 270  
 Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn  
 275 280 285  
 Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val  
 290 295 300  
 Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly  
 305 310 315 320  
 Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu  
 325 330 335  
 Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala  
 340 345 350  
 Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly His Glu Arg Gln  
 355 360 365  
 Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu  
 370 375 380  
 Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp  
 405 410 415  
 Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg  
 420 425 430  
 Gln Val Glu Leu Pro Val  
 435



ES 2 710 444 T3

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

5 <220>  
 <223> Fragmento de humano recombinante M-CSF de 150 aminoácidos

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10 Leu Leu Glu Lys Val Lys  
 145 150

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de interleucina 34 (IL-34) aislado o un polinucleótido que codifica el mismo para uso en la inducción de tolerancia inmunitaria en un paciente necesitado de ello.
- 5 2. Un polipéptido de IL-34 aislado o un polinucleótido que codifica el mismo para uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplante en un paciente necesitado de ello.
3. El polipéptido de IL-34 aislado o un polinucleótido que codifica el mismo para uso según la reivindicación 2, en el que el rechazo de trasplante es rechazo de alotrasplante cardiaco.
- 10 4. Un polipéptido de IL-34 aislado o un polinucleótido que codifica el mismo para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, respuesta inmunitaria indeseada contra proteínas terapéuticas y alergias en un paciente necesitado de ello.
5. El polipéptido de IL-34 aislado o el polinucleótido que codifica el mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polipéptido de IL-34 tiene una secuencia que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 15 6. Una composición farmacéutica o una composición de kit de piezas que comprende un polipéptido de IL-34 aislado o un polinucleótido que codifica el mismo y un fármaco inmunosupresor.
- 20 7. La composición farmacéutica o la composición de kit de piezas según la reivindicación 6, en las que el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo consistente en citostáticos tales como inhibidores de diana de rapamicina de mamífero (mTOR) y rapamicina (sirolimús); agentes alquilantes (ciclofosfamidas) y antimetabolitos (azatioprina, mercaptopurina y metotrexato); anticuerpos terapéuticos (tales como anticuerpos monoclonales anti-CD40L, anticuerpos monoclonales anti-IL-2R, anticuerpos monoclonales anti-CD3, globulina antilinfocítica (GAL) y globulina antitimocítica (GAT)); inhibidores de calcineurina (ciclosporina); glucocorticoides y micofenolato de mofetilo.
- 25 8. La composición farmacéutica o la composición de kit de piezas según la reivindicación 7, en las que el fármaco inmunosupresor es rapamicina (sirolimús).
9. La composición farmacéutica o la composición de kit de piezas según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para uso en la prevención o el tratamiento de rechazo de trasplante, enfermedades autoinmunitarias, respuestas inmunitarias indeseadas contra proteínas terapéuticas y alergias.
- 30 10. Un método *in vitro* para determinar si un paciente está en riesgo de rechazo de trasplante, enfermedades autoinmunitarias, respuesta inmunitaria indeseada contra proteínas terapéuticas o alergias, que comprende una etapa de determinación del nivel de expresión de IL-34 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que la presencia de IL-34 es indicativa de un riesgo reducido de rechazo de trasplante, enfermedades autoinmunitarias, respuesta inmunitaria indeseada contra proteínas terapéuticas o alergias.
- 35 11. El método según la reivindicación 10, en el que el nivel de expresión de IL-34 se determina midiendo la concentración de IL-34 en dicha muestra biológica.
12. El método según las reivindicaciones 10 u 11, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre (muestra de suero o plasma).
13. El método para determinar el riesgo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para ajustar el tratamiento inmunosupresor administrado a un paciente necesitado de ello.

