

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 011 707**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2020** **PCT/EP2020/050920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2020** **WO20148338**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2020** **E 20700307 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024** **EP 3911670**

54 Título: **Polipéptidos de interleucina-34 (IL-34) mutados y usos de los mismos en terapia**

30 Prioridad:

15.01.2019 EP 19305046

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2025

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.00%)
101 rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
NANTES UNIVERSITÉ (50.00%)**

72 Inventor/es:

**GUILLONNEAU, CAROLE;
ANEGON, IGNACIO;
MORTIER, ERWAN y
QUEMENER, AGNÈS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 3 011 707 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

Polipéptidos de interleucina-34 (IL-34) mutados y usos de los mismos en terapia

Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos de interleucina-34 (IL-34) mutados y a usos de los mismos en terapia.

5 Antecedentes de la invención

La interleucina-34 es una citocina con funciones comprendidas solo parcialmente, descritas por primera vez en 2008. El documento de Patente WO 2006/012451 describe una proteína denominada "factor estimulante de colonias de monocitos, granulocitos y células dendríticas" (MGD-CSF) que corresponde a la IL-34 humana de longitud completa. El documento de Patente CN106084030A proporciona un péptido de IL-34 con estabilidad térmica mejorada, con el fin de aumentar la vida útil y la vida media de este péptido. El documento de Patente EP3169350A1 describe el péptido de IL-34 humano de origen natural, así como una isoforma natural producida por corte y empalme alternativo y que carece de su residuo Q81, y dos variantes naturales denominadas rs8046424 y rs7206509.

Aunque la IL-34 comparte muy poca homología con el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1 o M-CSF), comparten un receptor común CSF-1R (CD115, c-Fms) y la IL-34 también tiene dos receptores distintos (PTP- ζ) y CD138 (sindecano-1). También se ha mostrado que la IL-34 se empareja con CSF-1 para formar un heterodímero. Hasta ahora, estudios han demostrado que esta citocina es liberada por algunos tejidos que difieren de aquellos en donde se expresa CSF-1 y está implicada en la diferenciación y supervivencia de macrófagos, monocitos y células dendríticas en respuesta a una inflamación. La implicación de IL-34 se ha mostrado en áreas tan diversas como la protección neuronal, enfermedades autoinmunitarias, infección, cáncer y trasplante (Guilonneau C. Cell Mol Life Sci. 2017). Trabajos recientes han demostrado también un nuevo y posible papel terapéutico para la IL-34 como mediador de citoquinas secretado por células T reguladoras Foxp3+ de tolerancia a trasplantes (Bézie et al., JCI, 2015).

Compendio de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones, y se refiere a polipéptidos de interleucina-34 (IL-34) mutados y a usos de los mismos en terapia.

25 Descripción detallada de la invención

Como se usa en la presente memoria, el término "IL-34" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la interleucina-34 que se caracteriza por la secuencia de aminoácidos tal y como se establece en la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1: interleucina-34 (*homo sapiens*) que incluye la secuencia líder desde la posición 1 hasta la 20

MPRGFTWLRY LGIFLGVALG NEPLEMWPLT QNEECTVTGF LRDKLQYRSR
LQYMKHYFPI NYKISVPYEG VFRIANVTRL QRAQVSEREL RYLWVLVSL
ATESVQDVLL EGHPSWKYLQ EVETLLLNVO QGLTDVEVSP KVESVLSLLN
APGPNLKLVR PKALLDNCFR VMELLYCSCC KQSSVLNWQD CEVPSPOSCS
PEPSLQYAAAT QLYPPPPWSP SSPPHSTGSGV RPVRAQGEGL LP

La numeración de los aminoácidos usados a lo largo de la presente memoria se da con referencia a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "CSF-1R" tiene su significado general en la técnica y se refiere al receptor del factor estimulante de colonias 1. El CSF-1R también se denomina en la técnica como FMS, FIM2, C-FMS, receptor de M-CSF y CD115. El receptor es un receptor transmembrana de un solo paso con un dominio extracelular (ECD) N-terminal y un dominio intracelular C-terminal con actividad de tirosina quinasa. La unión del ligando de CSF-1 o el ligando de interleucina 34 a CSF-1R conduce a la dimerización del receptor, la regulación positiva de la actividad de la proteína tirosina quinasa de CSF-1R, la fosforilación de residuos de tirosina de CSF1R, y sucesos de señalización posterior (es decir, "Actividad biológica"). Por ejemplo, tanto CSF-1 como IL-34 estimulan la supervivencia, proliferación y diferenciación de monocitos en macrófagos, así como otras líneas celulares monocíticas tales como osteoclastos, células dendríticas y microglía.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "PTP- ζ " tiene su significado general en la técnica y se refiere a la proteína tirosina fosfatasa zeta de tipo receptor. La PTP- ζ también se conoce en la técnica como "fosfacan". Este receptor es una proteína de membrana de tipo I de un solo paso con dos dominios citoplasmáticos de proteína tirosina fosfatasa, un dominio alfa anhidrasa carbónica y un dominio de fibronectina de tipo III.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "CD138" tiene su significado general en la técnica y se refiere al grupo de diferenciación 138. CD138 también se conoce en la técnica como "sindecano-1". Este receptor es un

proteoglicán de sulfato de heparano de transmembrana (tipo I). La proteína central sindecano-1 consiste en un dominio extracelular que puede ser sustituido con cadenas de glicosaminoglicano de sulfato de heparano y sulfato de condroitina, un dominio transmembrana altamente conservado, y un dominio citoplasmático altamente conservado, que contiene dos regiones constantes que están separadas por una región variable.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ligando" se refiere a una molécula tal como un polipéptido con la afinidad para unirse a un receptor. Como reconocerá un experto en la técnica, una molécula puede ser tanto un receptor como un ligando. Los ligandos de CSF-1R son bien conocidos en la técnica e incluyen IL-34 y CSF-1. Los ligandos de PTP- ζ y los ligandos de CD138 son bien conocidos en la técnica e incluyen IL-34.

10 El término "afinidad", tal y como se usa en la presente memoria, significa la fuerza de la unión de un ligando a su receptor. La afinidad de un ligando viene dada por la constante de disociación K_d . Los métodos preferidos para determinar la afinidad de los ligandos se pueden encontrar en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Müller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983). Un método preferido y estándar bien conocido en la técnica para determinar la afinidad de ligandos es el uso de instrumentos Biacore.

15 El término "unión", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una asociación directa entre dos moléculas, debido a, por ejemplo, interacciones covalentes, electrostáticas, hidrófobas e iónicas y/o de enlaces de hidrógeno, incluyendo interacciones tales como puentes salinos y puentes de agua. En particular, tal y como se usa en la presente memoria, el término "unión" en el contexto de la unión de un ligando a su receptor con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-7} M o menos, tal como de aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como de aproximadamente 10^{-9} M o menos, de aproximadamente 10^{-10} M o menos, o de aproximadamente 10^{-11} M o incluso menos.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "agonista" se refiere a un polipéptido de IL-34 mutante que imita una actividad biológica de un ligando de CSF-1R, de un ligando de PTP- ζ y/o de un ligando de CD138, o tiene una actividad biológica igual o similar a la de un ligando de CSF-1R, un ligando de PTP- ζ y/o un ligando de CD138.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "antagonista" se refiere a un polipéptido de IL-34 mutante que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un ligando de CSF-1R, de un ligando de PTP- ζ y/o de un ligando de CD138.

30 Los ligandos de CSF-1R incluyen CSF-1 e IL-34. En particular, el ligando de CSF-1R según la invención es un polipéptido de CSF-1 o, preferiblemente, un polipéptido de IL-34 natural o de tipo nativo tal y como se describe en la presente memoria.

Los ligandos de PTP- ζ incluyen factores de crecimiento de unión a heparina, pleiotrofina (PTN)/HB-GAM y midkina (MK), factor de crecimiento de fibroblastos 2, proteínas de la matriz extracelular tales como tenascina C y tenascina R, y moléculas de adhesión celular tales como Nr-CAM, L1/Ng-CAM, F3/contactina, NCAM y TAG1/axonina-1.

35 Los ligandos de CD138 incluyen proteínas de matriz, proteasas, receptores de adhesión, citocinas y factores de crecimiento, proteínas del complemento y de la coagulación.

Preferiblemente, el ligando de CSF-1R, el ligando de PTP- ζ o el ligando de CD138 según la invención es un polipéptido de IL-34 natural o de tipo nativo tal y como se describe en la presente memoria.

40 Preferiblemente, el agonista de la invención es un polipéptido de IL-34 mutante que imita una actividad biológica de un ligando de CSF-1R, o tiene una actividad biológica igual o similar a la de un ligando de CSF-1R.

45 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado mediante, por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, pegilación o cualquier otra manipulación, tal y como conjugación con un componente de marcaje. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido" incluye aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo glicina y tanto los isómeros ópticos D como L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

50 El término "dímero", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere ampliamente a una molécula que comprende dos o más subunidades, en donde las subunidades están formadas por el polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención. Los dímeros de la presente invención funcionan normalmente como agonistas.

55 El término "polipéptido de fusión" o "proteína de fusión" significa una proteína creada mediante la unión de dos o más secuencias polipeptídicas entre sí. Los polipéptidos de fusión abarcados en esta invención incluyen productos de traducción de un constructo génico quimérico que une las secuencias de ácido nucleico que codifican un primer polipéptido con la secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido. En otras palabras, un "polipéptido

de fusión" o "proteína de fusión" es una proteína recombinante de dos o más proteínas que están unidas mediante un enlace peptídico o a través de varios péptidos. La proteína de fusión también puede comprender un enlazador peptídico entre los dos dominios.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "enlazador" se refiere a una secuencia de al menos un aminoácido que une el primer polipéptido al segundo polipéptido en una proteína de fusión.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "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 la cadena pesada de IgG humana se define normalmente para extenderse desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la misma.

15 Tal y 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 los dominios constantes de una inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada (es decir, es "heteróloga") y una secuencia de dominio constante de la inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la 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.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, una "molécula de ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a una molécula de DNA (por ejemplo, pero sin limitarse a, un cDNA o DNA genómico). La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria.

El término "aislado" cuando se refiere a moléculas de ácido nucleico o polipéptidos significa que la molécula de ácido nucleico o el polipéptido está sustancialmente libre de al menos otro componente con el que está asociado o se encuentran juntos en la naturaleza.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, "expresión" se refiere al proceso por el cual un polinucleótido se transcribe a partir de una plantilla de DNA (tal como en un mRNA o un transcrito de RNA) y/o el proceso por el cual un mRNA transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y polipéptidos codificados pueden denominarse colectivamente como "producto génico". Si el polinucleótido se deriva de DNA genómico, la expresión puede incluir corte y empalme del mRNA en una célula eucariota.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tipo nativo" o "natural" es un término de la técnica entendido por personas expertas y significa la forma típica de un organismo, cepa, gen o característica, tal y como se producen en la naturaleza a diferencia de las formas mutantes.

35 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "mutación" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una sustitución, delección o inserción. En particular, el término "sustitución" significa que un residuo de aminoácido específico en una posición específica se elimina y se inserta otro residuo de aminoácido en la misma posición. El término "delección" significa que se elimina un residuo de aminoácido específico en una posición específica.

40 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "variante" se refiere a una primera composición (por ejemplo, una primera molécula), que está relacionada con una segunda composición (por ejemplo, una segunda molécula, también denominada molécula "parental"). La molécula variante puede derivarse de, aislarse de, basarse en u ser homóloga a la molécula parental. Una molécula variante puede tener una identidad de secuencia completa con la molécula parental original, o alternativamente, puede tener menos del 100% de identidad de secuencia con la molécula parental. Por ejemplo, una variante de una secuencia puede ser una segunda secuencia que es al menos 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100% idéntica en secuencia en comparación con la secuencia original. La identidad de secuencia se mide frecuentemente en términos de porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en: Smith and Waterman, Adv. Math., 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene, 73:237-244, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS, 5:151-153, 1989; Corpet et al. Nuc. Acids Res., 16:10881-10890, 1988; Huang et al., Comp. Appls Biosci., 8:155-165, 1992; y Pearson et al., Meth. Mol. Biol., 24: 307-31, 1994). Altschul et al., Nat. Genet., 6: 119-129, 1994, presentan una consideración detallada de los métodos de alineación de secuencias y de los cálculos de homología. A modo de ejemplo, las herramientas de alineación ALIGN (Myers and Miller, CABIOS 4:11-17, 1989) o LFASTA (Pearson and Lipman, 1988) se pueden usar para realizar comparaciones de secuencias (Internet Program® 1996, W. R. Pearson and the University of Virginia, fasta20u63 versión 2.0u63, fecha de edición diciembre de 1996). ALIGN compara secuencias completas entre sí, mientras que LFASTA compara regiones de similitud local. Estas herramientas de alineación y sus respectivos tutoriales están disponibles en Internet en el sitio web de NCSA, por ejemplo. Alternativamente, para comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 30

aminoácidos, la función de secuencias Blast 2 puede emplearse usando la matriz BLOSUM62 por defecto ajustada a parámetros por defecto, (costo de existencia de hueco de 11, y un costo de hueco por residuo de 1). Cuando se alinean péptidos cortos (menos de aproximadamente 30 aminoácidos), la alineación debe realizarse usando la función de secuencias Blast 2, empleando la matriz PAM30 ajustada a parámetros por defecto (hueco abierto 9, penalizaciones por extensión del hueco 1). El sistema de comparación de secuencias BLAST está disponible, por ejemplo, en el sitio web de NCBI; véase también Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990; Gish. & States, *Nature Genet.*, 3: 266-272, 1993; Madden et al. *Meth. Enzymol.*, 266:131-141, 1996; Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997; y Zhang & Madden, *Genome Res.*, 7: 649-656, 1997.

Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual una secuencia de DNA o RNA (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula huésped, para transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de DNA o RNA "extraño" (es decir, extrínseco o extracelular) a una célula huésped, de modo que la célula huésped expresará el gen o secuencia introducido para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducido. Una célula huésped que recibe y expresa el DNA o RNA introducido se ha "transformado".

Tal y como se usa en la presente memoria, "Treg" o "células T reguladoras" se refiere a células funcionalmente comprometidas, es decir, capaces de actividad supresora (es decir, inhibiendo la proliferación de células T convencionales), o bien por contacto célula-célula o por supresión de MLR (reacción de linfocitos mixtos). Las Treg se caracterizan por la expresión de FoxP3 e incluyen células T CD8⁺ y células T CD4⁺. Tal y como se usa, el término "Foxp3" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un regulador transcripcional que es crucial para el desarrollo y la función inhibidora de las Treg. Foxp3 desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunitario permitiendo la adquisición de la función supresora completa y la estabilidad del linaje de las Treg, y al modular directamente la expansión y la función de las células T convencionales. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "células T CD4⁺" tienen su significado general en la técnica y se refiere a un subconjunto de células T que expresan CD4 en su superficie. Las células T CD4⁺ son células T auxiliares, que organizan la activación de macrófagos y células T CD8⁺ (células Th-1), la producción de anticuerpos por las células B (células Th-2) o que se ha pensado que desempeñan un papel esencial en las enfermedades autoinmunes (células Th-17). Tal y como se usa en la presente memoria, el término "células T CD8⁺" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un subconjunto de células T que expresan CD8 en su superficie. Son MHC de clase I-restringido, y funcionan como células T citotóxicas. Las "células T CD8⁺" también se denominan linfocitos T citotóxicos (CTL), células asesinas T, células T citolíticas o células T asesinas. Los antígenos CD8 son miembros de la familia de supergenes de inmunoglobulinas y son elementos de reconocimiento asociativos en interacciones restringidas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad. En particular, las células T reguladoras son típicamente "células T reguladoras forkhead box P3 (Foxp3⁺)" y "células CD45RC^{low}". Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "células T reguladoras forkhead box P3 (Foxp3⁺)" o "células Treg Foxp3⁺" se refieren al 2-10 % de las células T CD4⁺ y CD8⁺ en humanos y roedores (ratas o ratones) cuyo marcador característico es el factor de transcripción Foxp3.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "medio" se refiere a un medio para mantener una población celular, o cultivar una población celular (por ejemplo, "medio de cultivo") que contiene nutrientes que mantienen la viabilidad celular y apoyan la proliferación. El medio puede contener uno cualquiera de los siguientes en una combinación apropiada: sal(s), tampón(es), aminoácidos, glucosa u otro azúcar(es), antibióticos, suero o sustituto de suero, y otros componentes tales como factores de crecimiento, citocinas, etc. Los medios usados habitualmente para tipos de células particulares son conocidos por los expertos en la técnica. El medio puede basarse en un medio disponible comercialmente tal como RPMI 1640 de Invitrogen.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "expandir" se refiere al proceso de convertir y/o amplificar una población dada de células (por ejemplo, células inmunitarias tales como células T). La expansión de células T se realiza preferiblemente cultivando una población de células que comprende células T en presencia de un agente estimulante específico de antígeno tal como, por ejemplo, antígenos, células, anticuerpos, lectinas, etc. La expansión también puede requerir el cultivo de células T en presencia de una citocina.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "respuesta inmunitaria" incluye respuestas inmunitarias mediadas por células T y/o mediadas por células B. Las respuestas inmunitarias ejemplares incluyen respuestas de células T, por ejemplo, la producción de citocinas y la citotoxicidad celular, además, el término respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias que se ven afectadas indirectamente por la activación de células T, por ejemplo, producción de anticuerpos (respuestas humorales) y activación de células sensibles a citocinas, por ejemplo, macrófagos. Las células inmunitarias implicadas en la respuesta inmunitaria incluyen linfocitos, tales como células B y células T (células CD4⁺, CD8⁺, células Th1 y Th2); células presentadoras de antígeno (por ejemplo, las células presentadoras de antígeno profesionales tales como las células dendríticas); las células asesinas naturales; las células mieloides, tales como macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos. Por ejemplo, las respuestas inmunitarias están implicadas en el rechazo de trasplantes, así como en el resultado fisiológico concomitante de dichas respuestas inmunitarias, tales como, por ejemplo, fibrosis intersticial, arteriosclerosis crónica de injertos o vasculitis. Las respuestas inmunitarias también están implicadas en enfermedades autoinmunitarias y el resultado fisiológico concomitante de dichas respuestas inmunitarias, incluyendo infiltración dependiente de células T y lesión tisular.

directa, reclutamiento y activación de macrófagos dependientes de células T y otras células efectoras, y respuestas de células B dependientes de células T que conducen a la producción de autoanticuerpos.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tolerancia inmunitaria" se refiere a un estado de falta de respuesta del sistema inmunitario a sustancias o tejidos que tienen la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria. Tal y como se usa en la presente memoria, el término tolerancia inmunitaria "específica" se produce cuando la tolerancia inmunitaria se invoca preferiblemente contra ciertos antígenos en comparación con otros.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "desencadenar" se refiere a realizar o aumentar una respuesta inmunitaria contra sustancias dañinas (por ejemplo, moléculas en la superficie de células cancerosas, virus, hongos o bacterias). En el contexto de la invención, el desencadenamiento se refiere a la inducción de la expansión de células T CD4⁺CD25⁻ en el microentorno del tumor, por ejemplo.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "disminuir la tolerancia inmunitaria" se refiere a reducir el estado de falta de respuesta del sistema inmunitario a sustancias o tejidos que tienen la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria.