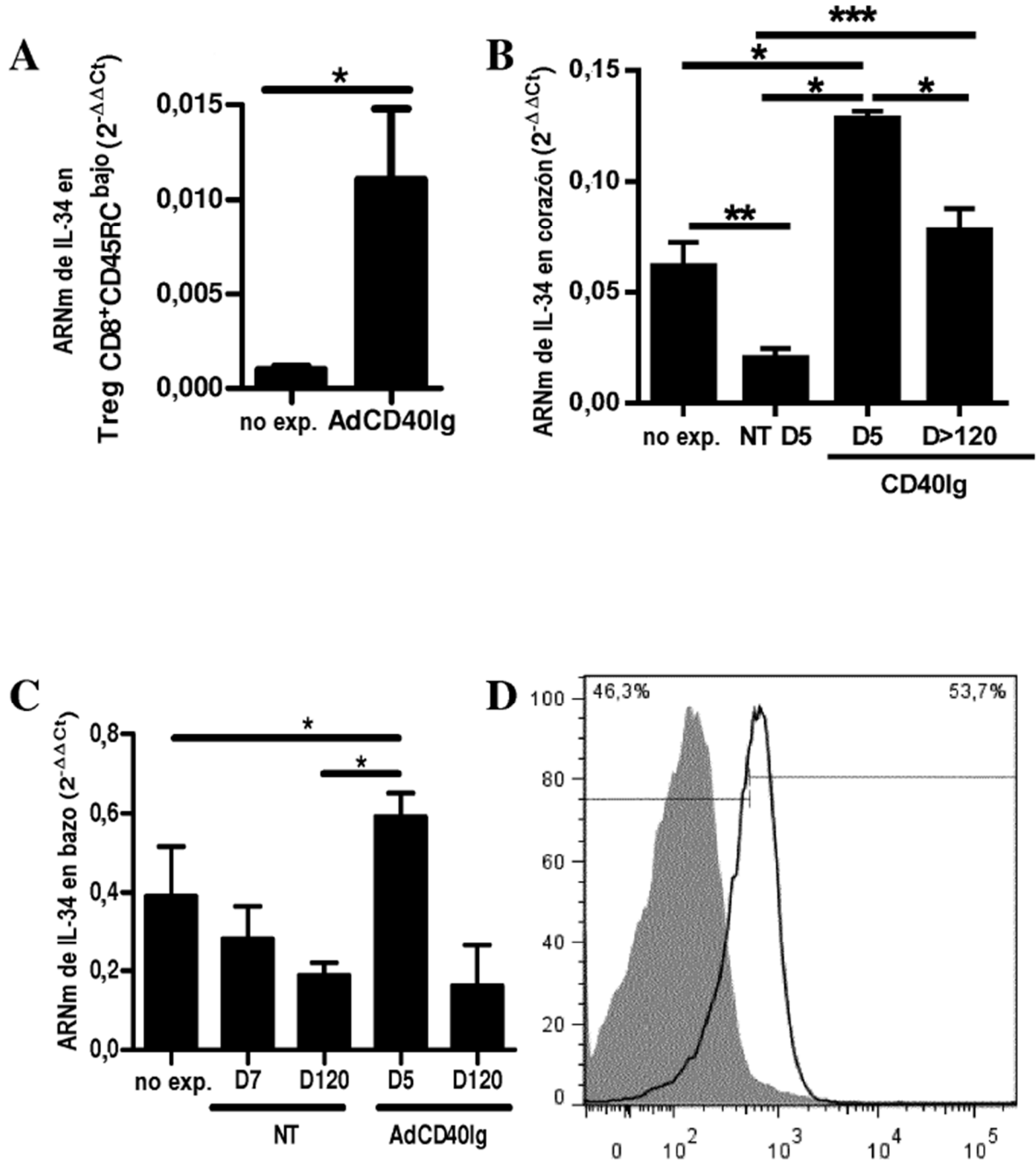
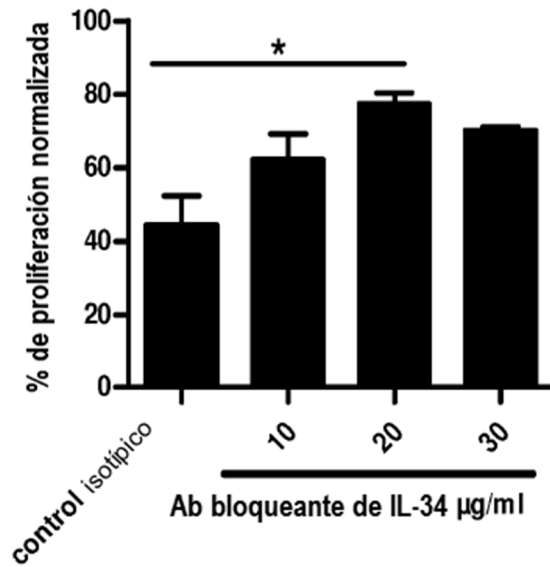


Figura 1

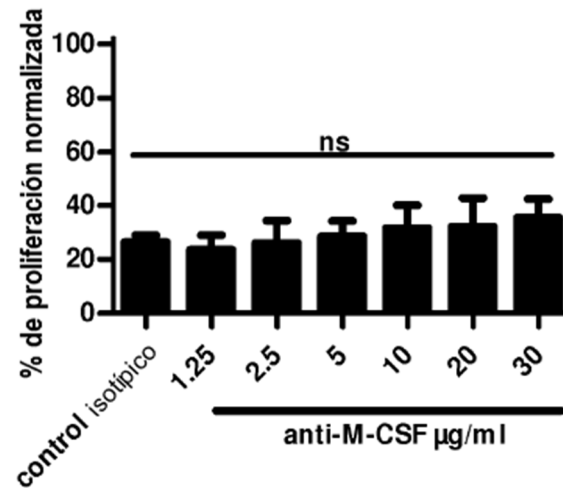
**A**

La supresión de Treg CD8<sup>+</sup> está mediada por IL-34



**B**

La supresión de Treg CD8<sup>+</sup> no está mediada por M-CSF



**C**

La supresión de Treg CD8<sup>+</sup> está parcialmente mediada por CD115

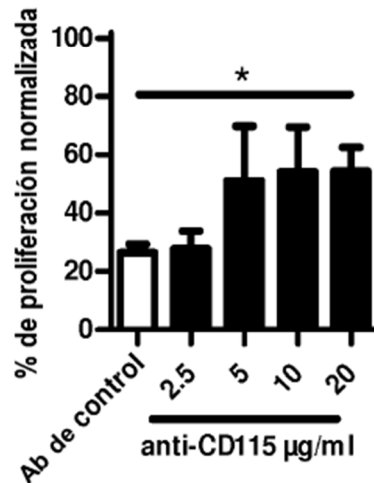
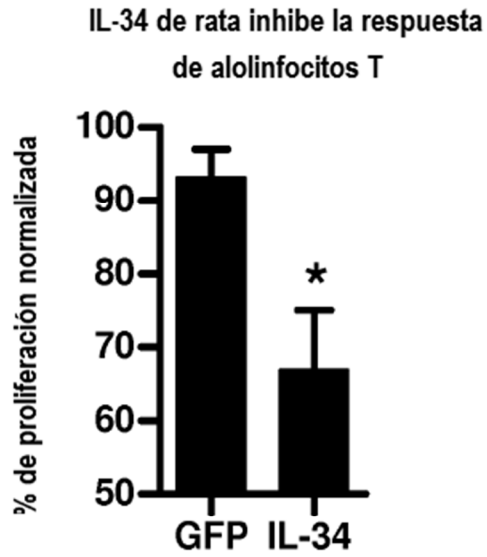