15 El término "trasplante" y variaciones del mismo se refiere a la inserción de un trasplante (también denominado injerto) en un receptor, ya sea que el trasplante sea singénico (donde el donante y el receptor son genéticamente idénticos), alogénico (donde el donante y el receptor son de diferentes orígenes genéticos pero de la misma especie), o xenogénico (donde el donante y el receptor son de diferentes especies). Por lo tanto, en un escenario típico, el huésped es humano y el injerto es un isoinjerto, derivado de un ser humano de los mismos o diferentes orígenes genéticos. En otro escenario, el injerto se deriva de una especie diferente de la que se trasplanta, incluyendo animales de especies separadas filogenéticamente de manera amplia, por ejemplo, un corazón de mandril que se trasplanta en un huésped humano.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "órgano" se refiere a un órgano vascularizado sólido que realiza una función específica o grupo de funciones dentro de un organismo. El término órgano incluye, pero no se limita a, corazón, pulmón, riñón, hígado, páncreas, piel, útero, hueso, cartílago, intestino delgado o grueso, vejiga, cerebro, mama, vasos sanguíneos, esófago, trompa de Falopio, vesícula biliar, ovarios, páncreas, próstata, placenta, médula espinal, extremidad incluyendo superior e inferior, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, uréter, uretra, útero.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tejido" se refiere a cualquier tipo de tejido en seres humanos o animales, e incluye, pero no se limita a, 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, duramadre, pericardia, tejido muscular, tejido glandular, tejido facial, tejido oftálmico.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "células" se refiere a una composición enriquecida por células de interés, preferiblemente una composición que comprende al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, incluso más preferiblemente al menos el 65% de dichas células.

35 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "rechazo de trasplante" abarca tanto rechazo de trasplante agudo como crónico. El "rechazo agudo" es el rechazo por el sistema inmunitario de un receptor de trasplante de tejido cuando el tejido trasplantado es inmunológicamente extraño. El rechazo agudo se caracteriza por la infiltración del tejido de trasplante mediante células inmunitarias del receptor, que llevan a cabo su función efectora y destruyen el tejido de trasplante. La aparición del rechazo agudo es rápida y generalmente se produce en seres humanos en unas pocas semanas después de la cirugía de trasplante. El "rechazo crónico de trasplante" generalmente se produce en seres humanos en varios meses a años después del injerto, incluso en presencia de inmunosupresión exitosa de rechazo agudo. La fibrosis es un factor común en el rechazo crónico de todos los tipos de trasplantes de órganos.

40 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "prevenir o reducir el rechazo de trasplante" pretende abarcar la prevención o inhibición del rechazo de trasplante inmunitario, así como retrasar la aparición o la progresión del rechazo de trasplante inmunitario. El término también pretende abarcar prolongar la supervivencia de un trasplante en un paciente, o revertir el fallo de un trasplante en un paciente. Además, el término pretende abarcar la mejora de un síntoma de un rechazo de trasplante inmunitario, incluyendo, por ejemplo, la mejora de una complicación inmunológica asociada con el rechazo inmunitario, tal como, por ejemplo, fibrosis intersticial, aterosclerosis crónica del injerto, o vasculitis.

45 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "enfermedad inflamatoria autoinmunitaria" se refiere a una enfermedad en la que el sistema inmunitario produce una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta de células B o células T) contra un antígeno que es parte del huésped normal (que es un autoantígeno), con la consiguiente lesión a los tejidos. En una enfermedad autoinmunitaria, el sistema inmunitario del huésped no reconoce un antígeno particular como "propio" y se monta una reacción inmunitaria contra los tejidos del huésped que expresan el antígeno.

50 Tal y como se usa en la presente memoria, "trastorno alérgico" se refiere a cualquier trastorno resultante de la activación antigénica de mastocitos que da como resultado una "reacción alérgica" o estado de hipersensibilidad y afluencia de células inflamatorias e inmunitarias.

55 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "asma" se refiere a una enfermedad inflamatoria de las vías

respiratorias que se caracteriza por obstrucción de las vías respiratorias, sibilancias y dificultad respiratoria.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "respuesta inmunitaria no deseada contra una proteína terapéutica" se refiere a cualquier reacción inmunitaria no deseada dirigida a proteínas expresadas en el curso de la terapia génica, y/o proteínas terapéuticas, tales como factor VIII (hemofilia A) y otros factores de coagulación, terapias de sustitución de enzima, anticuerpos monoclonales (por ejemplo, natalizumab, rituximab, infliximab), anticuerpos policlonales, enzimas o citocinas (por ejemplo, IFN β).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "fármaco inmunosupresor" se refiere a cualquier sustancia capaz de producir un efecto inmunosupresor, por ejemplo, la prevención o disminución de la respuesta inmunitaria.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" tiene su significado general en la técnica e incluye, pero no se limita a, tumores sólidos y tumores transmitidos por la sangre. El término cáncer incluye enfermedades de la piel, tejidos, órganos, hueso, cartilago, sangre y vasos. El término "cáncer" abarca además tanto cánceres primarios como metastásicos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "quimioterapia" se refiere al tratamiento con un agente quimioterapéutico.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "inmunoterapia" tiene su significado general en la técnica y se refiere al tratamiento que consiste en administrar un agente inmunogénico, es decir, un agente capaz de inducir, potenciar, suprimir o modificar de otro modo una respuesta inmunitaria.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "inhibidor del punto de control inmunitario" tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier compuesto que inhiba la función de una proteína del punto de control inhibidora inmunitaria. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "proteína de punto de control inmunitario" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una molécula que se expresa mediante células T en que o bien aumenta una señal (moléculas de punto de control estimuladoras) o reduce una señal (moléculas de punto de control inhibidoras). Se reconoce en la técnica que las moléculas de puntos de control inmunitario constituyen vías de puntos de control inmunitario similares a las vías dependientes de CTLA-4 y PD-1 (véase por ejemplo, Pardoll, 2012. Nature Rev Cancer 12: 252-264; Mellman et al., 2011. Nature 480:480-489). Los ejemplos de moléculas de punto de control inhibidoras incluyen A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, CD277, IDO, KIR, PD-1, LAG-3, TIM-3 y VISTA. La inhibición incluye la reducción de la función y el bloqueo completo.

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

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del polipéptido de IL-34 mutado para tratar y/o prevenir la enfermedad a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico que atiende dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la enfermedad que se está tratando y la gravedad de la enfermedad; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien

conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es bien conocido dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles más bajos a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar de manera gradual la dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variarse en un amplio intervalo de 0,01 a 1000 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 principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Un medicamento contiene típicamente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra normalmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, de aproximadamente 0,001 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

El término "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción negativa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un relleno, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar de cualquier tipo sólida, semisólida o líquida no tóxica.

Los inventores han producido nuevos mutantes del polipéptido de IL34 humano.

La invención se refiere a un polipéptido de IL-34 mutado que comprende, o que consiste en, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

a) la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, en donde el residuo de serina en la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F),

b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos definida en a), en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), siempre que dicho polipéptido tenga una actividad agonista superior en comparación con la IL-34 de tipo nativo que tiene la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, y

c) un fragmento de una secuencia definida en a) o b), en donde dicho fragmento comprende de 200 a 222 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia definida en a) o b) y en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), siempre que dicho polipéptido tenga una actividad agonista superior en comparación con la IL-34 de tipo nativo que tiene la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1;

en donde la actividad agonista es al menos una, preferiblemente al menos dos, de:

- una afinidad de unión hacia CSF-1R, PTP- ζ y/o CD138,
- una capacidad para inducir o potenciar la supervivencia y la proliferación de monocitos, preferiblemente de monocitos CD14⁺,
- una capacidad para inducir o potenciar la diferenciación de monocitos, preferiblemente de monocitos CD14⁺, en macrófagos, y
- una capacidad para inducir o potenciar la fosforilación de cinasas, preferiblemente de la proteína cinasa B (Akt) y/o cinasas reguladas por la señal extracelular 1/2 (ERK1/2).

En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-34 mutado (P1) es un polipéptido de IL-34 mutado (P1) que tiene la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 al residuo de prolina (P) en la posición 242 en la SEQ ID NO: 1, en donde el residuo de histidina (H) en la posición 56 y el residuo de glicina (G) en la posición 112 están ambos sustituidos por un residuo de cisteína (C).

Preferiblemente, el polipéptido de IL-34 (P1) mutado de la presente invención se caracteriza además por al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- el residuo de treonina (T) en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (Y) o triptófano (W) o residuo de prolina (P) o residuo de fenilalanina (F) o residuo de arginina (R) o residuo de histidina (H) o residuo de asparagina (N) o residuo de cisteína (C) o residuo de isoleucina (I) o residuo de prolina (P) o residuo de leucina (L)
- el residuo de treonina (T) en la posición 124 está sustituido por un residuo de fenilalanina (F) o un residuo de triptófano (W)

ES 3 011 707 T3

- el residuo de asparagina (N) en la posición 128 está sustituido por un residuo de tirosina (Y) o de fenilalanina (F)
- el residuo de glutamina (Q) en la posición 131 está sustituido por un residuo de arginina (R) o residuo de histidina (H) o residuo de valina (V) o residuo de fenilalanina (F) o residuo de isoleucina (I) o residuo de prolina (P)
- 5 – el residuo de serina (S) en la posición 147 está sustituido por un residuo de ácido glutámico (E) o un residuo de ácido aspártico (D)
- el residuo de asparagina (N) en la posición 150 está sustituido por un residuo de ácido glutámico (E) o un residuo de ácido aspártico (D) y
- el residuo de leucina (L) en la posición 186 está sustituido por un residuo de arginina (R) o un residuo de fenilalanina (F).
- 10 En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-34 mutado es un polipéptido de IL34 mutado (P3) que tiene la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 al residuo de prolina (P) en la posición 242 en la SEQ ID NO: 1 que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:
 - el residuo de treonina (T) en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (Y) o triptófano (W) o residuo de prolina (P) o residuo de fenilalanina (F) o residuo de arginina (R) o residuo de histidina (H) o residuo de asparagina (N) o residuo de cisteína (C) o residuo de isoleucina (I) o residuo de prolina (P) o residuo de leucina (L)
 - 15 – el residuo de serina (S) en la posición 100 está sustituido por un residuo de ácido aspártico (D) o un residuo de fenilalanina (F) o un residuo de ácido glutámico (E) o un residuo de triptófano (W)
 - el residuo de treonina (T) en la posición 124 está sustituido por un residuo de fenilalanina (F) o un residuo de triptófano (W)
 - 20 – el residuo de asparagina (N) en la posición 128 está sustituido por un residuo de tirosina (Y) o de fenilalanina (F)
 - el residuo de glutamina (Q) en la posición 131 está sustituido por un residuo de arginina (R) o residuo de histidina (H) o residuo de valina (V) o residuo de fenilalanina (F) o residuo de isoleucina (I) o residuo de prolina (P)
 - el residuo de serina (S) en la posición 147 está sustituido por un residuo de ácido glutámico (E) o un residuo de ácido aspártico (D)
 - 25 – el residuo de asparagina (N) en la posición 150 está sustituido por un residuo de ácido glutámico (E) o un residuo de ácido aspártico (D) y
 - el residuo de leucina (L) en la posición 186 está sustituido por un residuo de arginina (R) o un residuo de fenilalanina (F).
 - 30 En algunas realizaciones, el polipéptido de IL34 mutado comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), y que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:
 - el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (T36Y),
 - 35 – el residuo de glutamina en la posición 131 está sustituido por un residuo de fenilalanina (Q131F),
 - el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de triptófano (T36W),
 - el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de fenilalanina (T36F),
 - el residuo de histidina en la posición 56 y el residuo de glicina en la posición 112 están ambos sustituidos por un residuo de cisteína (H56C y G112C),
 - 40 – el residuo de serina en la posición 100 está sustituido por un residuo de ácido aspártico (S100D),
 - el residuo de glutamina en la posición 131 está sustituido por un residuo de arginina (Q131R),
 - el residuo de prolina en la posición 59 está sustituido por un residuo de lisina (P59K),
 - el residuo de treonina en la posición 124 está sustituido por un residuo de fenilalanina (T124F), y

- el residuo de asparagina en la posición 150 está sustituido por un residuo de ácido glutámico (N150E).

En algunas realizaciones, el polipéptido de IL34 mutado que comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), y que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (T36Y),
- el residuo de glutamina en la posición 131 está sustituido por un residuo de fenilalanina (Q131F),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de triptófano (T36W),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de fenilalanina (T36F), y
- el residuo de histidina en la posición 56 y el residuo de glicina en la posición 112 están ambos sustituidos por un residuo de cisteína (H56C y G112C).

Preferiblemente, dicho polipéptido de IL34 mutado es un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP- ζ y CD138. En algunas realizaciones, dicho polipéptido de IL34 mutado es para su uso como un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP- ζ y CD138.

Otro objetivo es un polipéptido de IL34 mutado que comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

a) la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, en donde el residuo de serina en la posición 100 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), y que comprende además al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (T36Y),
- el residuo de glutamina en la posición 131 está sustituido por un residuo de fenilalanina (Q131F),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de triptófano (T36W),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de fenilalanina (T36F), y
- el residuo de histidina en la posición 56 y el residuo de glicina en la posición 112 están ambos sustituidos por un residuo de cisteína (H56C y G112C),

b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia definida en a), en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), siempre que dicho polipéptido sea un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP- ζ y CD138, y

c) un fragmento de una secuencia definida en a) o b), en donde dicho fragmento comprende de 200 a 222 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia definida en a) o b) y en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), siempre que dicho polipéptido sea un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP- ζ y CD138.

Preferiblemente, dicho polipéptido de IL34 mutado es un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP- ζ y CD138. En algunas realizaciones, dicho polipéptido de IL34 mutado es para su uso como agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP- ζ y CD138.

Dicho polipéptido de IL34 mutado comprende la mutación de S100F y puede comprender además una combinación de 2, 3, 4 o 5 mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (T36Y),
- el residuo de glutamina en la posición 131 está sustituido por un residuo de fenilalanina (Q131F),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de triptófano (T36W),

- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de fenilalanina (T36F), y
- el residuo de histidina en la posición 56 y el residuo de glicina en la posición 112 están ambos sustituidos por un residuo de cisteína (H56C y G112C).

5 Otro objetivo es un polipéptido de IL34 mutado que comprende, o que consiste en, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

a) la secuencia de aminoácidos que varía del residuo del asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), y que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- 10
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (T36Y), y
 - el residuo de glutamina en la posición 131 está sustituido por un residuo de fenilalanina (Q131F),

15 b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia definida en a), en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), siempre que dicho polipéptido sea un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP-ζ y CD138, y

20 c) un fragmento de una secuencia definida en a) o b), en donde dicho fragmento comprende de 200 a 222 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia definida en a) o b) y en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), siempre que dicho polipéptido sea un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP-ζ y CD138.

Preferiblemente, dicho polipéptido de IL34 mutado es un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP-ζ y CD138. En algunas realizaciones, dicho polipéptido de IL34 mutado es para su uso como agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP-ζ y CD138.

25 Otro objetivo es un polipéptido de IL34 mutado que comprende, o que consiste en, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

a) la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, y que comprende las tres mutaciones siguientes:

- 30
- el residuo de serina en la posición 100 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F),
 - el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (T36Y), y
 - el residuo de glutamina en la posición 131 está sustituido por un residuo de fenilalanina (Q131F),

35 b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia definida en a), en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), siempre que dicho polipéptido sea un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP-ζ y CD138, y

40 c) un fragmento de una secuencia definida en a) o b), en donde dicho fragmento comprende de 200 a 222 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia definida en a) o b) y en donde el resto de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un resto de fenilalanina (S100F), siempre que dicho polipéptido sea un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP-ζ y CD138.

Preferiblemente, dicho polipéptido de IL34 mutado es un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP-ζ y CD138. En algunas realizaciones, dicho polipéptido de IL34 mutado es para su uso como un agonista de un ligando de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP-ζ y CD138.

45 En algunas realizaciones, el residuo de glutamina (Q) en la posición 81 se elimina en los polipéptidos de la invención.

Los polipéptidos de la invención tienen actividades biológicas. Algunos polipéptidos de la invención tienen una actividad agonista.

50 Por "actividad agonista" se entiende en la presente memoria una actividad que imita, es similar, idéntica o superior a la de un ligando de CSF-1R o de un ligando de PTP-ζ o de un ligando de CD138, tal como IL-34, CSF-1 o M-CSF y preferiblemente IL-34. Preferiblemente, la "actividad agonista" es una actividad que imita, es similar, idéntica o superior

a la de un ligando de CSF-1R.

Por "actividad antagonista" se entiende en la presente memoria una actividad que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un ligando de CSF-1R o de un ligando de PTP- ζ o de un ligando de CD138, tal como IL-34, CSF-1 o M-CSF y preferiblemente IL-34. Preferiblemente, la "actividad antagonista" es una actividad que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un ligando de CSF-1R.

Las actividades biológicas de un ligando de CSF-1R o de un ligando de PTP- ζ o de un ligando de CD138 incluyen, sin limitarse a, la capacidad de unión a CSF-1R, PTP- ζ o CD138, de inducir o potenciar la supervivencia celular, por ejemplo, de inducir o potenciar monocitos, en particular monocitos CD14+, supervivencia, proliferación y diferenciación en macrófagos, así como otros linajes celulares monocíticos tales como osteoclastos, células dendríticas o microglía, o de inducir o potenciar la fosforilación de ciertas cinasas incluyendo la proteína cinasa B (PKB, también conocida como Akt) o ERK1/2 (cinasas reguladas por señal extracelular 1/2).

Un polipéptido de la invención tiene una actividad biológica de un ligando de CSF-1R o de un ligando de PTP- ζ o de un ligando de CD138, tan pronto como tenga al menos una de las actividades mencionadas anteriormente.

Un polipéptido es un "agonista" o tiene una actividad agonista de un ligando de CSF-1R o de un ligando de PTP- ζ o de un ligando de CD138, tan pronto como dicho polipéptido tenga la capacidad de unirse a CSF-1R, PTP- ζ o CD138 y tenga otra actividad biológica de un ligando de CSF-1R o de un ligando de PTP- ζ o de un ligando de CD138.