Figura 2

**A**



**B**

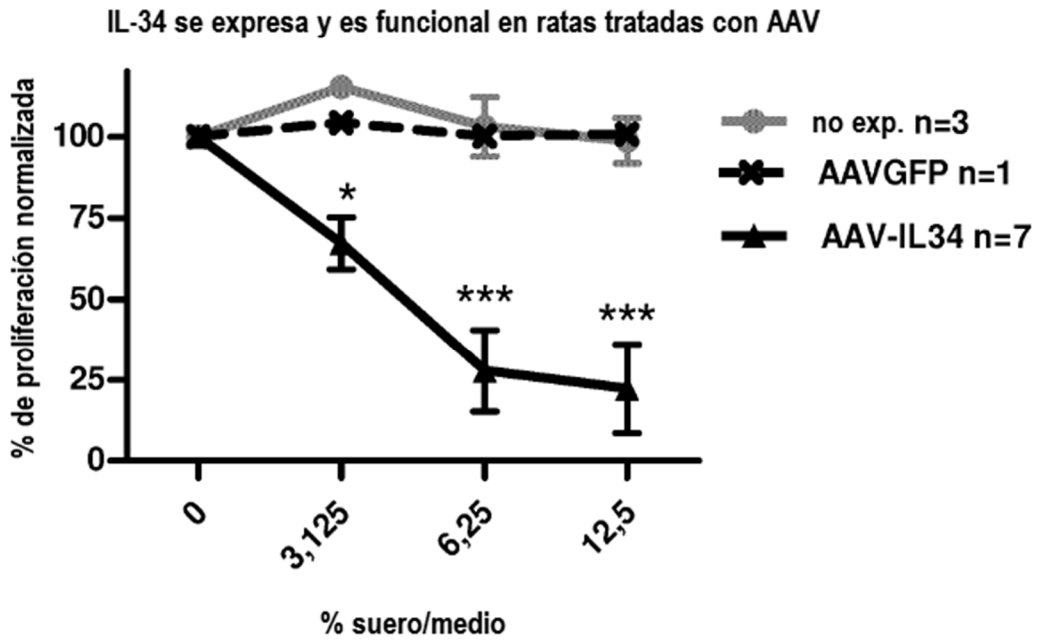


Figura 3

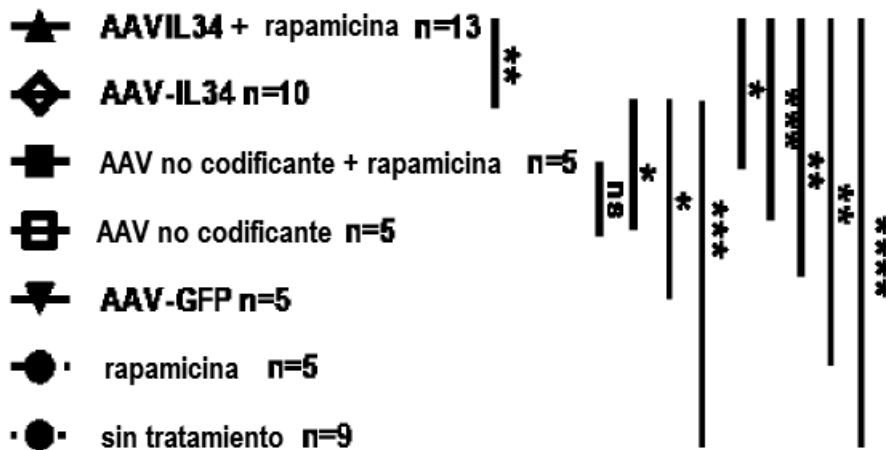
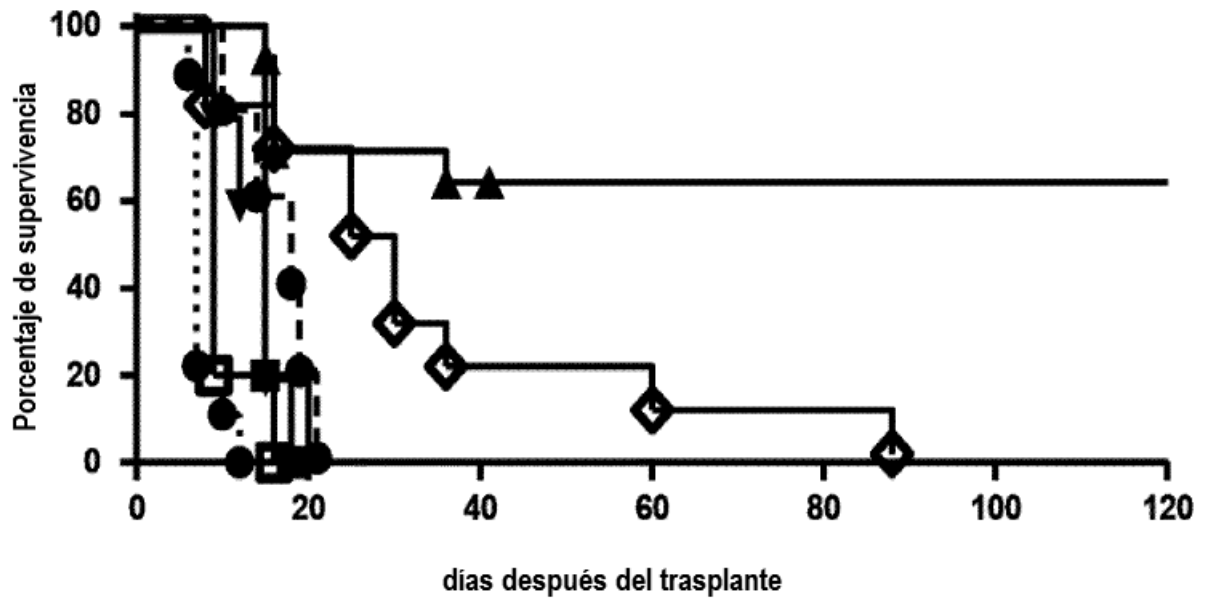