En algunas realizaciones, los polipéptidos agonistas de la invención tienen la capacidad de unirse a CSF-1R o PTP- ζ , y de inducir o potenciar la supervivencia de células gliales cultivadas, células progenitoras neurales o células de glioblastoma, y/o de inducir o potenciar la fosforilación de tirosina.

En otras realizaciones, los polipéptidos agonistas de la invención tienen la capacidad de unirse a CSF-1R, y de inducir o potenciar la supervivencia de células de Langerhans y/o de inducir o potenciar la fosforilación de Akt o ERK1/2.

Preferiblemente, los polipéptidos agonistas de la invención tienen la capacidad de unirse a CSF-1R, y de inducir o potenciar la supervivencia de monocitos cultivados, en particular monocitos de CD14+, y/o de inducir o potenciar la fosforilación de Akt o ERK1/2.

Un polipéptido es un "antagonista" o tiene una actividad antagonista de un ligando de CSF-1R o de un ligando de PTP- ζ o de un ligando de CD138, tan pronto como dicho polipéptido tenga la capacidad de unirse a CSF-1R, PTP- ζ o CD138, y bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente otra actividad biológica de un ligando de CSF-1R o de un ligando de PTP- ζ o de un ligando de CD138.

Por ejemplo, un polipéptido antagonista puede competir con un ligando de CSF-1R por la unión a CSF-1R y puede inhibir posteriormente parcial o totalmente otra actividad biológica de dicho ligando de CSF-1R, tal como por ejemplo, una fosforilación de cinasa.

Por ejemplo, los polipéptidos antagonistas tienen la capacidad de unirse a CSF-1R o PTP- ζ , y de bloquear, inhibir o neutralizar parcial o totalmente la supervivencia de células gliales cultivadas, células progenitoras neurales o células de glioblastoma, y/o de bloquear, inhibir o neutralizar parcial o totalmente la fosforilación de tirosina.

Por ejemplo, los polipéptidos antagonistas tienen la capacidad de unirse a CSF-1R, y de bloquear, inhibir o neutralizar parcial o totalmente la supervivencia de las células de Langerhans y/o de bloquear, inhibir o neutralizar parcial o totalmente la fosforilación de Akt o ERK1/2.

Por ejemplo, los polipéptidos antagonistas tienen la capacidad de unirse a CSF-1R, y de bloquear, inhibir o neutralizar parcial o totalmente la supervivencia de monocitos cultivados, en particular monocitos CD14+, y/o la fosforilación de Akt o ERK1/2.

Preferiblemente, los polipéptidos de la invención tienen la capacidad de unirse a CSF-1R, y son agonistas de un ligando de CSF-1R.

La actividad de unión de un polipéptido puede evaluarse fácilmente *in vitro* o *in vivo*, por el experto en la materia, en particular mediante ensayos de resonancia de plasmón superficial (SPR), en particular realizados en un Biacore, mediante ensayos de transferencia Western, mediante ELISA, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (co-ip), mediante ensayos pull-down, mediante ensayos de reticulación, o mediante enfoques de transferencia de marcador (ensayos FRET o HTRF).

Por ejemplo, los experimentos de SPR se pueden realizar típicamente en un Biacore a 25°C. En primer lugar, el receptor CSF-1 humano recombinante se puede inmovilizar típicamente en la superficie del chip mediante acoplamiento de amina. Por lo tanto, el receptor CSF-1 recombinante puede diluirse normalmente hasta 20 $\mu\text{g/mL}$ en una solución de acetato de sodio 10 mM a pH 5,0. El CSF-1R diluido puede inmovilizarse típicamente de manera covalente a una celda de flujo de chip sensor CM5, por ejemplo, a través de un grupo amina primario. Las muteínas de IL-34 pueden analizarse típicamente en modelos de "cinética de ciclo único" (SCK) sobre el chip inmovilizado de CSF-1R. Los parámetros cinéticos de los polipéptidos de IL-34 sobre CSF-1R pueden determinarse típicamente

usando series de diluciones de proteínas en un modelo de "cinética de ciclo único" (SCK). Por ejemplo, las muteínas de IL-34 como los analitos pueden ser típicamente diluidas en tampón HBS-P con concentraciones que varían típicamente de 25 nM a 400 nM. El caudal sobre el CSF-1R inmovilizado puede ser típicamente de 30 µL/min, por ejemplo con 120 s para la unión y 600 s para la disociación. Después, la superficie del chip del sensor puede típicamente regenerarse, por ejemplo, con NaOH 10 mM durante 30 s.

En particular, la actividad de unión de un polipéptido puede evaluarse típicamente por medio del material y los métodos descritos en la presente memoria en el Ejemplo 4.

La capacidad de un polipéptido de inducir o potenciar la supervivencia de monocitos cultivados, en particular monocitos CD14+, puede evaluarse fácilmente *in vitro* o *in vivo*, por los expertos en la materia, en particular, mediante el cultivo *in vitro* de monocitos aislados en un medio de cultivo que contiene el polipéptido y evaluar la supervivencia de los monocitos, por ejemplo, mediante tinción de viabilidad y análisis fenotípico mediante citometría de flujo.

Por ejemplo, la capacidad de un polipéptido de inducir o potenciar la supervivencia de monocitos cultivados, puede evaluarse típicamente cultivando monocitos CD14+ en medio completo con una concentración final de IL-34 WT o mutantes que varía de 1,5 a 200 ng/ml, o típicamente de 100 ng/ml. Las células se pueden recolectar típicamente el día 3, y por ejemplo usarse para la tinción de viabilidad o el análisis fenotípico por citometría de flujo.

En particular, la capacidad de un polipéptido de inducir o potenciar la supervivencia de monocitos cultivados, en particular monocitos CD14+, puede evaluarse típicamente por medio del material y métodos descritos en la presente memoria en el Ejemplo 5.

La capacidad de un polipéptido de inducir o potenciar la fosforilación de Akt o ERK 1/2 puede evaluarse fácilmente *in vitro* o *in vivo*, por el experto en la materia, en particular mediante transferencia de Western, mediante fosfo-ensayo de ELISA o por citometría de flujo.

Por ejemplo, la capacidad de un polipéptido de inducir o potenciar la fosforilación de Akt o ERK1/2 puede evaluarse típicamente cultivando monocitos en medio libre de FBS con IL-34 WT o mutantes, típicamente durante 1, 3 y 5 minutos. El análisis se puede realizar típicamente mediante citometría de flujo, por ejemplo, usando un anticuerpo primario anti-fosfo-Akt o anti-fosfo-Erk1/2 y un anticuerpo secundario.

La capacidad de un polipéptido de inducir o potenciar la fosforilación de Akt o ERK 1/2 puede evaluarse típicamente por medio del material y los métodos descritos en la presente memoria en el ejemplo 6.

Se considera en la presente memoria que un polipéptido tiene una actividad biológica detectable o detectada que imita, es similar, idéntica o superior a la de un ligando de CSF-1R, o de un ligando de PTP-ζ, o de un ligando de CD138, si el nivel de dicha actividad biológica detectable o detectada del polipéptido es equivalente o, preferiblemente, el 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% o 300% mayor que el nivel de dicha actividad biológica detectable o detectada de un ligando de CSF-1R, o de un ligando de PTP-ζ, o de un ligando de CD138, tal como por ejemplo, el polipéptido IL-34 humano.

Se considera en la presente memoria que un polipéptido tiene una actividad biológica detectable o detectada que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente la de un ligando de CSF-1R, o de un ligando de PTP-ζ, o de un ligando de CD138, si el nivel de dicha actividad biológica detectable o detectada del polipéptido es preferiblemente el 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% o 300% menor que el nivel de dicha actividad biológica detectable o detectada de un ligando de CSF-1R, o de un ligando de PTP-ζ, o de un ligando de CD138, tal como por ejemplo, el polipéptido IL-34 humano.

El polipéptido de la invención puede consistir en un fragmento de una secuencia que consiste en la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), y que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (T36Y),
- el residuo de glutamina en la posición 131 está sustituido por un residuo de fenilalanina (Q131F),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de triptófano (T36W),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de fenilalanina (T36F), y
- el residuo de histidina en la posición 56 y el residuo de glicina en la posición 112 están ambos sustituidos por un residuo de cisteína (H56C y G112C).

El polipéptido de la invención también puede consistir en un fragmento de una secuencia que tiene al menos el 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID

NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), y que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (T36Y),
- 5 — el residuo de glutamina en la posición 131 está sustituido por un residuo de fenilalanina (Q131F),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de triptófano (T36W),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de fenilalanina (T36F), y
- el residuo de histidina en la posición 56 y el residuo de glicina en la posición 112 están ambos sustituidos por un residuo de cisteína (H56C y G112C).

10 Por "fragmento" de una secuencia de referencia se entiende en la presente memoria una secuencia constituida por una cadena de aminoácidos consecutivos de una secuencia de referencia y cuyo tamaño es menor que el tamaño de la secuencia de referencia. Los fragmentos pueden tener, por ejemplo, un tamaño de entre 6 y 222, 6 y 210, 6 y 200, 6 y 175, 6 y 150, 6 y 125, 6 y 100, 6 y 75, 6 y 50, 6 y 25, 6 y 15, 6 y 10 aminoácidos, o un tamaño de entre 6 y 222, 10 y 222, 25 y 222, 50 y 222, 75 y 222, 100 y 222, 125 y 222, 150 y 222, 175 y 222, 200 y 222, 210 y 222, 220 y 222 aminoácidos. Lo más preferiblemente, el polipéptido de la invención tiene un tamaño de 222 aminoácidos. En el contexto de la invención, los fragmentos pueden tener, por ejemplo, un tamaño de entre 200 y 222, 210 y 222, 220 y 222 aminoácidos. Lo más preferiblemente, el polipéptido de la invención tiene un tamaño de 222 aminoácidos.

Los polipéptidos de la invención también incluyen cualquier polipéptido que sea una "variante", "homólogo" o "derivado" de los polipéptidos anteriores y que muestren la misma actividad biológica.

20 Preferiblemente, los polipéptidos de la invención son variantes humanas del polipéptido IL-34.

Los polipéptidos de la invención incluyen, por lo tanto, polipéptidos que tienen secuencias derivadas de la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, o derivados de fragmentos de la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, definida mediante un porcentaje de identidad de secuencia con la secuencia que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1.

Los polipéptidos "variantes", "homólogos" o "derivados" se definen como que comprenden una secuencia idéntica a al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90%, incluso al menos el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la secuencia de referencia. Los polipéptidos "variantes", "homólogos" o "derivados" de la invención se definen como que comprenden una secuencia idéntica a al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la secuencia de referencia.

Estas secuencias derivadas pueden diferir de la secuencia de referencia por sustitución, delección y/o inserción de uno más aminoácidos, en posiciones tales que estas modificaciones no tienen ningún impacto significativo sobre la actividad biológica de los polipéptidos. Las sustituciones pueden corresponder en particular a sustituciones conservadoras o a sustituciones de aminoácidos naturales por aminoácidos no naturales o pseudo aminoácidos.

Por "secuencia de aminoácidos que tiene (por ejemplo) al menos el 80% de identidad con una secuencia de referencia" se entiende en la presente memoria una secuencia idéntica a la secuencia de referencia, pero esta secuencia puede comprender hasta veinte mutaciones (sustituciones, delecciones y/o inserciones) por cada parte de cien aminoácidos de la secuencia de referencia. Por lo tanto, para una secuencia de referencia de 100 aminoácidos, un fragmento de 80 aminoácidos y una secuencia de 100 aminoácidos que comprende 20 sustituciones en comparación con la secuencia de referencia son dos ejemplos de secuencias que tienen un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia.

El porcentaje de identidad se determina generalmente usando un software de análisis de secuencias (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package de Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705). Las secuencias de aminoácidos que se van a comparar se alinean para obtener el porcentaje máximo de identidad. Para este propósito, puede ser necesario añadir artificialmente huecos en la secuencia. La alineación puede realizarse manual o automáticamente. Los algoritmos de alineación automatizados de secuencias de nucleótidos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res.25:3389 y se implementan mediante softwares tales como el software Blast. Un algoritmo que puede aislarse es, por ejemplo, el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, (1970) J Mol Biol. 48:443-53). Una vez que se ha logrado la alineación óptima, se establece el porcentaje de identidad registrando todas las posiciones en donde los aminoácidos de las dos secuencias comparadas son idénticos, en comparación con el número total de posiciones.

Por lo tanto, un polipéptido de la invención puede comprender o consistir en una secuencia seleccionada de:

a) una secuencia que tiene al menos un 90%, 95% o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), y que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (T36Y),
- el residuo de glutamina en la posición 131 está sustituido por un residuo de fenilalanina (Q131F),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de triptófano (T36W),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de fenilalanina (T36F), y
- el residuo de histidina en la posición 56 y el residuo de glicina en la posición 112 están ambos sustituidos por un residuo de cisteína (H56C y G112C),

b) un fragmento de una secuencia que tiene al menos el 90%, 95% o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, en donde dicho fragmento comprende de 200 a 222 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia definida en a) o b) y en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), y que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de tirosina (T36Y),
- el residuo de glutamina en la posición 131 está sustituido por un residuo de fenilalanina (Q131F),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de triptófano (T36W),
- el residuo de treonina en la posición 36 está sustituido por un residuo de fenilalanina (T36F), y
- el residuo de histidina en la posición 56 y el residuo de glicina en la posición 112 están ambos sustituidos por un residuo de cisteína (H56C y G112C).

En una realización particular, la secuencia de los polipéptidos difiere de la secuencia de referencia únicamente por la presencia de sustituciones conservadoras. Las sustituciones conservadoras son sustituciones de aminoácidos de la misma clase, tales como sustituciones de aminoácidos con cadenas laterales no cargadas (tales como asparagina, glutamina, serina, cisteína y tirosina), de aminoácidos con cadenas laterales básicas (tales como lisina, arginina e histidina), de aminoácidos con cadenas laterales ácidas (tales como ácido aspártico y ácido glutámico), de aminoácidos con cadenas laterales apolares (tales como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano).

Según la invención, los polipéptidos pueden modificarse química o enzimáticamente para mejorar su estabilidad o biodisponibilidad. Dichas modificaciones químicas o enzimáticas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Se pueden citar las modificaciones siguientes, pero no están limitadas a las mismas:

- modificaciones del extremo C-terminal o N-terminal de los polipéptidos, tales como desaminación o acilación N-terminal (preferiblemente acetilación) o tales como amidación o esterificación C-terminal;
- modificaciones del enlace amida entre dos aminoácidos, tales como acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación en el nitrógeno o carbono alfa;
- cambios de quiralidad, tales como la sustitución de un aminoácido natural (L-enantiómero) por el correspondiente D-enantiómero; esta modificación puede ir acompañada opcionalmente por la inversión de la cadena lateral (del extremo C-terminal al extremo N-terminal);
- cambios a azapéptidos, en donde uno o más carbonos alfa se sustituyen por átomos de nitrógeno; y/o
- cambios a betapéptidos, en donde uno o más carbonos se añaden en el lado N-alfa o en el lado C-alfa de la cadena principal.

A este respecto, es posible modificar uno o más de los aminoácidos de lisina (K) de los polipéptidos, en particular por:

- amidación: esta modificación es fácil de lograr, estando sustituida la carga positiva de la lisina por grupos hidrófobos (por ejemplo, acetilo o fenilacetilo);
- aminación: mediante la formación de la amida secundaria a partir de la amina primaria $R = (CH_2)_4-NH_3^+$, por

ejemplo mediante la formación de grupos N-metilo, N-alilo o N-bencilo; y

- mediante la formación de grupos N-óxido, N-nitroso, N-dialquil fosforilo, N-sulfenilo, o N-glicósido.

También o alternativamente es posible modificar uno o más aminoácidos de treonina (T) y/o serina (S) de los polipéptidos, en particular añadiendo un grupo éster o éter en el grupo OH de la cadena lateral de treonina y/o serina. La esterificación, una operación sencilla, se puede realizar usando un ácido carboxílico, un anhídrido, mediante formación de un puente, etc., para formar acetatos o benzoatos. La eterificación, que da compuestos más estables, se puede realizar usando un alcohol, un haluro, etc. para formar un éter metílico, por ejemplo, o un O-glicósido.

También o alternativamente es posible modificar uno o más aminoácidos de glutamina (Q), por ejemplo, mediante amidación, formando aminas secundarias o terciarias, en particular con grupos de tipo metilo, etilo, tanto funcionalizados como no funcionalizados.

También o alternativamente es posible modificar uno más aminoácidos de glutamato (E) y/o aspartato (D), por ejemplo:

- mediante esterificación, para formar ésteres metílicos, sustituidos o no, ésteres etílicos, ésteres bencilícos, tioles (ésteres activados); y
- mediante amidación, en particular para formar grupos N,N-dimetilo, nitroanilidas, pirrolidinilos.

Por otra parte, es preferible no modificar los aminoácidos de prolina, que participan en la estructura secundaria de los polipéptidos, teniendo en cuenta también que los aminoácidos G, A y M en general no ofrecen posibilidades de modificación de interés claro.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden comprender una etiqueta. Una etiqueta es una secuencia que contiene epítopos que puede ser útil para la purificación de los polipéptidos. Se une mediante una variedad de técnicas tales como cromatografía de afinidad, para la localización de dicho polipéptido dentro de una muestra celular o tisular usando técnicas de inmunomarcaje, la detección de dicho polipéptido mediante inmunotransferencia, etc. Ejemplos de etiquetas comúnmente empleadas en la técnica son la GST (glutación-S-transferasa)-tag, FLAG[™]-tag, Strep[™]-tag, V5-tag, myc-tag, His-tag (que típicamente consiste en seis residuos de histidina), etc.

La presente invención también se refiere a una proteína de fusión que consiste en un polipéptido de IL-34 mutado según la invención fusionado a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido que no es IL-34 o un mutante del mismo).

En algunas realizaciones, la proteína de fusión es una inmunoadhesina, en donde el polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención se fusiona a una región Fc. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de secuencia nativa. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc variante. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc funcional. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-34 mutado se fusiona a la región Fc a través de un enlazador. Dicho enlazador puede ser útil para prevenir impedimentos estéricos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30 residuos de aminoácidos. Sin embargo, el límite superior no es crítico, pero se elige por razones de conveniencia con respecto a, por ejemplo, la producción biofarmacéutica de dichos polipéptidos. La secuencia del enlazador puede ser una secuencia de origen natural o una secuencia de origen no natural. Si se usa con fines terapéuticos, el enlazador es preferiblemente no inmunogénico en el sujeto al que se administra la inmunoadhesina. Un grupo útil de secuencias del enlazador son enlazadores derivados de la región bisagra de anticuerpos de cadena pesada tal y como se describe en los documentos de Patente WO 96/34103 y WO 94/04678. Otros ejemplos son secuencias enlazadoras de poli-alanina. Otros ejemplos preferidos de secuencias enlazadoras son enlazadores de Gly/Ser de diferente longitud incluyendo (gly4ser)₃, (gly4ser)₄, (gly4ser), (gly3ser), gly₃ y (gly3ser)₂.