Figura 4

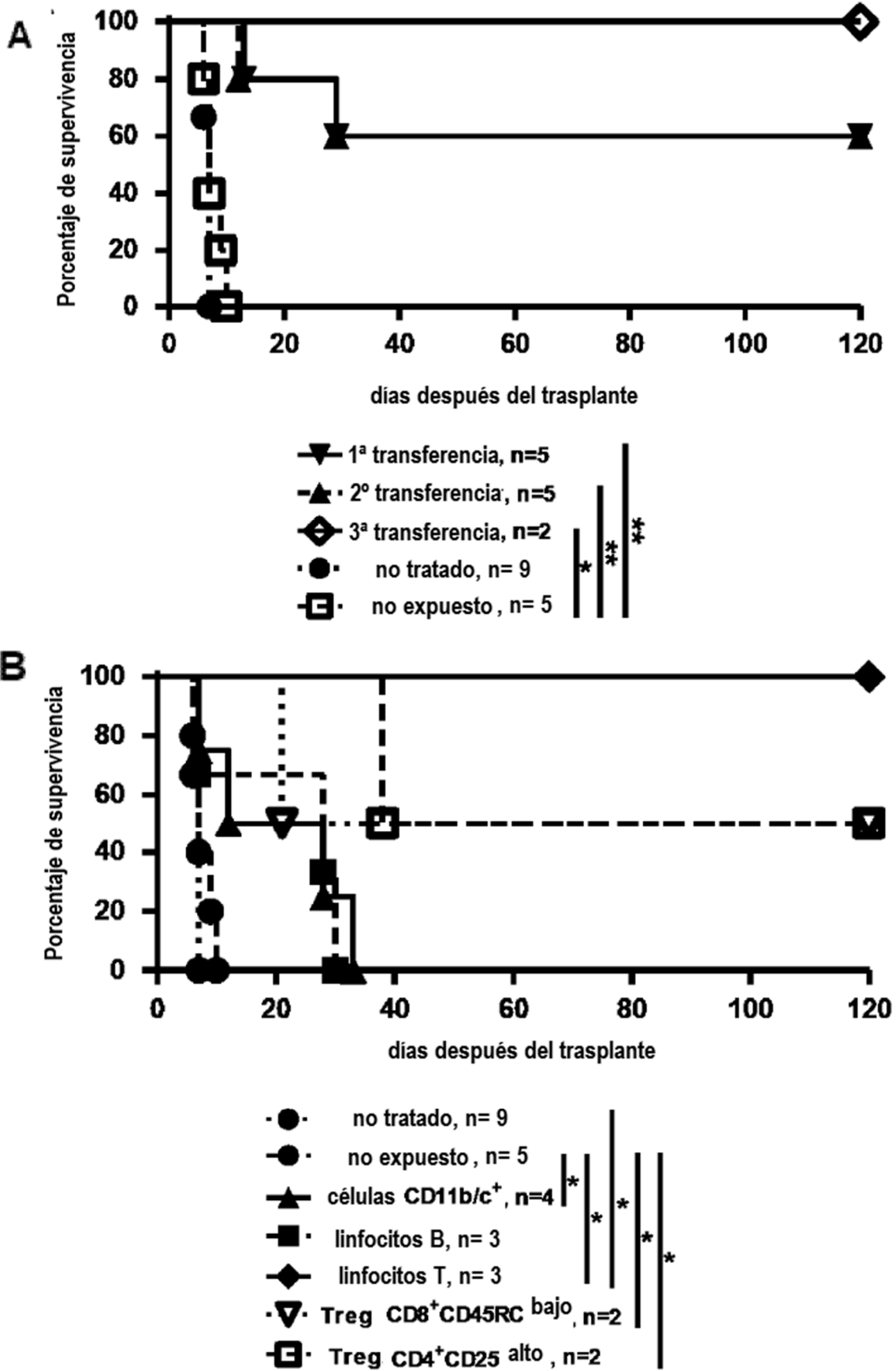


Figura 5

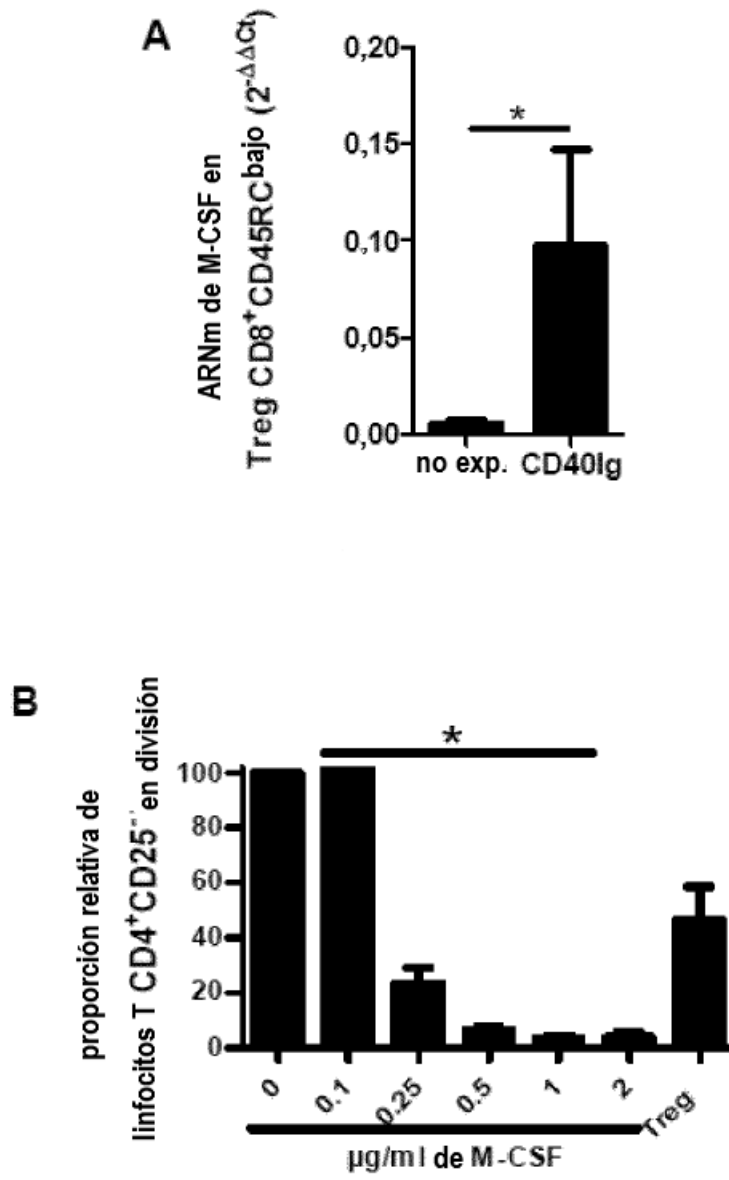


Figura 6



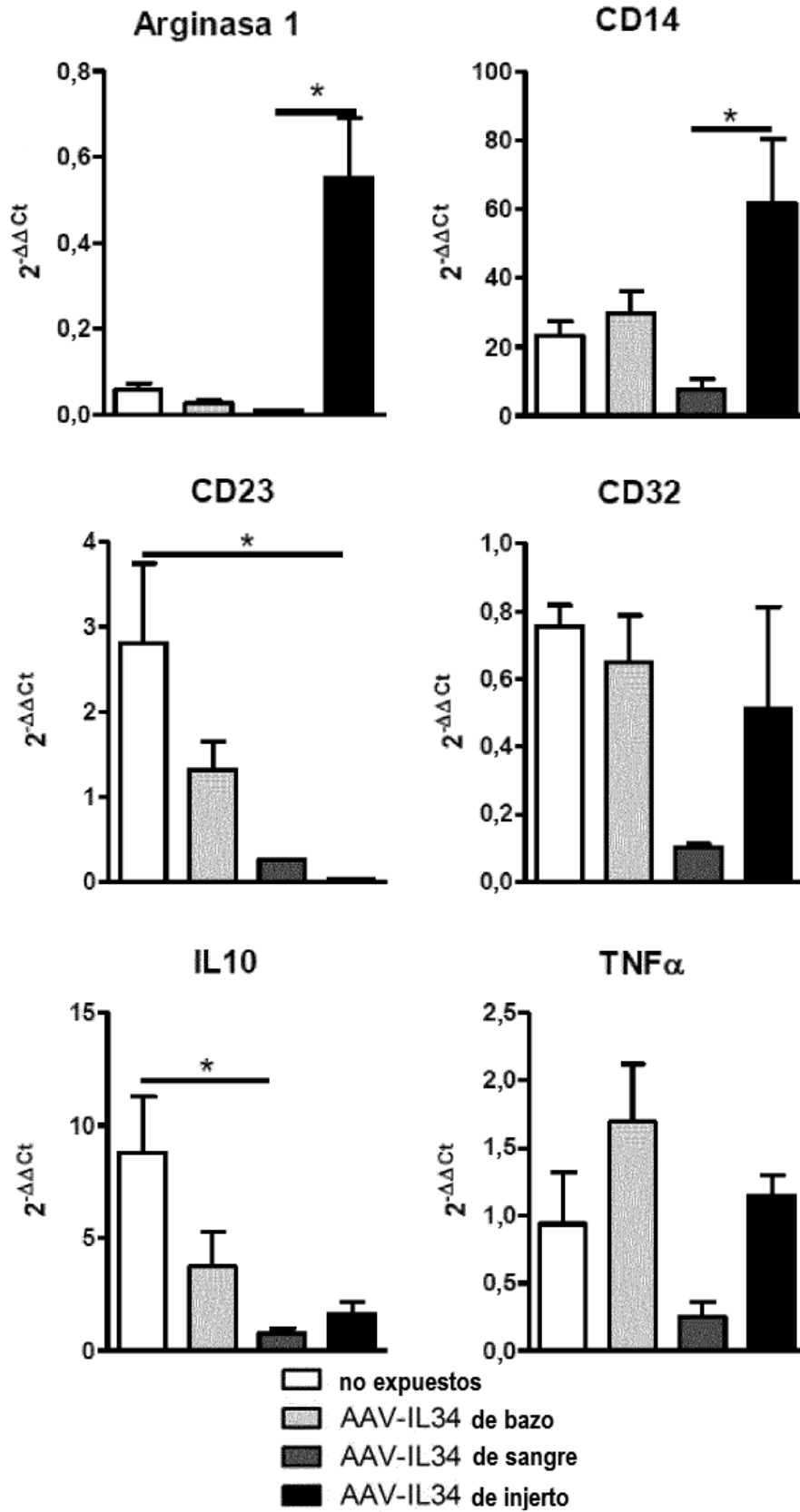


Figura 7A

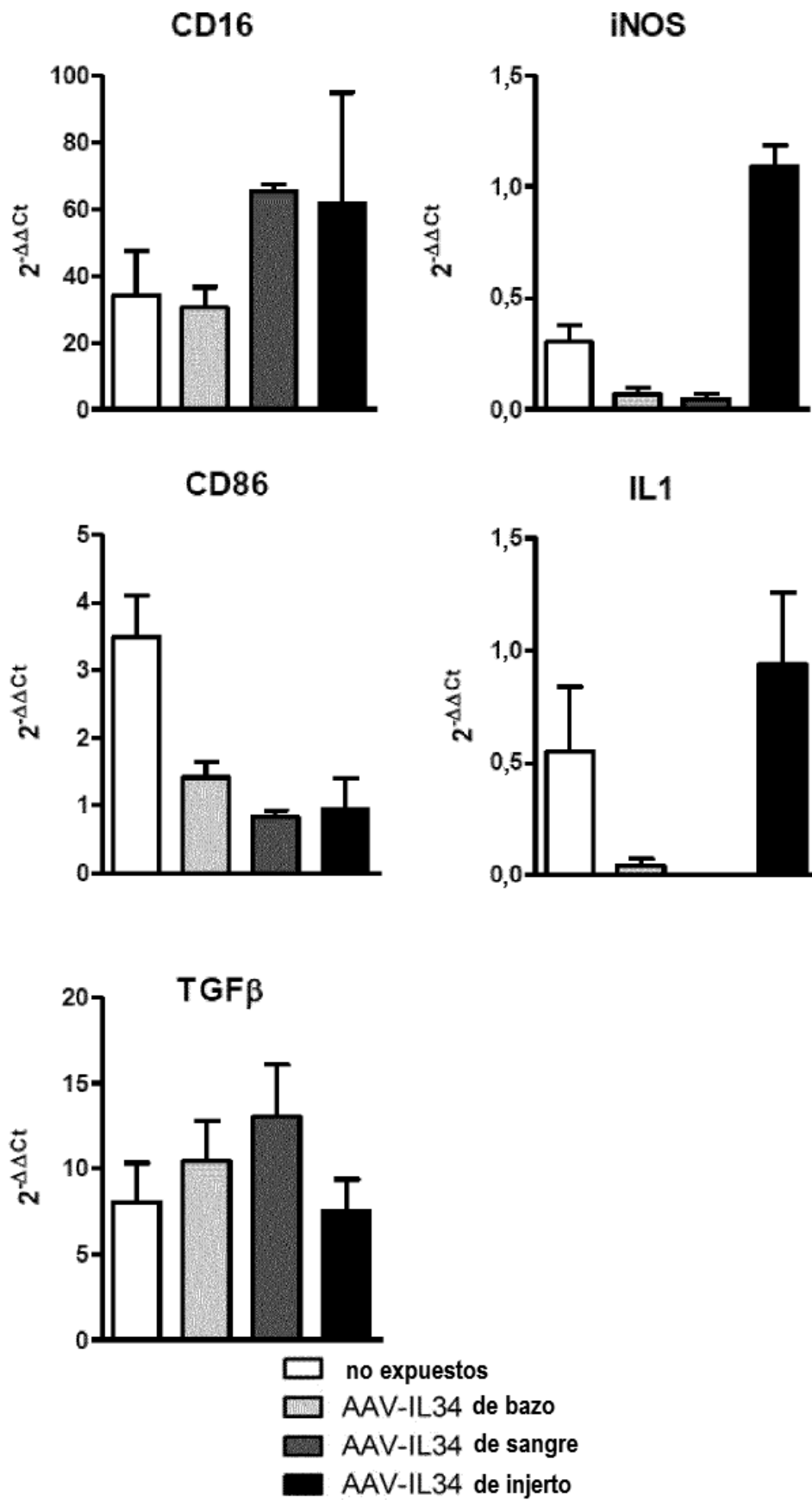