En algunas realizaciones, se contempla que el polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención se modifique para mejorar su eficacia terapéutica. Dicha modificación de compuestos terapéuticos puede usarse para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo circulatorio o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes puede reducirse significativamente mediante la combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución. Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Se ha demostrado que diversos polímeros solubles en agua modifican la biodistribución, mejoran el modo de absorción celular, cambian la permeabilidad a través de barreras fisiológicas y modifican la velocidad de eliminación del cuerpo. Para conseguir un efecto de direccionamiento o de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos de fármaco como grupos terminales, como parte de la cadena principal, o como grupos colgantes en la cadena polimérica. Por ejemplo, la pegilación es un enfoque bien establecido y validado para la modificación de una gama de polipéptidos. Los beneficios incluyen entre otros: (a) vidas medias circulantes marcadamente mejoradas *in vivo* debido a la evasión de la eliminación renal como resultado de que el polímero aumenta el tamaño aparente de la molécula por encima del límite de filtración glomerular, y/o mediante la evasión de los mecanismos de eliminación celular; (b) antigenicidad e inmunogenicidad reducidas de la molécula a la que se une el PEG; (c) farmacocinéticas mejoradas; (d) resistencia proteolítica mejorada de la proteína conjugada; y (e) estabilidad térmica y mecánica mejorada del polipéptido PEGilado.

Según la invención, el polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención se produce mediante métodos de síntesis peptídica automatizados convencionales o mediante expresión recombinante. Los principios generales para diseñar y preparar proteínas son bien conocidos por los expertos en la técnica. El polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención puede sintetizarse en solución o sobre un soporte sólido según técnicas convencionales.

Diversos sintetizadores automáticos están disponibles comercialmente y pueden usarse según protocolos conocidos tal y como se describe en Stewart and Young; Tam *et al.*, 1983; Merrifield, 1986 y Barany and Merrifield, Gross and Meienhofer, 1979. El polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención también puede sintetizarse mediante tecnología en fase sólida empleando un sintetizador peptídico ejemplar tal como un Model 433A de Applied Biosystems Inc. La pureza de cualquier proteína dada; generada mediante síntesis peptídica automatizada o mediante métodos recombinantes puede determinarse usando análisis de HPLC en fase reversa. La autenticidad química de cada péptido puede establecerse mediante cualquier método bien conocido por los expertos en la técnica. Como alternativa a la síntesis peptídica automatizada, se puede emplear la tecnología de DNA recombinante en donde una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de elección se inserta en un vector de expresión, se transforma o transfecta en una célula huésped apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión como se describe en la presente memoria más adelante. Se prefieren especialmente métodos recombinantes para producir polipéptidos más largos. Se puede utilizar una variedad de sistemas vector de expresión/huésped para contener y expresar la secuencia codificante del péptido o proteína. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de DNA de bacteriófagos, plásmidos o cósmidos recombinantes; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras (Giga-Hama *et al.*, *J. Biol.*, 1999); sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión viral (*por ejemplo*, baculovirus, véase Ghosh *et al.*, 2002); sistemas celulares vegetales transfectados con vectores de expresión viral (*por ejemplo*, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformado con vectores de expresión bacterianos (*por ejemplo*, plásmido Ti o pBR322; véase *por ejemplo*, Babe *et al.*, 2000); o sistemas celulares animales. Los expertos en la técnica son conscientes de diversas técnicas para optimizar la expresión de proteínas en mamíferos, véase, *por ejemplo*, Kaufman, 2000; Colosimo *et al.*, 2000. Las células de mamífero que son útiles en las producciones de proteínas recombinantes incluyen, pero no se limitan a, células VERO, células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), células COS (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293. Los protocolos ejemplares para la expresión recombinante de los sustratos peptídicos o polipéptidos de fusión en bacterias, levaduras y otros invertebrados son conocidos por los expertos en la técnica y se describen brevemente a continuación en la presente memoria. Los sistemas huésped de mamífero para la expresión de proteínas recombinantes también son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las cepas de células huésped pueden elegirse por una capacidad particular para procesar la proteína expresada o producir ciertas modificaciones post-traducción que serán útiles para proporcionar actividad de proteína. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, fosforilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento post-traducciona que escinde una forma "prepro" de la proteína también puede ser importante para la inserción, plegamiento y/o función correctos. Diferentes células huésped tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38 y similares tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y pueden elegirse para garantizar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña introducida.

Por lo tanto, un objetivo adicional de la invención se refiere a un ácido nucleico aislado, sintético o recombinante que codifica para un polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico de la presente invención es una molécula de DNA o RNA, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.

Por lo tanto, otro objetivo de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para provocar o dirigir la expresión de dicho polipéptido tras la administración a un sujeto. Los vectores pueden comprender además uno o varios orígenes de replicación y/o marcadores seleccionables. La región promotora puede ser homóloga o heteróloga con respecto a la secuencia codificante, y proporcionar expresión ubicua, constitutiva, regulada y/o específica de tejido, en cualquier célula huésped apropiada, incluyendo para uso *in vivo*. Los ejemplos de promotores incluyen promotores bacterianos (T7, pTAC, promotor Trp, etc.), promotores virales (LTR, TK, CMV-IE, etc.), promotores de genes de mamíferos (albúmina, PGK, etc.) y similares. Los ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como *por ejemplo* pUC, pcDNA, pBR, y similares. Los ejemplos de vector viral incluyen vectores adenovirales, retrovirales, de virus herpes y de AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como transfectando células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento del virus incluyen células PA317, células PsiCRIPT, células GPenv+, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes con replicación defectuosa pueden encontrarse, *por ejemplo*, en los documentos de Patente WO 95/14785, WO 96/22378, US 5,882,877, US 6,013,516, US 4,861,719, US 5,278,056 y WO 94/19478.

Otro objetivo de la presente invención se refiere a una célula huésped que ha sido transfectada, infectada o transformada por una molécula de ácido nucleico y/o un vector según la invención.

La molécula de ácido nucleico de la invención puede usarse para producir un polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención en un sistema de expresión adecuado. Los sistemas de expresión comunes incluyen células huésped de *E. coli* y vectores plasmídicos, células huésped de insecto y vectores de Baculovirus, y células huésped y vectores de mamífero. Otros ejemplos de células huésped incluyen, sin limitación, células procariotas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamíferos (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos celulares de mamíferos primarios o establecidos (por ejemplo, se produce a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). La construcción de vectores de expresión según la invención, y la transformación de las células huésped se pueden llevar a cabo usando técnicas de biología molecular convencionales. El polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención puede obtenerse, por ejemplo, cultivando células genéticamente transformadas según la invención y recuperando el polipéptido expresado por dicha célula, del cultivo. Después, si es necesario, pueden purificarse mediante procedimientos convencionales, conocidos por sí mismos por los expertos en la materia, por ejemplo mediante precipitación fraccionada, en particular precipitación con sulfato de amonio, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc. En particular, pueden usarse métodos convencionales para preparar y purificar proteínas recombinantes para producir los polipéptidos según la invención.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para producir una célula huésped recombinante que expresa un polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en:

- i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector tal y como se ha descrito anteriormente en una célula huésped competente,
- ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula huésped recombinante obtenida y
- iii) opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan el polipéptido de la invención.

Dichas células huésped recombinantes pueden usarse para la producción de polipéptidos y proteínas de fusión de la presente invención.

La invención se refiere además a un método para producir un polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención, cuyo método comprende las etapas que consisten en:

- i) cultivar una célula huésped transformada según la invención en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido o proteína de fusión; y
- ii) recuperar el polipéptido expresado o proteína de fusión.

El polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención es particularmente adecuado para fines terapéuticos.

En particular, el polipéptido de IL-34 mutado de la invención puede usarse como un agonista, ya que dicho polipéptido es capaz de formar un dímero estabilizado.

En particular, el polipéptido de IL-34 mutado (P3) tiene una afinidad aumentada por CFS-1R. Por consiguiente, cuando las mutaciones del polipéptido (P3) se combinan con la mutación del polipéptido (P1), el polipéptido de IL-34 mutado resultante representa un "super" agonista de CFS-1R, es decir, un agonista con afinidad aumentada por CSF-1R. Algunos polipéptidos de IL-34 mutados (P3) también tienen una actividad agonista *per se*.

Por consiguiente, un objetivo adicional de la presente invención se refiere a un polipéptido de IL-34 mutado, ácido nucleico, o vector de la presente invención para su uso como un fármaco. También se describe el uso de un polipéptido de IL-34 mutado, ácido nucleico o vector de la presente invención para la fabricación de un medicamento.

En algunas realizaciones, el agonista de la presente invención es particularmente adecuado para inducir y/o mantener tolerancia inmunitaria en un paciente que lo necesita. Por consiguiente, un objetivo de la presente invención se refiere a un polipéptido de IL-34 mutado, ácido nucleico o vector de la presente invención agonista para su uso en la inducción y/o mantenimiento de la tolerancia inmunitaria en un paciente que lo necesita. También se describe el uso de un polipéptido de IL-34, ácido nucleico o vector de la presente invención agonista para la fabricación de un medicamento para inducir y/o mantener la tolerancia inmunitaria en un paciente que lo necesita.

En particular, los pacientes tratados con el agonista de la presente invención en comparación con pacientes no tratados muestran las siguientes características fisiológicas: a) un nivel disminuido de una respuesta inmunitaria (específica o no) (que se cree que está mediada al menos en parte por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ efectores específicos de antígenos); b) un retraso en el inicio o progresión de una respuesta inmunitaria (específica o no); o c) un riesgo reducido del inicio o progresión de una respuesta inmunitaria (específica o no). Por lo tanto, el agonista de la presente invención es particularmente para inducir y mantener la proliferación de células Treg.

En algunas realizaciones, el agonista de la presente invención es particularmente adecuado para prevenir o reducir el rechazo de trasplante en un paciente que lo necesita. Por consiguiente, un objetivo adicional de la presente invención

se refiere a un polipéptido de IL-34, ácido nucleico o vector de la presente invención agonista para su uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplante en un paciente que lo necesita. También se describe el uso de un polipéptido de IL-34, ácido nucleico o vector de la presente invención agonista para la fabricación de un medicamento para prevenir o reducir el rechazo de trasplante en un paciente que lo necesite.

5 En algunas realizaciones, el donante del trasplante puede ser un donante vivo un donante fallecido, a saber, un donante cadavérico. En algunas realizaciones, el trasplante es un órgano, un tejido, o células. En algunas realizaciones, el rechazo de trasplante es rechazo de alotrasplantes cardíacos. En algunas realizaciones, las células se seleccionan del grupo que consiste en células madre hematopoyéticas multipotentes derivadas de médula ósea, sangre periférica o sangre del cordón umbilical; o pluripotentes (es decir, células madre embrionarias (ES) o células madre pluripotentes inducidas (iPS)) o células diferenciadas derivadas de células madre multipotentes de diferentes linajes celulares tales como cardiomiocitos, células beta pancreáticas, hepatocitos, neuronas, etc. En algunas realizaciones, las células se usan para trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT) y, por lo tanto, comprenden células madre hematopoyéticas multipotentes, normalmente derivadas de médula ósea, sangre periférica o sangre del cordón umbilical. El HSCT puede ser curativo para pacientes con leucemia y linfomas. Sin embargo, una limitación importante del HCT alogénico es el desarrollo de enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), que se produce en una forma grave en aproximadamente el 30-50% de los seres humanos que reciben esta terapia. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el agonista de la presente invención es particularmente adecuado para prevenir o reducir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). Por consiguiente, en algunas realizaciones, el paciente que recibe el trasplante de células madre hematopoyéticas padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en leucemia mieloide aguda (AML); leucemia linfóide aguda (ALL); leucemia mieloide crónica (CML); síndrome de mielodisplasia (MSD)/síndrome mieloproliferativo; linfomas tales como linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, leucemia linfática crónica (CLL) y mieloma múltiple.

En algunas realizaciones, el agonista de la presente invención es particularmente adecuado para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en un paciente de las mismas. Por consiguiente, un objetivo adicional de la presente invención se refiere a un polipéptido de IL-34 mutado, ácido nucleico o vector de la presente invención agonista para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un paciente de la misma. También se describe el uso de un polipéptido de IL-34 mutado, ácido nucleico o vector de la presente invención agonista para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un paciente de la misma.

Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados que incluyen enfermedad de Parkinson, demencia de Parkinson, PARK2 autosómica recesiva y parkinsonismo ligado a PARK6, síndromes parkinsonianos atípicos, que incluyen parálisis supranuclear progresiva, síndrome de degeneración corticobasal, demencia de cuerpos de Lewy, atrofia sistémica múltiple, parkinsonismo de Guadeloupean y enfermedad de Lytigo-bodig; enfermedades de neuronas motoras que incluyen esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, parálisis bulbar progresiva, parálisis pseudobulbar, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, atrofia muscular espinal y síndrome post-polio; enfermedades neuro-inflamatorias; enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados incluyendo la etapa temprana de un trastorno de Alzheimer, la etapa leve de un trastorno de Alzheimer, la etapa moderada de un trastorno de Alzheimer, la etapa de leve a moderada de un trastorno de Alzheimer, la etapa avanzada de un trastorno de Alzheimer, el deterioro cognitivo leve, la demencia vascular, la demencia mixta, la enfermedad de Pick, la enfermedad de argirofilia granulosa, la atrofia cortical posterior, el síndrome de Wernicke-Korsakoff; enfermedades priónicas; enfermedades de almacenamiento lisosómico; leucodistrofias; enfermedad de Huntington; esclerosis múltiple; síndrome de Down; atrofia muscular espinal y bulbar; trastorno neurocognitivo asociado al HIV; síndrome de Tourette; ataxia espinocerebelosa autosómica dominante; ataxia de Friedreich; atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana; distrofia miotónica; esquizofrenia; deterioro de la memoria asociado a la edad; autismo y los trastornos del espectro autista; trastorno de hiperactividad con déficit de atención; dolor crónico; demencia inducida por alcohol; afasia no fluida progresiva; demencia semántica; paraplejía espástica; fibromialgia; enfermedad post-Lyme; neuropatías; síntomas de abstinencia; enfermedad de Alpers; síndrome cerebro-oculo-facio-esquelético; enfermedad de Wilson; síndrome de Cockayne; enfermedad de Leigh; neurodegeneración con acumulación de hierro cerebral; síndrome de opsoclon-mioclono; deficiencia de alfa-metilacil-CoA racemasa; síndrome de Andermann; síndrome de Arts; síndrome de Marinesco-Sjögren; neurodegeneración asociada a proteínas de la membrana mitocondrial; neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa; osteodisplasia lipomembranosa poliúística con leucoencefalopatía esclerosante; neuronopatía por deficiencia del transportador de riboflavina; y ataxia-telangiectasia.

Preferiblemente, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington.

55 En algunas realizaciones, el agonista de la presente invención es particularmente adecuado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunitarias, trastornos alérgicos de respuestas aloinmunes, así como asma, en un paciente de las mismas. Por consiguiente, un objetivo adicional de la presente invención se refiere a un polipéptido de IL-34 mutado, ácido nucleico o vector de la presente invención agonista para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunitarias, trastornos alérgicos a respuestas aloinmunes así como asma en un paciente de las mismas. También se describe el uso de un polipéptido de IL-34 mutado, ácido nucleico o vector de la presente invención agonista para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunitarias, trastornos alérgicos a respuestas aloinmunes, así como asma, en un paciente las mismas.

En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, artritis aguda, artritis reumatoide crónica, artritis gotosa, artritis gotosa aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriática, artritis vertebral, y artritis reumatoide de inicio juvenil, osteoartritis, artritis crónica progresiva, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva, y espondilitis anquilosante, enfermedades inflamatorias hiperproliferativas de la piel, psoriasis tal como psoriasis en placa, psoriasis en gotas, psoriasis pustular, y psoriasis de las uñas, dermatitis incluyendo dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis alérgica, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis herpetiforme, y dermatitis atópica, síndrome de hiper IgM ligado al cromosoma X, urticaria tal como urticaria alérgica crónica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria autoinmunitaria crónica, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, escleroderma, escleroderma sistémica, esclerosis, esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (MS), MS espino-óptica, MS progresiva primaria (PPMS), MS remitente-recurrente (RRMS), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, y esclerosis atáxica, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis, colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante, colitis transmural, enfermedad inflamatoria autoinmunitaria del intestino, pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, episcleritis, síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de dificultad respiratoria adulta o aguda (ARDS), meningitis, inflamación de todo o parte de la uvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmune, espondilitis reumatoide, pérdida repentina de audición, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxis y rinitis alérgica y atópica, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, encefalitis límbica y/o del tronco encefálico, uveitis, uveitis anterior, uveitis anterior aguda, uveitis granulomatosa, uveitis no granulomatosa, uveitis facoantigénica, uveitis posterior, uveitis autoinmune, glomerulonefritis (GN), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN membrano- o membranosa proliferativa (MPGN), GN de progresión rápida, afecciones alérgicas, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión leucocitaria, lupus eritematoso sistémico (SLE) o lupus eritematoso sistémico tales como SLE cutáneo, lupus eritematoso cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal (NLE), lupus eritematoso diseminado, lupus (incluyendo nefritis, cerebritis, pediátrico, no-renal, extra-renal, discoide, alopecia), diabetes mellitus de inicio juvenil (Tipo I), incluyendo diabetes mellitus dependiente de la insulina pediátrica (IDDM), diabetes mellitus de inicio en la edad adulta (diabetes Tipo II), diabetes autoinmune, diabetes insípida idiopática, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis, granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis, incluyendo vasculitis, vasculitis de grandes vasos, polimialgia reumática, arteritis de células gigantes (Takayasu), vasculitis de vasos medios, enfermedad de Kawasaki, poliarteritis nodosa, poliarteritis microscópica, vasculitis del CNS, necrotizante, cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis necrotizante sistémica, y vasculitis asociada a ANCA, tal como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmune incluyendo anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa (anemia perniciosa), enfermedad de Addison, anemia de células rojas puras o aplasia (PRCA), deficiencia del Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del CNS, síndrome de lesión multiorgánica tales como los secundarios a septicemia, trauma o hemorragia, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad anti-membrana basal glomerular, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet o Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoides tales como penfigoide bulloso y penfigoide de la piel, pénfigo, opcionalmente pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo penfigoide de membrana mucosa, pénfigo eritematoso, poliendocrinopatías autoinmunes, enfermedad del síndrome de Reiter, nefritis compleja inmune, nefritis mediada por anticuerpos, neuromielitis óptica, polineuropatías, neuropatía crónica, polineuropatías por IgM, neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia, púrpura trombocitopénica trombica (TTP), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), orquitis y ooforitis autoinmune, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto); tiroiditis subaguda, enfermedad del tiroides autoinmune, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndrome paraneoplástico, incluyendo síndrome paraneoplástico neurológico tal como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome del hombre rígido o persona rígida, encefalomiелitis, encefalomiелitis alérgica, encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia grave, miastenia grave asociada a timoma, degeneración cerebelar, neuromiotonía, síndrome opsoclonos u opsoclonos mioclonos (OMS), y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmune, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmune, neumonitis intersticial linfocítica, bronquiolitis obliterante (no-transplante) vs NSIP, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), nefropatía por IgA idiopática, dermatosis por IgA lineal, cirrosis biliar primaria, neumonocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmune, enfermedad celiaca, enfermedad de coeliaca, esprúe celiaco (enteropatía por gluten), esprúe refractario, esprúe idiopático, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ALS; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad autoinmune del oído tal como enfermedad autoinmune del oído interno (AGED), pérdida auditiva autoinmune, síndrome opsoclonos mioclonos (OMS), policondritis tal como policondritis refractaria o retrasada, proteinosis alveolar pulmonar, amiloidosis, escleritis, linfocitosis no cancerosa, linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de células B monoclonales, opcionalmente gammopatía monoclonal benigna o gammopatía monoclonal de significancia no determinada, MGUS, neuropatía periférica, síndrome paraneoplástico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica, y canalopatías del CNS, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis segmental focal (FSGS), optalmopatía endocrina, uveoretinitis,

corioretinitis, trastorno hepatológico autoinmune, fibromialgia, fallo endocrino múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia senil, enfermedades desmielinizantes tales como enfermedades desmielinizantes autoinmunes, nefropatía diabética, síndrome de Dressler, alopecia areata, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactil, y telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, enfermedad del tejido conectivo mixto, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome post-cardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón del aficionado a las aves, angitis granulomatosa alérgica, angitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis tal como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad del pulmón intersticial, reacción transfusional, lepra, malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergillosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis cística, endoftalmítis, eritema elevatum et diutinum, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flarías, ciclitis tal como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis, o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schönlein, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), infección por echovirus, cardiomiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección por el virus de la rubeola, enfermedades post-vacuna, infección por rubeola congénita, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, insuficiencia gonadal autoinmune, corea de Sydenham, nefritis post-estreptocócica, tromboangitis obliterante, tirotoxicosis, tabes dorsal, corioiditis, polimialgia de células gigantes, oftamopatía endocrina, neumonitis por hipersensibilidad crónica, queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico idiopático, nefropatía por cambios mínimos, lesión benigna familiar y por isquemia-reperusión, autoinmunidad retinal, inflamación de las articulaciones, bronquitis, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastorno arteriosclerótico, aspermiogénesis, hemolisis autoinmune, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmía facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida auditiva sensorial, hemoglobinuria paroxística, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmía simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, poliradiculitis aguda, pioderma gangrenoso, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, infertilidad debida a anticuerpos antiespermatozoides, timoma no maligno, vitíligo, enfermedades asociadas al virus SCID y de Epstein-Barr, síndrome de deficiencia inmune adquirido (AIDS), enfermedades parasíticas tales como Leishmania, síndrome de shock tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que implican la infiltración de células T, deficiencia de adhesión de leucocitos, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por citocinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapedesis leucocitaria, síndrome de lesión multiorgánica, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad anti-membrana basal glomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías autoinmunes, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmune, oftalmía simpática, enfermedades reumáticas, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome nefrítico, insulinitis, insuficiencia poliendocrina, neuropatía periférica, síndrome poliglandular autoinmune de Tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de inicio en la edad adulta (AOIH), alopecia total, cardiomiopatía dilatada, epidermolisis ampollosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta y no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoidal, frontal, maxilar, o esfenoidal, un trastorno relacionado con eosinófilos tales como eosinofilia, eosinofilia por infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Löffler, neumonía eosinofílica crónica, eosinofilia pulmonar trópic, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma, o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxis, espondiloartritis seronegativas, enfermedad autoinmune poliendocrina, colangitis esclerosante, esclerótica, epiesclerótica, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia telangiectasia, trastornos autoinmunes asociados con la enfermedad del colágeno, reumatismo, enfermedad neurológica, trastorno isquémico de re-perusión isquémica, reducción en la respuesta de la presión arterial, disfunción vascular, angiectasis, lesión tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia cerebral, y enfermedad que acompaña a la vascularización, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión por reperusión, lesión por reperusión del miocardio u otros tejidos, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citocinas, inflamación seria aguda, inflamación crónica intratable, pielitis, neumonocirrosis, retinopatía diabética, trastorno diabético de las arterias grandes, hiperplasia endoarterial, úlcera péptica, vulvulitis, y endometriosis.

Los trastornos alérgicos incluyen típicamente reacciones alérgicas sistémicas, anafilaxis sistémica o respuestas de hipersensibilidad, choque anafiláctico, alergias a fármacos y alergias por picaduras de insectos; enfermedades alérgicas respiratorias, tales como asma, enfermedades pulmonares de hipersensibilidad, neumonitis de hipersensibilidad y enfermedades pulmonares intersticiales (ILD) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, ILD asociada con artritis reumatoide u otras afecciones autoinmunitarias); rinitis, fiebre del heno, conjuntivitis, rinoconjuntivitis alérgica y vaginitis; trastornos cutáneos y dermatológicos, incluyendo psoriasis y dermatosis inflamatorias, tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis herpetiformes, enfermedad de IgA lineal, urticaria aguda y crónica y esclerodermia; vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrotizante, cutánea y de hipersensibilidad); espondilartropatías; y reacciones intestinales del sistema gastrointestinal (por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, ileítis, enteritis, esprúe no trópico y enfermedad celíaca).

En algunas realizaciones, el agonista de la presente invención se administra al paciente en combinación con un

fármaco inmunosupresor. Los fármacos inmunosupresores incluyen, sin limitación, fármacos de tiopurina tales como azatioprina (AZA) y metabolitos de la misma; inhibidores de trifosfato de nucleósido tales como ácido micofenólico (Cellcept) y su derivado (Myfortic); derivados del mismo; profármacos del mismo; y combinaciones de los mismos. Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, 6-mercaptopurina ("6-MP"), ciclofosfamida, micofenolato, prednisolona, sirolimus, dexametasona, rapamicina, FK506, mizoribina, azotioprina y tacrolimus.

En algunas realizaciones, el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en citostáticos tales como objetivo de los inhibidores de rapamicina (mTOR) y rapamicina (sirolimus) en mamíferos; 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, anticuerpos monoclonales anti-CD45RC, globulina anti-linfocítica (ALG) y globulina anti-timocito (ATG)); inhibidores de calcineurina (ciclosporina); glucocorticoides y micofenolato de mofetilo.

En algunas realizaciones, el fármaco inmunosupresor es un inhibidor de calcineurina. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "inhibidor de calcineurina" tiene su significado general en la técnica y se refiere a sustancias que bloquean la calcineurina (es decir, proteína fosfatasa regulada por calcio/calmodulina implicada en la señalización intracelular) desfosforilación de sustratos apropiados, dirigiendo la fosfatasa calcineurina (PP2B, PP3), una enzima celular que está implicada en la regulación génica. Un inhibidor de calcineurina de la presente invención es típicamente un compuesto de unión a inmunofilina que tiene actividad inhibidora de calcineurina. Los inhibidores de la calcineurina que se unen a inmunofilina son compuestos que forman complejos de inhibición de la calcineurina con inmunofilinas, por ejemplo, ciclofilina y macrofilina. Ejemplos de inhibidores de calcineurina que se unen a ciclofilina son ciclosporinas o derivados de ciclosporina (en lo sucesivo ciclosporinas) y ejemplos de inhibidores de calcineurina que se unen a macrofilina son ascomicina (FR 520) y derivados de ascomicina (en lo sucesivo ascomicinas).

Se conoce una amplia gama de derivados de ascomicina, que son de origen natural entre especies fúngicas o que se pueden obtener mediante manipulación de procedimientos de fermentación o mediante derivatización química. Los macrólidos de tipo ascomicina incluyen ascomicina, tacrolimus (FK506), sirolimus y pimecrolimus. La ciclosporina, originalmente extraída del hongo del suelo *Potrypiadium infiltratum*, tiene una estructura cíclica de 11 aminoácidos e incluye, por ejemplo, Ciclosporinas de A a I, tales como Ciclosporina A, B, C, D y G. Voclosporina es un inhibidor de calcineurina de última generación que es un derivado semisintético de ciclosporina A más potente y menos tóxico. En algunas realizaciones, el inhibidor de calcineurina de la presente invención es la versión trans de voclosporina, trans-ISA247 (Número Cas 368455-04-3) que se describe, por ejemplo, en, el documento de Patente US Patent Publication No.: 2006/0217309. Otras composiciones de voclosporina se describen, por ejemplo, en el documento de Patente U.S. Pat. No. 7,060,672. El tacrolimus (FK506) es otro inhibidor de calcineurina que es también un producto fúngico, pero tiene una estructura de lactona macrolida. El sirolimus (rapamicina) es un producto microbiano aislado del actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus*. El sirolimus se une a una inmunofilina (proteína de unión a FK 12, FKBP12) formando un complejo, que inhibe la ruta del objetivo de rapamicina (mTOR) en mamíferos a través de la unión directa al Complejo 1 de mTOR (mTORC1). El pimecrolimus también es un inhibidor de calcineurina. Los inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina A, voclosporina, ascomicina, tacrolimus, pimecrolimus, un análogo de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, pueden utilizarse en una composición micelar mixta de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, el fármaco inmunosupresor es un corticosteroide. Tal y como se usa, el término "corticosteroides" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una clase de principios activos que tienen un sistema de anillo de ciclopentoperhidrofenantreno hidrogenado dotado de una actividad antiinflamatoria. Los fármacos de corticosteroides incluyen típicamente cortisona, cortisol, hidrocortisona (11 β ,17-dihidroxi, 21-(fosfonooxi)-pregn-4-eno, 3,20-diona disódica), dihidroxicortisona, dexametasona (21-(acetiloxi)-9-fluoro-1 β , 17-dihidroxi-16 α -etilpregna-1,4-dien-3,20-diona), y fármacos esteroides altamente derivatizados tales como beconasa (dipropionato de beclometasona, que es 9-cloro-11- β , 17,21, trihidroxi-16 β -metilpregna-1,4 dien-3,20-diona 17,21-dipropionato). Otros ejemplos de corticosteroides incluyen flunisolida, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, deflazacort y betametasona. Corticosteroides, por ejemplo, cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, betametasona, dipropionato de beclometasona, budesonida, fosfato de sodio de dexametasona, flunisolida, propionato de fluticasona, acetónido de triamcinolona, betametasona, fluocinolona, fluocinónido, dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, desonida, desoximetasona, fluocinolona, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, propionato de clobetasol y dexametasona.

En algunas realizaciones, el fármaco inmunosupresor es una molécula de CTLA4. En algunas realizaciones, la molécula de CTLA4 es abatacept. El abatacept es una proteína de fusión soluble que consiste en el dominio extracelular de CTLA-4 humano unido a la parte Fc modificada (dominios bisagra, CH2 y CH3) de la inmunoglobulina G1 humana (IgG 1). El abatacept se produce mediante la tecnología de DNA recombinante en un sistema de expresión de células de mamífero. El peso molecular aparente del abatacept es de 92 kilodaltons. El Abatacept fue desarrollado por Bristol-Myers Squibb y se describe, por ejemplo, en los documentos de Patente U.S. Pat. 5,851,795, U.S. Pat. 7,455,835, y EP1962886. En algunas realizaciones, la molécula de CTLA es belatacept que es el resultado de alterar dos aminoácidos en la parte de unión a CD80/86 del compuesto de abatacept (L104E y A29Y). Este ligero cambio en la química dio como resultado un aumento de 10 veces en la capacidad para inhibir la activación de células T cuando se comparó *in vitro*. El belatacept (L104EA29YIg) es el primer agente biológico aprobado para la inmunosupresión por mantenimiento primario, bloqueando selectivamente la ruta de co-estimulación de CD28 para prevenir la activación de

células T (Larsen, CP. et al, Am. J. Transplant., 5: 443-453 (2005). En algunas realizaciones, la molécula de CTLA4 es MAXY-4, que también es una proteína derivada de abatacept pero que tiene una unión aumentada a dianas de CTLA4, y que está actualmente en desarrollo preclínico por Perseid Therapeutics, LLC y Astellas Pharma, Inc. para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y rechazo de trasplante.

- 5 En algunas realizaciones, el agonista de la presente invención es particularmente adecuado para prevenir respuestas inmunitarias no deseadas contra proteínas expresadas en el curso de la terapia génica o proteínas terapéuticas y alergias en un paciente de las mismas. Por ejemplo, este enfoque puede aplicarse de hecho para suprimir una respuesta inmunitaria, especialmente para prevenir reacciones inmunitarias a proteínas específicas cuando su expresión se restablece mediante terapia génica en individuos con deficiencias genéticas correspondientes. Por lo tanto, un agonista según la invención puede usarse para prevenir la reactividad inmunitaria hacia proteínas normalmente ausentes en el paciente debido a mutaciones, mientras que su reconstitución se logra mediante terapia génica. Además, la terapia proteica es un área de innovación médica que se está generalizando, e implica la aplicación de proteínas, tales como enzimas, anticuerpos o citocinas, directamente a pacientes como productos terapéuticos. Uno de los principales obstáculos en la administración de dichos medicamentos implica las respuestas inmunitarias dirigidas contra la propia proteína terapéutica. La administración de agentes terapéuticos basados en proteínas a menudo va acompañada de la administración de supresores inmunitarios, que se usan para facilitar una vida útil más larga de la proteína y, por lo tanto, una mayor absorción de la proteína en las células y tejidos del organismo. Sin embargo, los supresores inmunitarios generales pueden ser desventajosos debido a la naturaleza inespecífica de la supresión inmunitaria que se lleva a cabo, dando como resultado efectos secundarios no deseados en el paciente. Por lo tanto, este enfoque se puede aplicar para suprimir una respuesta inmunitaria contra proteínas y péptidos terapéuticos, tales como anticuerpos, citocinas, enzimas terapéuticos o cualquier otra proteína administrada a un paciente.

También es posible elegir usar la terapia génica, usando o administrando un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención en lugar del polipéptido. En este caso, se debe administrar al paciente un ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés en condiciones tales que se expresa el polipéptido *in vivo* por las células del paciente en donde se ha transferido el ácido nucleico.

Por lo tanto, la invención también se refiere a ácidos nucleicos que comprenden o consisten en una secuencia que codifica un polipéptido de la invención. Dichos ácidos nucleicos pueden obtenerse fácilmente clonando fragmentos de cDNA que codifican un polipéptido de la invención.

Dicho ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención puede estar particularmente en forma de un vector de DNA, por ejemplo un vector plasmídico. Es posible administrar uno o varios vectores, llevando cada vector eventualmente una o más secuencias que codifican al menos uno de los polipéptidos de la invención. En este vector, la o las secuencia(s) que codifican al menos uno de los polipéptidos de la invención están unidas funcionalmente a un elemento o elementos que permiten la expresión de los mismos o la regulación de la expresión de los mismos, tales como promotores, activadores y/o terminadores transcripcionales.

Según una realización preferida, se usa un vector que porta una secuencia que codifica un polipéptido de la invención.

El vector o vectores de DNA pueden insertarse *in vivo* utilizando cualquier técnica conocida por las personas expertas en la técnica. En particular, es posible insertar el vector o vectores de DNA *in vivo* en forma desnuda, es decir, sin ayuda de ningún vehículo o sistema que facilitaría la transfección del vector en las células (documento de Patente EP 465 529).

También se puede usar una pistola génica, por ejemplo, depositando DNA sobre la superficie de partículas de "oro" y disparando estas partículas de modo que el DNA pase a través de la piel de un paciente (Tang et al., (1992) Nature 356:152-4). Las inyecciones usando un gel líquido también son posibles para transfectar piel, músculo, tejido graso y tejido mamario todo al mismo tiempo (Furth et al., (1992) Anal Biochem. 205: 365-8).

Otras técnicas disponibles incluyen microinyección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, formulaciones usando nanocápsulas o liposomas.

Las nanopartículas biodegradables en cianoacrilato de polialquilo son particularmente ventajosas. Para los liposomas, el uso de lípidos catiónicos promueve la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente y facilita la fusión con las membranas celulares cargadas negativamente.

Alternativamente, el vector puede estar en forma de un virus recombinante que, insertado en su genoma, comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido(s).

El vector viral puede seleccionarse preferiblemente de un adenovirus, un retrovirus, en particular un lentivirus, y un virus adenoasociado (AAV), un virus del herpes, un citomegalovirus (CMV), un virus de vacuna, etc. Los vectores de lentivirus son descritos, por ejemplo, por Firat et al., (2002) J Gene Med 4:38-45.

De manera ventajosa, el virus recombinante es un virus defectuoso. El término "virus defectuoso" indica un virus incapaz de replicarse en una célula objetivo. En general, el genoma del virus defectuosos está desprovisto de al menos las secuencias necesarias para la replicación de dicho virus en la célula infectada. Estas regiones pueden eliminarse o hacerse no funcionales o pueden sustituirse por otras secuencias y en particular por el ácido nucleico que codifica

el polipéptido de interés. No obstante, preferiblemente el virus defectuoso mantiene las secuencias de su genoma que son necesarias para encapsular las partículas virales.

La administración dirigida de genes se describe, por ejemplo, en la solicitud de Patente WO 95/28 494.

5 Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a un método *in vitro/ex vivo* de obtención de una población de macrófagos inmunosupresores que comprende cultivar una población de monocitos con un medio que comprende una cantidad de un agonista de la presente invención.

10 La población de monocitos que sirve como material de partida puede aislarse según cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, la población de monocitos humanos puede obtenerse a partir de diversas muestras biológicas que contienen PBMC. Típicamente, se aíslan de sangre periférica. Pueden aislarse mediante selección positiva con perlas marcadas con diferentes ligandos (por ejemplo, CD14). Dichas células marcadas pueden separarse después mediante diversas técnicas tales como clasificación celular como se describe a continuación.