Figura 7B

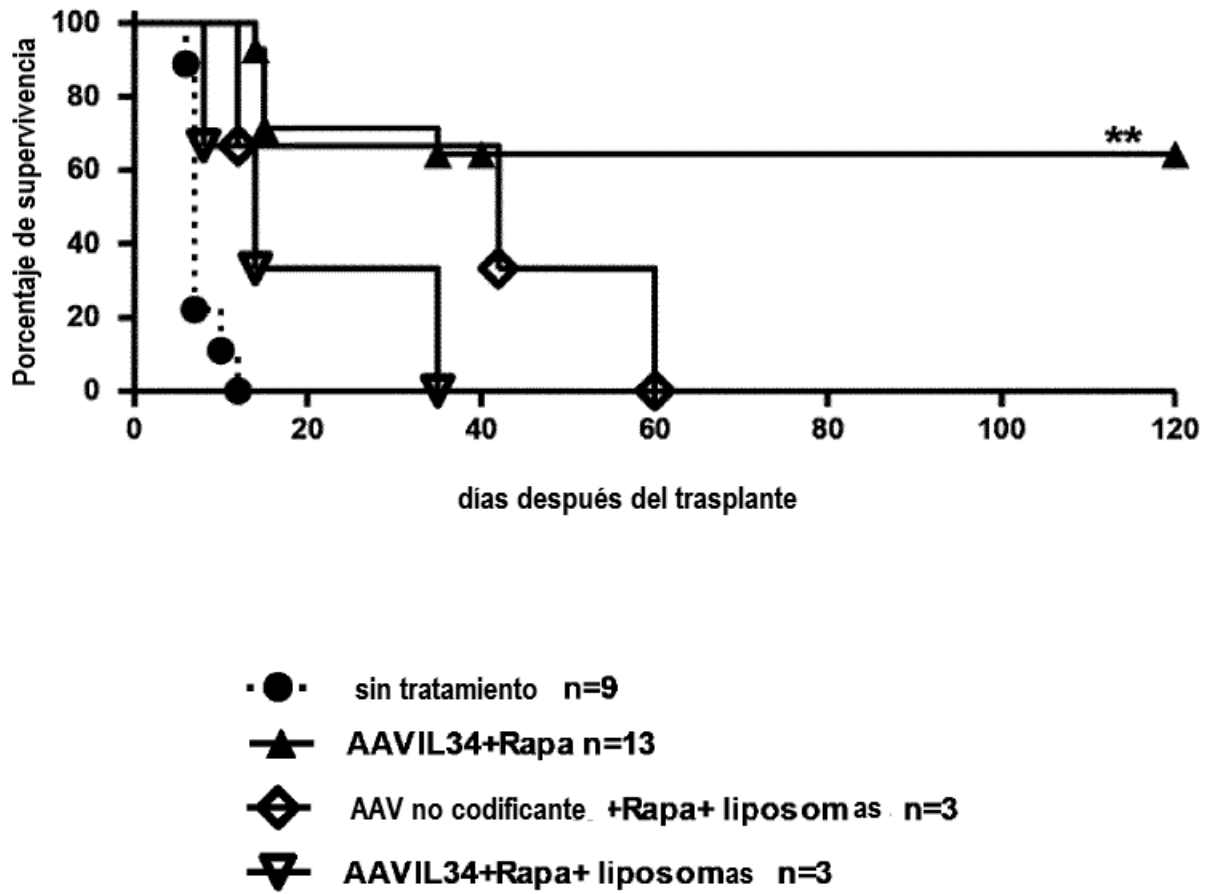
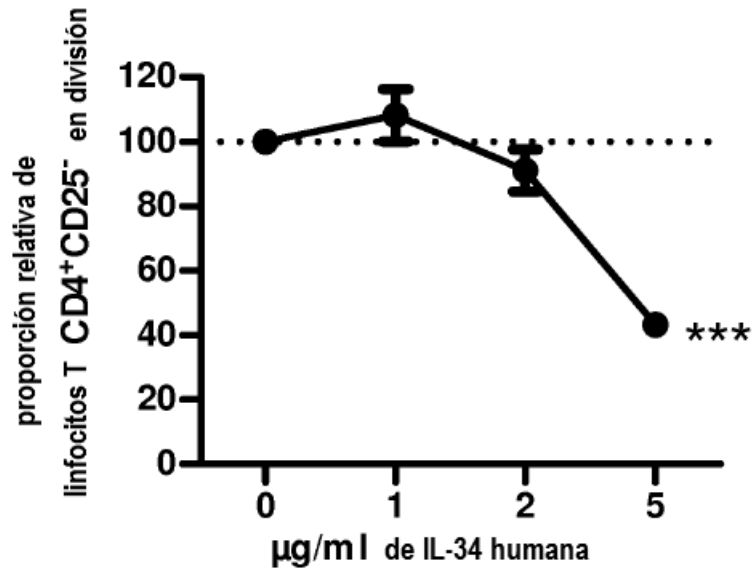