15 En algunas realizaciones, la población de monocitos humanos es por lo tanto una población de monocitos humanos CD14⁺. En algunas realizaciones, la población de monocitos humanos es una población de monocitos humanos CD14⁺ CD16⁺. En algunas realizaciones, la población de monocitos humanos es una población de monocitos humanos CD14⁺CD16⁻.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a un método *in vitro/ex vivo* de obtención de una población de células Treg humanas que comprende las etapas de

20 (a) cultivar una población de monocitos con un medio que comprende una cantidad de un agonista de la presente invención con el fin de obtener una población de macrófagos inmunosupresores (también denominados "macrófagos IL34-diferenciados"); y

(b) co-cultivar una población de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) y la población de macrófagos inmunosupresores obtenida en la etapa (a).

25 En algunas realizaciones, el método de la presente invención comprende una etapa de aislar una población de células Treg humanas de la población de PBMC antes de la etapa (b). Por lo tanto, según esta realización, la etapa (b) comprende co-cultivar una población de células Treg humanas aisladas de la población de PBMC y la población de macrófagos inmunosupresores obtenida en la etapa (a).

En algunas realizaciones, el método de la presente invención comprende una etapa de aislar una población de células Treg humanas después del co-cultivo de la etapa (b).

30 Típicamente, el agonista se añade al medio a una concentración que varía de 1 a 500 ng/ml, preferiblemente de 10 a 100 ng/ml, más preferiblemente a 50 ng/ml.

Típicamente, el agonista se añade al medio a una concentración que varía de 1 a 500 ng/ml, preferiblemente de 10 a 100 ng/ml, más preferiblemente a 20 ng/ml.

35 La etapa (a) de cultivar la población de monocitos humanos en un medio que comprende una cantidad de un agonista de la presente invención se llevará a cabo durante el tiempo necesario requerido para la obtención de una población de macrófagos inmunosupresores (o macrófagos IL34-diferenciados). Típicamente, el cultivo de monocitos con un medio de interés se llevará a cabo durante entre al menos 3 o 4 días y no más de 8 días, preferiblemente 6 días. En algunas realizaciones, el cultivo de monocitos con un medio de interés se lleva a cabo durante 3, 4, 5, 6, 7 u 8 días o más.

40 En la etapa (b), la población de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) puede aislarse mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica (por ejemplo, mediante centrifugación por densidad tal como centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Paque™).

45 Típicamente, el aislamiento de la población de células Treg humanas puede llevarse a cabo mediante una variedad de métodos para detectar una población de células inmunitarias particular disponible para un experto en la materia, incluyendo técnicas de inmunoselección, tales como clasificación celular de alto rendimiento usando métodos de citometría de flujo, métodos de afinidad con anticuerpos marcados para perlas magnéticas, perlas biodegradables, perlas no biodegradables, uso de anticuerpos biespecíficos específicos para IL34 y una proteína CD (tal como, por ejemplo, CD4, CD8, CD25, CD127 o CD45RC, PD1, GITR), uso de anticuerpos biespecíficos específicos para IL34, IFN γ , TGF β e IL10, uso de anticuerpos trispecíficos y combinación de dichos métodos.

En algunas realizaciones, el método de la presente invención comprende además una etapa de expansión de la población de Tregs obtenida.

50 En algunas realizaciones, el medio adecuado para expandir las Tregs comprende una cantidad de al menos una citocina. Los ejemplos de citocinas que pueden estar presentes en el medio adecuado para expandir las Tregs incluyen, pero no se limitan a, IL-15, IL-12, IL-4, IL-7, IL-2, IFN γ , IL-34 y citocinas proinflamatorias (tales como, por ejemplo, IL-1 (en particular IL-1 β), IL-6 y TNF α). En algunas realizaciones, el medio adecuado para expandir las Tregs

comprende una cantidad de interleucina-2 (IL-2) y/o una cantidad de interleucina-15 (IL-15). En algunas realizaciones, el medio adecuado para expandir las Tregs comprende una cantidad de interleucina-2 (IL-2) y una cantidad de interleucina-15 (IL-15). Típicamente, se añade IL-2 al medio de cultivo de la invención a una concentración que varía de 1 a 250 ng/ml, preferiblemente de 10 a 100 ng/ml, más preferiblemente a 25 ng/ml. En algunas realizaciones, se añade IL-2 al medio de cultivo de la invención a una concentración que varía de 1 a 1000 U/ml, preferiblemente de 10 a 500 U/ml, más preferiblemente a 25 U/ml.

En algunas realizaciones, el método de la presente invención es un método para expandir células Treg humanas que comprende las etapas de

(a) cultivar una población de monocitos humanos con un medio que comprende una cantidad de un agonista de la presente invención con el fin de obtener una población de macrófagos inmunosupresores;

(b) co-cultivar una población de Treg y la población de macrófagos inmunosupresores obtenidos en la etapa (a) con un medio adecuado para expandir dicha población de células Treg humanas; y

(c) aislar opcionalmente la población de células Treg humanas obtenida en la etapa (b).

En algunas realizaciones, las células Treg o monocitos pueden obtenerse a partir de iPSC (células madre pluripotentes inducidas).

En algunas realizaciones, la población de Treg es alogénica a los macrófagos inmunosupresores. Por lo tanto, las Tregs pueden aislarse de un donante de injerto y los macrófagos inmunosupresores pueden aislarse del receptor. Alternativamente, las Tregs pueden aislarse de un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria o alergia, o de un paciente que necesita o espera un trasplante de órgano o de un donante de médula ósea (tal como, por ejemplo, para tratar la GVHD) o un individuo sano. En algunas realizaciones, las Treg son singénicas a los macrófagos inmunosupresores.

En algunas realizaciones, la población de Treg es una población de Treg CD4⁺Foxp3⁺ y/o de Treg CD8⁺Foxp3⁺. En algunas realizaciones, la población de Treg es una población de Treg CD4⁺CD45RC^{low} y/o de Treg CD8⁺CD45RC^{low}.

Típicamente, el cultivo de Tregs se llevará a cabo durante al menos 12 días, tal como, por ejemplo, durante entre 12 días y no más de 6-8 semanas, preferiblemente 15 días. En algunas realizaciones, el cultivo de PBMCs con un medio de interés se lleva a cabo durante 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días. En algunas realizaciones, el cultivo de PBMCs con un medio de interés se lleva a cabo durante 1 semana, 2 semanas, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas o más.

En algunas realizaciones, se añaden citocinas, preferiblemente IL-2 y/o IL-15, al medio de cultivo el día 0 de cultivo de las Tregs. En algunas realizaciones, las citocinas, preferiblemente IL-2 y/o IL-15, se añaden adicionalmente al medio de cultivo una, dos o tres veces o más, por ejemplo, en los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y/o 20. En algunas realizaciones, se añaden citocinas, preferiblemente IL-2 y/o IL-15, al medio de cultivo el día 0 y los días 5, 6, 7 u 8 del cultivo de las Tregs. En algunas realizaciones, se añaden citocinas, preferiblemente IL-2 y/o IL-15, al medio de cultivo el día 0 y cada 2, 3 o 4 días hasta el final del cultivo.

En algunas realizaciones del método de la presente invención, se añaden anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD8 al medio de cultivo los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y/o 20 del cultivo de PBMC o Tregs, preferiblemente el día 0 y/o los días 11, 12, 13, 14 y/o 15.

En algunas realizaciones, se añaden al medio de cultivo de 0,1 a 10 µg/ml, preferiblemente de 0,25 a 4 µg/ml, más preferiblemente de 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 y/o de 0,1 a 10 µg/ml, preferiblemente de 0,25 a 4 µg/ml, más preferiblemente de 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD28.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de IL-34 mutado de la presente invención con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal. Típicamente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato de monosodio o de disodio, cloruro de sodio, de potasio, de calcio o de magnesio y análogos o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que, tras la adición, según el caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables. Las formas

farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; incluyendo las formulaciones aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista una fácil manipulación con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Las soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

El polipéptido de IL-34 mutado puede formularse en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxido férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede llevarse a cabo mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución del mismo previamente esterilizada por filtración.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto. Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

El polipéptido de IL-34 mutado puede formularse dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente de 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente de 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente de 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis aproximadamente. También se pueden administrar dosis múltiples.

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

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: La energía libre de mutación. Efectos predichos de la mutación única de los residuos H56, G112, P59, L109, I60 y V108 a cisteína a pH 7,5.

Figura 2: La energía libre de la mutación. Efecto predicho de la mutación del residuo P59 en todos los aminoácidos a pH 7,5.

Figura 3: La energía libre de la mutación. Efecto predicho de la mutación de diversos residuos en la interfase IL-

34/CSF-1R en todos los aminoácidos a pH 7,5 (Fig. 3A, T36; Fig. 3B, Fig. 3F40; Fig. 3C, K44; Fig. 3D, S100; Fig. 3E, E103; Fig. 3F, T124; Fig. 3G, L125; Fig. 3H, L127; Fig. 3I, N128; Fig. 3J, Q131; Fig. 3K, S147; Fig. 3L, N150; Fig. 3M, L186 y Fig. 3N, N187).

Figura 4: Interacción y cinética de muteínas de IL-34 con CF1R. Los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore T200 (GE Healthcare) para diferentes mutantes de IL-34 (Fig. 4A, IL-34 wt; Fig. 4B, S100F; Fig. 4C, T36Y; Fig. 4D, Q131F; Fig. 4E, T36F; Fig. 4F, T36W, Fig. 4G, Q131R; Fig. 4H, S100D; Fig. 4I, P59K; Fig. 4J, N150; Fig. 4K, G112C/H56C y Fig. 4L, T124F).

Figura 5: Parámetros de unión de las diferentes proteínas mutantes de IL-34. La afinidad (KD), los parámetros cinéticos (k_a y k_d) y el máximo de resonancia (Rmax) de IL-34 sobre CSF-1R se determinaron usando series de diluciones de proteínas en un modelo de "cinética de ciclo único" (SCK).

Figura 6: Diferentes efectos de los mutantes de IL-34 sobre la viabilidad de monocitos cultivados después de la clasificación de PBMCs totales humanas. Fig. 6A Porcentaje de células vivas después de 3 días de cultivo con la IL-34 de tipo nativo (IL-34 WT), con cada mutante de IL-34 o medio de control. Fig. 6B, El número absoluto de células vivas se representó como un porcentaje de células vivas relacionado con el porcentaje de células vivas obtenidas en la condición con IL-34 WT (establecido como el 100 % y representado por la línea discontinua) después de 3 días de cultivo con IL-34 WT, con cada mutante de IL-34 o medio de control. Fig. 6C, Porcentaje de células CD14⁺ en la población de monocitos en una curva dosis-respuesta de IL-34 WT, mutantes de IL-34 o medio de control (sin citocina como un control negativo), de 1,5 a 200 ng/ml.

Figura 7: Fosforilación diferencial de Akt y ERK1/2 en respuesta a IL-34 WT o mutantes de IL-34 en monocitos CD14⁺ clasificados a partir de PBMCs totales humanas. Fig. 7A-B, Análisis de citometría de flujo de la fosforilación de Akt (Fig. 7A) y ERK1/2 (Fig. 7B) a los 1, 3 y 5 minutos después del contacto con IL-34 WT, S100F, T36W, T36Y, T36F, Q131F, Q131R, N150E o mutantes de IL-34-Fc IL-34 (sin citocina como control negativo). Los resultados se muestran como la intensidad de fluorescencia media de pAkt-AF647 y pERK1/2-AF647 comparados a T0.

Figura 8: Predicción de la energía libre de mutación ($\Delta\Delta G_{mut}$) de algunos residuos de IL-34 localizados en la interfase con CSF-1R. Se calculó la $\Delta\Delta G_{mut}$ a pH 7,4 para las sustituciones de los residuos Thr36 (T36) de IL-34 por Tyr (Y) y las sustituciones de los residuos Ser100 (S100) y Gln131 (Q131) de IL-34 por Phe (F). Los datos de entrada fueron las coordenadas atómicas del complejo IL-34/CSF-1R (código pdb 4DKD). También se han predicho los efectos de mutaciones dobles (T36Y/S100F, T36Y/Q131F y S100F/Q131F) o triples (T36Y/S100F/Q131F).

Figura 9: Interacción, cinética y parámetro de unión de la IL-34 WT y S100F mutante con CD138. Fig. 9A-B, Se realizaron experimentos de SPR en un Biacore T200 (GE Healthcare) para la IL-34 WT (Fig. 9A) y S100F mutante (Fig. 9B). Fig. 9C, El parámetro de afinidad (KD) de la IL-34 WT y el S100F mutante sobre CD138 se determinaron usando series de diluciones de proteínas en un modelo de "cinética de ciclo único" (SCK).

Figura 10: Interacción, cinética y parámetro de unión de la IL-34 WT y S100F mutante con PTP- ζ . Fig. 10A-B, Se realizaron experimentos de SPR en un Biacore T200 (GE Healthcare) para la IL-34 WT (Fig. 10A) y S100F mutante (Fig. 10B). Fig. 10C, El parámetro de afinidad (KD) de la IL-34 WT y el S100F mutante sobre CD138 se determinaron usando series de diluciones de proteínas en un modelo de "cinética de ciclo único" (SCK).

Ejemplos

Ejemplo 1

Método

La predicción del efecto de varias mutaciones de residuos de IL-34 a cisteína sobre la estabilidad de una forma dimérica de IL-34 se realizó calculando la energía de mutación (diferencia entre las energías libres de unión del mutante y el tipo nativo) usando el método desarrollado por Spassov y Yan (Passov and Yan, Proteins 2013; 81:704-714) accesible en el protocolo "Calculate Mutation Energy (Binding)" implementado bajo Discovery Studio (DS) (Dassault Systèmes BIOVIA software, San Diego, CA).

En resumen, se usó la estructura cristalina de rayos X de la forma dimérica de IL-34 (código del Banco de Datos de Proteínas 4DKC). La estructura se preparó primero añadiendo átomos de hidrógeno, eliminando las moléculas de agua e insertando los átomos ausentes o las regiones de bucle usando la herramienta Prepare Protein y el campo de fuerza CHARMM Polar H dentro de DS2017. La energía de mutación se calculó después para los residuos en la interfase del dímero de IL-34 y en la interfase de IL-34/CSF-1R. El efecto de la mutación se definió como estabilizante si la energía de mutación era menor de -0,5 kcal/mol, como neutro si la energía de mutación está entre -0,5 y 0,5 kcal/mol y como desestabilizante si la energía de mutación es mayor de 0,5 kcal/mol.

Resultados

Estabilización del dímero de IL-34

La energía de mutación se calculó para las siguientes mutaciones: H56C, G112C, P59C, L109C, I60C y V108C.

Se predice que las mutaciones H56C, G112C y V108C son neutras, mientras que se predice que las mutaciones P59C, L109C e I60C son desestabilizantes ([Figura 1](#)). No se espera que la doble mutación H56C/G112C tenga un efecto perjudicial sobre la estabilidad del dímero de IL-34, pero podría conducir a la formación de puentes disulfuro que estabilizan el dímero ([Figura 1](#)).

5 **Desestabilización del dímero de IL-34**

La energía de mutación se calculó para P59. Las mutaciones P59K y P59R deben prevenir la formación del dímero de IL-34 ([Figura 2](#)).

Estabilización de la interfaz IL-34/CSF-1R

Las siguientes mutaciones deben estabilizar potencialmente el complejo IL-34/CSF-1R ([Figura 3](#)):

- 10 – T36Y, T36F o T36W
- S100D o S100F
- T124F o T124W
- N128Y o N128F
- Q131R, Q131F
- 15 – S147E
- N150E
- L186R

Ejemplo 2

- Se aíslan PBMCs de sangre de voluntario sano (HV) mediante gradiente de Ficoll (CMSMSL01-01; Eurobio), y se agotan las células T, B y NK gracias a anticuerpos anti-CD3 (clon OKT3), anti-CD19 (clon HIB19; BD Biosciences) y anti-CD56 (clon MY31; BD Biosciences) usando perlas magnéticas. Los monocitos se clasifican después según los parámetros morfológicos de dispersión frontal (FSC), dispersión lateral (SSC) y tinción positiva de CD14 (clon M5E2; BD Biosciences). Los monocitos recién separados se lavan y se siembran a 1×10^6 /ml en medio completo (RPMI 1640, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, 0,1 mg/ml de estreptomicina, FCS al 10% suplementado con **una cantidad de los polipéptidos (P1), (P2) y (P3)**). El día 2, las células se estimulan o no con 100 ng/mL de LPS (L4391; Sigma-Aldrich) durante 24 horas. El día 3, las células se recolectan y se tiñen con anti-CD14 (clon M5E2; BD Biosciences), anti-CD16 (clon 3G8; BD Biosciences), anti-CD163 (clon GHI/61; BD Biosciences), anti-CD206 (clon 19.2; BD Biosciences), anti-CD209a (clon DCN46; BD Biosciences), anti-CD169 (clon 7-239; BD Biosciences), anti-CD80 (clon L307.4; BD Biosciences), anti-CD86 (clon 2331; BD Biosciences), anti-CD40 (clon 5C3; BD Biosciences) y anti-HLA-DR (clon G46-6; BD Biosciences). La fluorescencia se mide con un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) y se usa el software FlowJo para analizar los datos. Las células se clasifican primero por su morfología; las células muertas se excluyen seleccionando células viables con DAPI para analizar la expresión de los diferentes marcadores entre los monocitos CD14⁺CD16⁻ y CD14⁺CD16⁺.

Ejemplo 3

- Para los experimentos de señalización celular, las líneas celulares se privan de suero (FBS al 0,1%) durante 48 horas y se tratan con **los polipéptidos (P1), (P2) y (P3)** (10 ng/ml) durante 20 minutos, momento en el cual se recogen las muestras. Las muestras se analizan después mediante transferencia de Western usando tampón Tris/Glicina y se transfieren a una membrana hybond-P (Amersham, GE, Fairfield, CT, USA). Todas las muestras de proteína se cuantifican usando un ensayo BCA para garantizar cantidades de proteína similares en todos los carriles del gel de western (Thermo Scientific Inc.). Los anticuerpos usados en experimentos de transferencia de Western son CSF-1R (sc692, 1:1000, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), fosfo-tirosina (sc-508, 1:1000, Santa Cruz), fosfo-ERK (sc-7383, 1:1000, Santa Cruz), ERK total (sc-94, 1:1000, Santa Cruz), y β -actina (A2228, 1:10000, Sigma-Aldrich). Todos los anticuerpos se incuban con la transferencia durante la noche a 4°C en BSA TTBS al 5 %. Los anticuerpos secundarios IgG-HPR de ratón (sc-2061, 1:10000, Santa Cruz,) o IgG-HPR de conejo (sc-2030, 1:10000, Santa Cruz,) se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente en TTBS de leche al 5%. La señal se detecta usando Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA.).