Figura 8

**A**



**B**

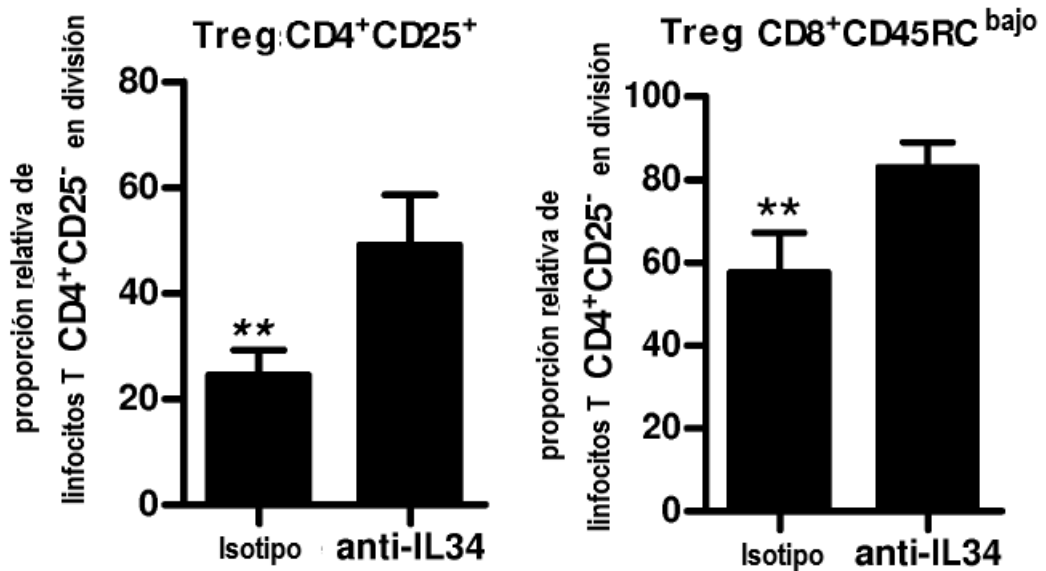


Figura 9