Ejemplo 4**Material y métodos****Reactivos y material**

5 Los chips sensores SCM5 de la serie S y el tampón HBS-P (tampón HEPES 10 mM con KCl 2,7 mM, NaCl 150 mM, y tensioactivo P20 al 0,05%, pH 7,4), el kit de acoplamiento de aminas [clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS); etanolamina 1,0 M (pH 8,5)], tampón de inmovilización (acetato de sodio pH 5,0), soluciones de regeneración (NaOH 10 mM, para análisis) se adquirieron de GE Healthcare Life Science (Uppsala, Suecia).

Análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR)

10 Los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore T200 (GE Healthcare) a 25°C. El tampón HBS-P se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 µm y se desgasificó antes de su uso. En primer lugar, el receptor de CSF-1 humano recombinante de Sino Biological (CSF-1R, ref. K10161-H08H) se inmovilizó sobre la superficie del chip mediante acoplamiento de amina. En resumen, el receptor de CSF-1 recombinante se diluyó a 20 µg/mL en solución de acetato de sodio 10 mM a pH 5,0. El CSF-1R diluido se inmovilizó covalentemente pronto a una celda de flujo del
15 chip sensor CM5 a través del grupo amina primaria, usando el kit de acoplamiento de amina convencional. Las muteínas de IL-34 se analizaron después en modelos de "cinética de ciclo único" (SCK) sobre el chip inmovilizado de CSF-1R.

Interacción y cinética de muteínas de IL-34 con CSF-1R

20 La afinidad (KD), los parámetros cinéticos (ka y kd) y el máximo de resonancia (Rmax) de IL-34 sobre CSF-1R se determinaron usando series de diluciones de proteínas en un modelo de "cinética de ciclo único" (SCK). Las muteínas de IL-34 como los analitos se diluyeron en tampón HBS-P con concentraciones que variaban de 25 nM a 400 nM, que fluían sobre el CSF-1R inmovilizado y se registraron las unidades de respuesta (RUs) obtenidas. El caudal fue de 30 µL/min con 120 s para la unión y 600 s para la disociación. Después, la superficie del chip sensor se regeneró con NaOH 10 mM durante 30 s. La constante de equilibrio de disociación, KD, parámetros cinéticos, kd y ka y Rmax se
25 determinaron mediante ajuste de curva directo de los sensogramas a un modelo de interacción Langmuir 1:1.

Resultados

El análisis Biacore muestra que varios mutantes de IL-34 tienen una afinidad mayor por CSF-1R que la IL-34 WT, en particular los mutantes S100F, T36Y, Q131F, T36F, T36W, Q131R y S100D, lo que sugiere que estos mutantes serán más eficaces que la IL-34 WT (Figura 4 A-H y Figura 5). Por el contrario, los mutantes P59K, N150E, G112/H56C y T124F de IL-34 tienen una afinidad disminuida o similar por CSF-1R en comparación con la IL-34 WT (Figura 4 I-L y Figura 5).

Ejemplo 5**Material y métodos**

35 La capa leucocitaria se obtuvo del Etablissement Français du Sang (EFS, Nantes, Francia) de individuos sanos anónimos. Las PBMCs se obtuvieron mediante gradiente de Ficoll, después los monocitos se aislaron mediante separación por perlas magnéticas (kit de aislamiento de monocitos clásico, Miltenyi Biotec). Los monocitos CD14⁺ se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo plano a 10⁶ células/ml en medio completo (RPMI 1640, FBS al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, glutamina al 1%, AANE al 1%, Hepes al 1%, piruvato sódico al 1%), con una concentración final de 100 ng/ml de IL-34 WT o mutantes: S100F, S100D, T36W, T36Y, T36F, Q131F, Q131R, N150E, C112/C56, P59K, T124F e IL-34 Fc (Fig. 6A y Fig. 6B) y variando entre 1,5 y 200 ng/mL (Fig. 6C). Se usó un medio sin citocinas añadidas (sin citocina) como control negativo. El día 3, las células se recogieron enjuagando en FBS al 2% en PBS, EDTA 2 mM, y se usaron adicionalmente para la tinción de viabilidad y el análisis fenotípico por citometría de flujo.

45 Se analizó el número absoluto de células usando perlas de recuento (123 count eBeads™ Counting Beads, ThermoFisher Scientific).

Resultados

Los mutantes T36F, S100F, Q131F, T36W, T36Y, N150E e IL-34-Fc son tan eficaces como IL34 WT en la inducción de la supervivencia de monocitos/macrófagos (Figura 6A). S100F, T36Y, Q131F e IL-34-Fc fueron particularmente interesantes ya que muestran una capacidad más fuerte para mantener la supervivencia de las células (Figura 6B).
50 Curiosamente, Q131R y S100D que tienen una mejor afinidad de unión a CSF-1R que IL34 WT inhiben la supervivencia de macrófagos (Figura 6A y B) y por lo tanto actúan como antagonistas. Además, el análisis de la expresión de CD14 por monocitos en presencia de una concentración decreciente de los mutantes de IL-34 mostró que los mutantes S100F, Q131F y T36Y eran más eficaces a concentración más baja en la diferenciación de monocitos

CD14⁺ que IL-34 WT a la misma concentración (Figura 6C).

Ejemplo 6

Material y métodos

Para el análisis de la fosforilación de Akt y ERK1/2 (pAkt y pERK1/2 respectivamente), los monocitos CD14⁺ recién clasificados se cultivaron en medio libre de FBS (RPMI 1640, penicilina-estreptomicina al 1%, glutamina al 1%, AANE al 1%, Hepes al 1%, piruvato de sodio al 1%) en placas de 96 pocillos de baja unión, con IL-34 WT o los diferentes mutantes S100F, T36W, T36Y, T36F, Q131F, Q131R, N150E e IL-34-Fc a una concentración de 100 ng/ml, durante 1, 3 y 5 minutos. El análisis se realizó por citometría de flujo, usando los anticuerpos primarios fosfo-Akt (Ser473) y fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (referencia #4060 y #4370, Cell Signalling), y el anticuerpo secundario IgG(H+L)-AF647 anti-conejo de cabra (ref A21245, Life Technologies), siguiendo el protocolo de BD Biosciences Phosflow (usando el tampón BD Cytotfix Fixation y el tampón BD Phosflow Perm Buffer III, BD Biosciences).

Resultados

Después, se realizaron análisis de citometría de flujo de pAkt y pERK1/2 para evaluar funcionalmente la señalización inducida por la unión de cada mutante de IL-34 a CSF-1R. Los análisis de citometría de flujo de pAkt muestran un aumento de fosforilación para los mutantes T36F, IL-34-Fc, S100F, Q131F, T36W y T36Y en comparación con IL-34 WT después de 3 minutos y para la mayoría de ellos (T36F, IL-34-Fc, Q131F, T36W y T36Y) también después de 5 minutos (Figura 7A). Por el contrario, el mutante N150E es menos eficiente que IL-34 WT en la inducción de la fosforilación de Akt después de 3 minutos y tan eficiente como IL-34 WT después de 5 minutos. Finalmente, el mutante Q131R de IL-34 no induce ninguna fosforilación de Akt después de 3 o 5 minutos. Los análisis de citometría de flujo de pERK1/2 muestran una fosforilación aumentada para los mutantes IL-34-Fc, S100F, Q131F y T36Y en comparación con IL-34 wt después de 3 minutos y para Q131F y T36Y también después de 5 minutos (Figura 7B). Además, los mutantes T36W y T36F muestran la misma cinética que la IL-34 WT. Por el contrario, el mutante N150E es de nuevo menos eficiente que IL-34 WT después de 3 y 5 minutos. Además, como ya se ha observado para pAkt, el mutante Q131R no induce ninguna fosforilación de ERK1/2 (Figura 7B).

Ejemplo 7

Material y métodos

Se calculó la $\Delta\Delta G_{mut}$ a pH 7,4 para las sustituciones de los residuos Thr36 (T36) de IL-34 por Tyr (Y) y las sustituciones de los residuos de Ser100 (S100) y Gln131 de IL-34 por Phe (F), usando el método de Spassov y Yan (Spassov and Yann, 2013) implementado bajo Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA Release 2017, San Diego) en el protocolo "Calculate Mutation Energy (Binding)". Los datos de entrada fueron las coordenadas atómicas del complejo IL-34/CSF-1R (código pdb 4DKD).

Resultados

Según los resultados obtenidos en los ejemplos anteriores, las mutaciones T36Y, S100F y Q131F eran estabilizantes *in silico* ($\Delta\Delta G_{mut} < -0,5$) (Figura 8). Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la combinación de dos o tres de esas mutaciones podría ser incluso más estabilizante que una mutación sola. Curiosamente, se predijo que el efecto de las mutaciones dobles era igual o incluso ligeramente más estabilizante que las simples. Se predijo que la combinación de las mutaciones triples era la más estabilizante.

Ejemplo 8

Material y métodos

Reactivos y material

Los chips sensores CM5 de la serie S y el tampón HBS-P (tampón HEPES 10 mM con KCl 2,7 mM, NaCl 150 mM, y tensioactivo P20 al 0,05%, pH 7,4), el kit de acoplamiento de aminas [clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS); etanolamina 1,0 M (pH 8,5)], tampón de inmovilización (acetato de sodio pH 5,0), soluciones de regeneración (NaOH 10 mM, para análisis) se adquirieron de GE Healthcare Life Science (Uppsala, Suecia).

Análisis de la resonancia de plasmón de superficie (SPR)

Los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore T200 (GE Healthcare) a 25°C. El tampón HBS-P se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 μ m y se desgasificó antes de su uso. En primer lugar, se inmovilizaron CD138 humano recombinante de Sino Biological (SDC1, Syndecan-1, ref 11429-H08H) y PTPz de Viva System Biologic (ref OPCA02772) sobre la superficie del chip mediante acoplamiento de amina. En resumen, se diluyó CD138 recombinante o PTP- ζ a 20 μ g/mL en solución de acetato de sodio 10 mM a pH 5,0. El CD138 o PTP- ζ diluido se inmovilizó covalentemente pronto a una celda de flujo del chip sensor CM5 a través de un grupo amina primario, usando el kit de acoplamiento de amina estándar. Las mutéínas de IL-34 se analizaron después en modelos de

"cinética de ciclo único" (SCK) sobre el chip inmovilizado de CD138 o PTP- ζ .

Interacción y cinética de muteínas de IL-34 con CD138 o PTP- ζ

- 5 El máximo de resonancia (Rmax) de IL-34 sobre CD138 o PTP- ζ se determinó usando series de diluciones de proteínas en un modelo de "cinética de ciclo único" (SCK). Las muteínas de IL-34 como los analitos se diluyeron en tampón HBS-P con concentraciones que variaban de 25 nM a 400 nM, que fluían sobre el CD138 o PTP- ζ inmovilizado y se registraron las unidades de respuesta (RUs) obtenidas. El caudal fue de 30 μ L/min con 120 s para la unión y 600 s para la disociación. Después, la superficie del chip sensor se regeneró con NaOH 10 mM durante 30 s. Los Rmax se determinaron mediante ajuste directo de la curva de los sensorgramas a un modelo de interacción Langmuir 1:1.

Resultados

- 10 El análisis Biacore muestra que el mutante S100F de IL-34 tiene una mayor afinidad por CD138 (Figura 9A-C) y PTP- ζ (Figura 10A-C) que la IL-34 WT, lo que sugiere que este mutante será más eficiente que la IL-34 WT.

Referencias

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de IL-34 mutado que comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

a) la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, en donde el residuo de serina en la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F),

b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos definida en a), en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), siempre que dicho polipéptido tenga una actividad agonista superior en comparación con la IL-34 de tipo nativo que tiene la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1, y

c) un fragmento de una secuencia definida en a) o b), en donde dicho fragmento comprende de 200 a 222 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia definida en a) o b) y en donde el residuo de serina en la posición correspondiente a la posición 100 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina (S100F), siempre que dicho polipéptido tenga una actividad agonista superior en comparación con la IL-34 de tipo nativo que tiene la secuencia de aminoácidos que varía del residuo de asparagina (N) en la posición 21 de la SEQ ID NO: 1 al residuo de prolina (P) en la posición 242 de la SEQ ID NO: 1;

en donde la actividad agonista es al menos una, preferiblemente al menos dos, de:

- una afinidad de unión hacia CSF-1R, PTP- ζ y/o CD138,
- una capacidad de inducir o potenciar la supervivencia y proliferación de monocitos, preferiblemente de monocitos CD14⁺,
- una capacidad de inducir o potenciar la diferenciación de monocitos, preferiblemente de monocitos CD14⁺, en macrófagos, y
- una capacidad de inducir o potenciar la fosforilación de cinasas, preferiblemente de la proteína cinasa B (Akt) y/o cinasas reguladas por la señal extracelular 1/2 (ERK1/2).

2. El polipéptido de IL-34 mutado según la reivindicación 1, comprendiendo dicho polipéptido además al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- T36Y, T36W o T36F, en donde el residuo de treonina en la posición 36 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de tirosina, un residuo de triptófano o un residuo de fenilalanina, respectivamente,
- Q1131F, en donde el residuo de glutamina en la posición 131 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por un residuo de fenilalanina,
- H56C/G112C, en donde el residuo de histidina en la posición 56 de la SEQ ID NO: 1 y el residuo de glicina en la posición 112 de la SEQ ID NO: 1 están ambos sustituidos por un residuo de cisteína, y
- combinaciones de los mismos.

3. Una proteína de fusión que consiste en el polipéptido de IL-34 mutado según la reivindicación 1 o 2 fusionado a un polipéptido heterólogo.

4. La proteína de fusión según la reivindicación 3 en donde el polipéptido de IL-34 mutado está fusionado a una región Fc.

5. Un ácido nucleico aislado, sintético o recombinante que codifica el polipéptido de IL-34 mutado según la reivindicación 1 o 2 o que codifica la proteína de fusión según la reivindicación 3 o 4.

6. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado según la reivindicación 5.

7. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado según la reivindicación 5 y/o el vector según la reivindicación 6.

8. El polipéptido de IL-34 mutado según la reivindicación 1 o 2, la proteína de fusión según la reivindicación 3 o 4, el ácido nucleico aislado según la reivindicación 5, o el vector según la reivindicación 6, para su uso como un fármaco.

9. Uso *in vitro* del polipéptido de IL-34 mutado según la reivindicación 1 o 2, o la proteína de fusión según la reivindicación 3 o 4, como un agonista de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en CSF-1R, PTP- ζ y CD138.

10. El polipéptido de IL-34 mutado según la reivindicación 1 o 2, la proteína de fusión según la reivindicación 3 o 4, el ácido nucleico aislado según la reivindicación 5, o el vector según la reivindicación 6, para su uso en la inducción de tolerancia inmunitaria en un paciente que lo necesita.
- 5 11. El polipéptido de IL-34 mutado según la reivindicación 1 o 2, la proteína de fusión según la reivindicación 3 o 4, el ácido nucleico aislado según la reivindicación 5, o el vector según la reivindicación 6, para su uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplante en un paciente que lo necesita.
12. El polipéptido de IL-34 mutado según la reivindicación 1 o 2, la proteína de fusión según la reivindicación 3 o 4, el ácido nucleico aislado según la reivindicación 5, o el vector según la reivindicación 6, para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunitarias, respuesta inmunitaria no deseada contra proteínas terapéuticas o alergias en un paciente que lo necesite.
- 10 13. Un método de obtención *in vitro/ex vivo* de una población de macrófagos inmunosupresores que comprende cultivar una población de monocitos con un medio que comprende el polipéptido de IL-34 mutado según la reivindicación 1 o 2.
14. Un método de obtención *in vitro/ex vivo* de una población de células Treg humanas que comprende las etapas de:- 15 (a) obtener una población de macrófagos inmunosupresores mediante el método *in vitro/ex vivo* según la reivindicación 13; y
- (b) co-cultivar una población de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) y la población de macrófagos inmunosupresores obtenida en la etapa (a).
- 20 15. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de IL-34 mutado según la reivindicación 1 o 2, la proteína de fusión según la reivindicación 3 o 4, el ácido nucleico aislado según la reivindicación 5, o el vector según la reivindicación 6, con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente al menos una matriz de liberación prolongada tal como un polímero biodegradable.

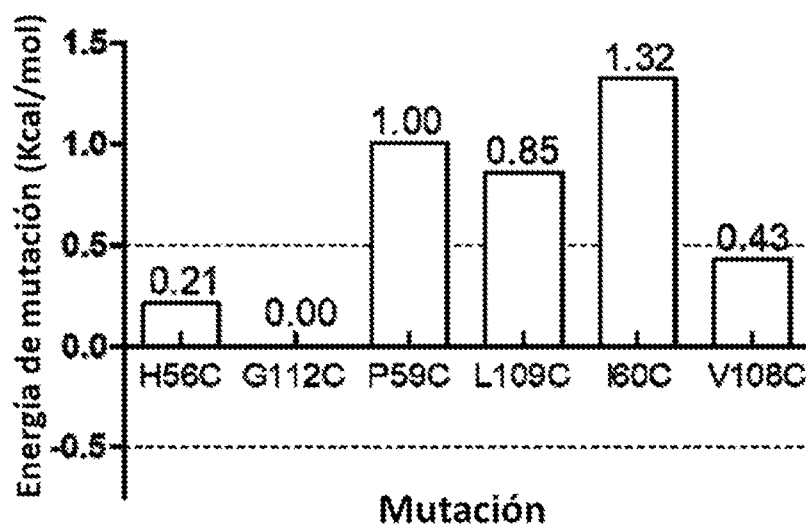


Figura 1

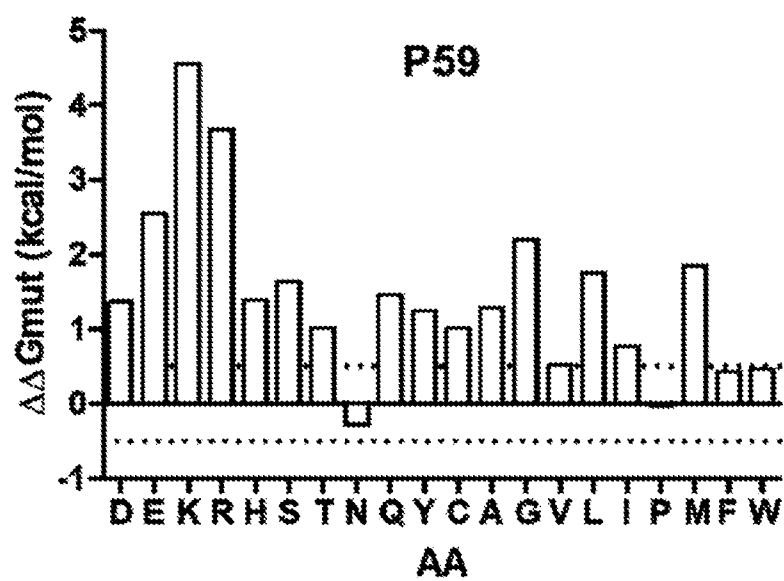


Figura 2

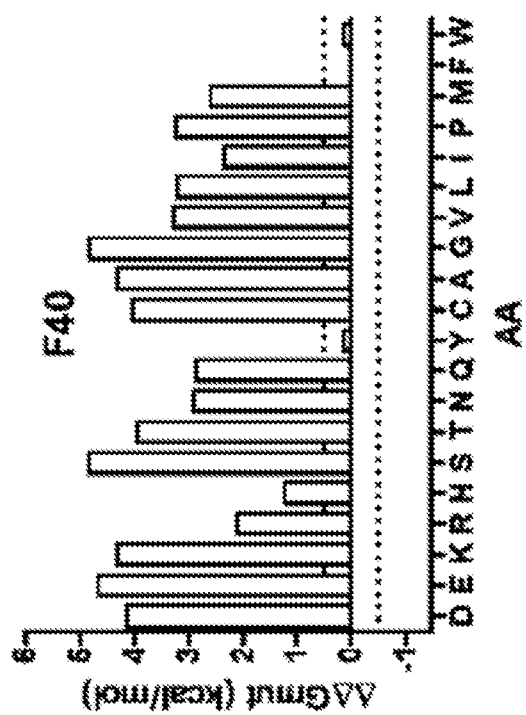


Figure 3B

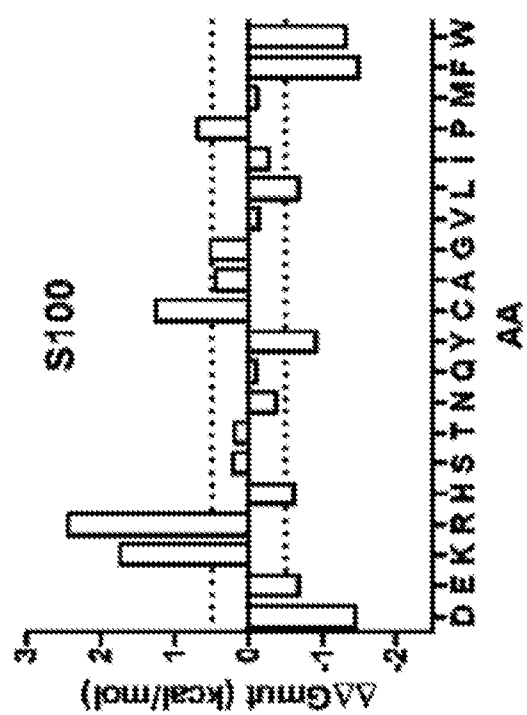


Figure 3D

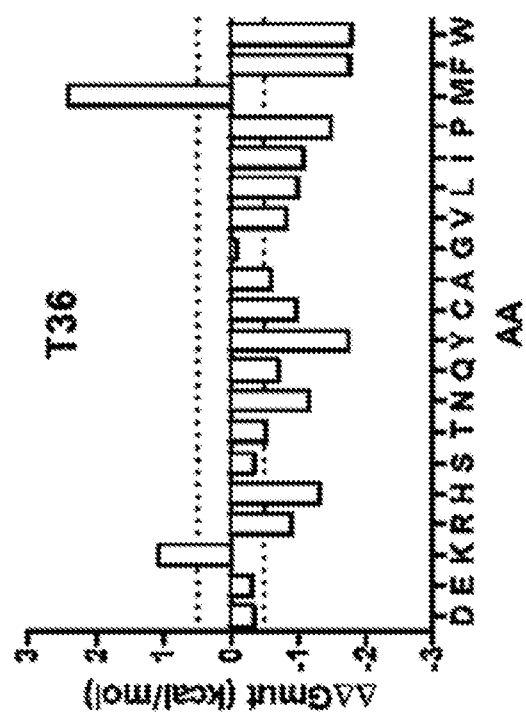


Figure 3A

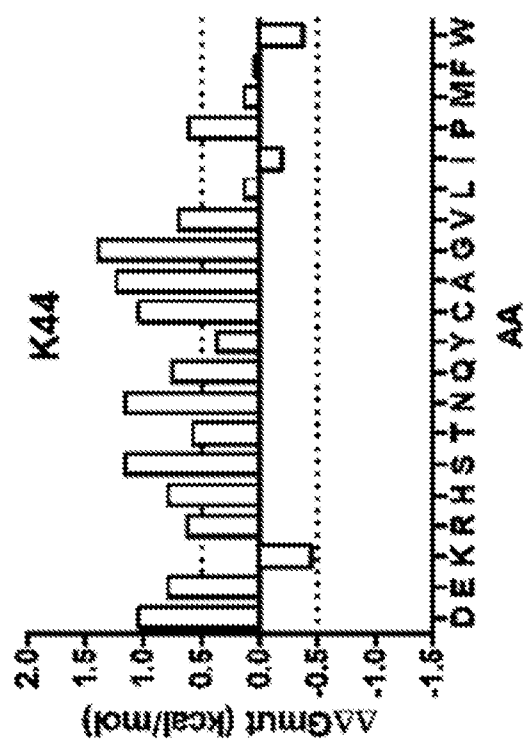


Figure 3C

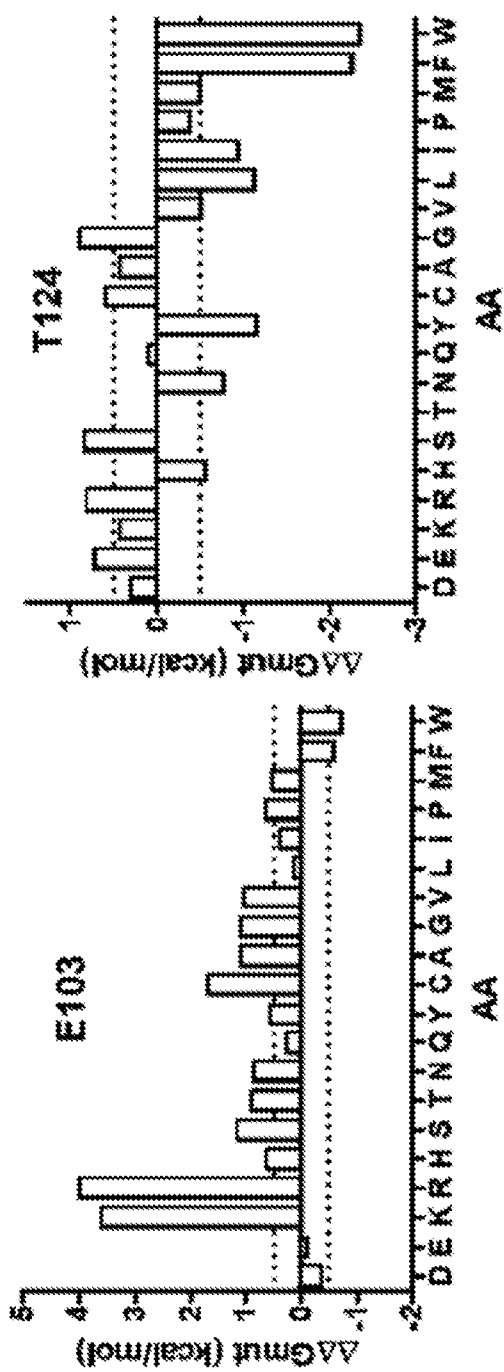


Figura 3E

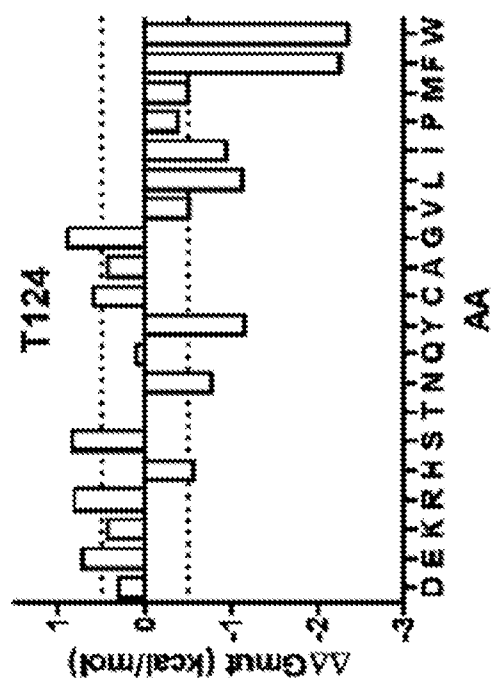


Figura 3F

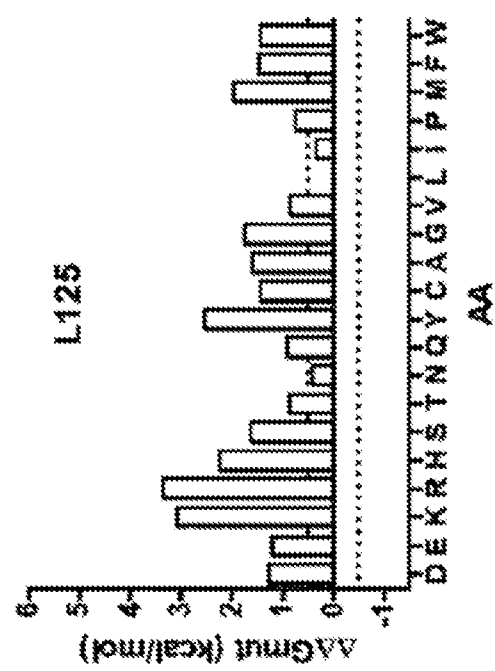


Figura 3G

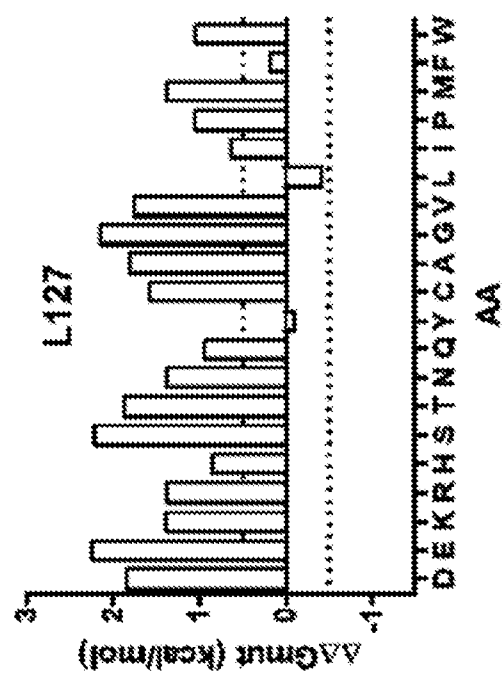


Figura 3H

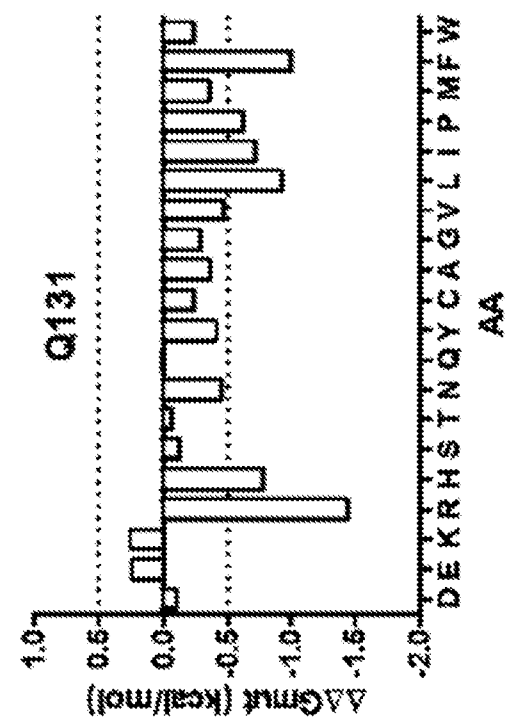


Figure 3J

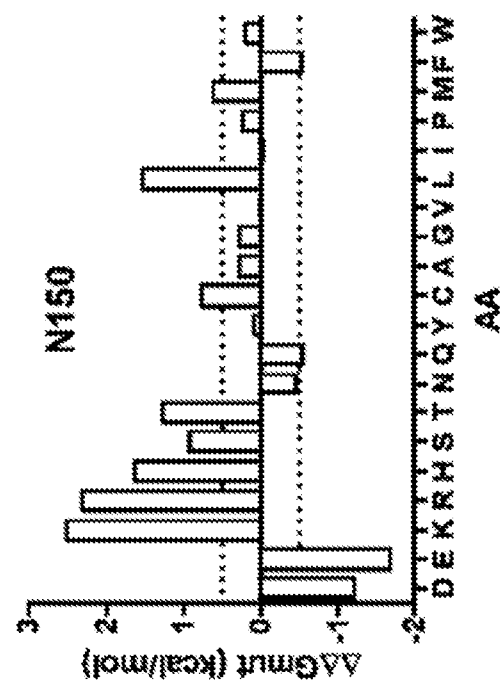


Figure 3L

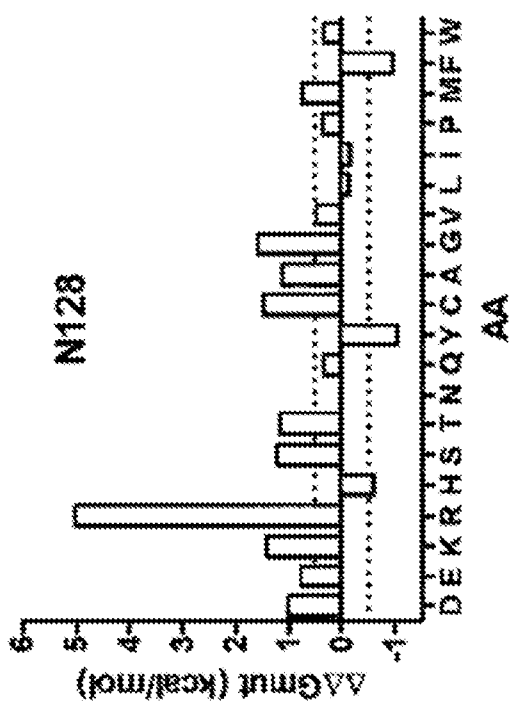


Figure 3I

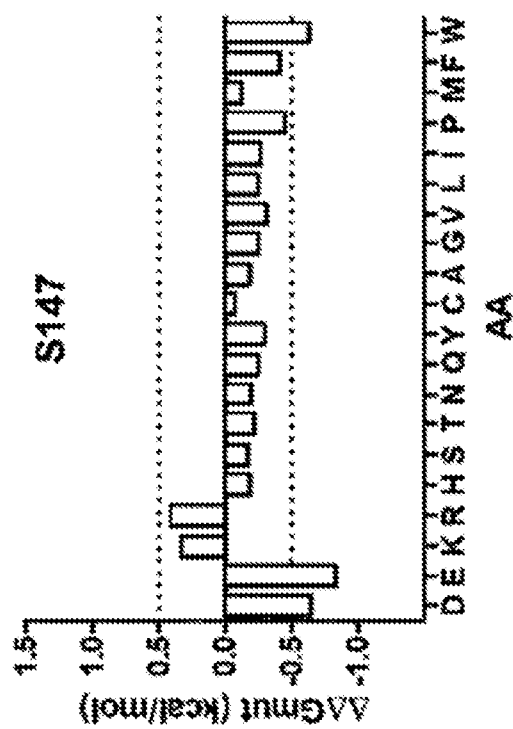


Figure 3K

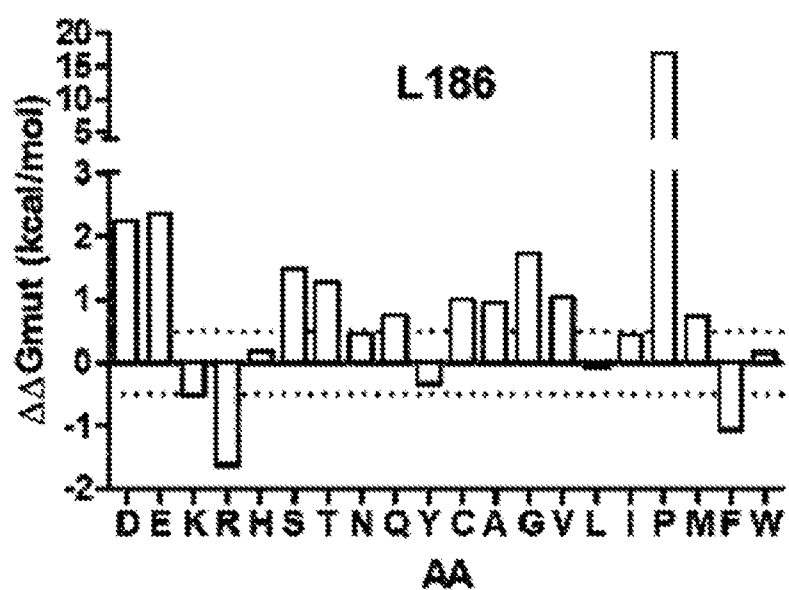


Figura 3M

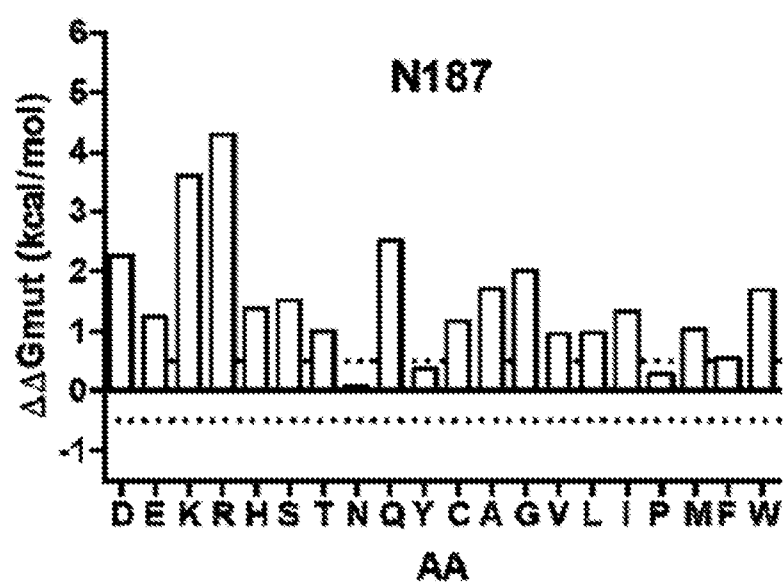


Figura 3N

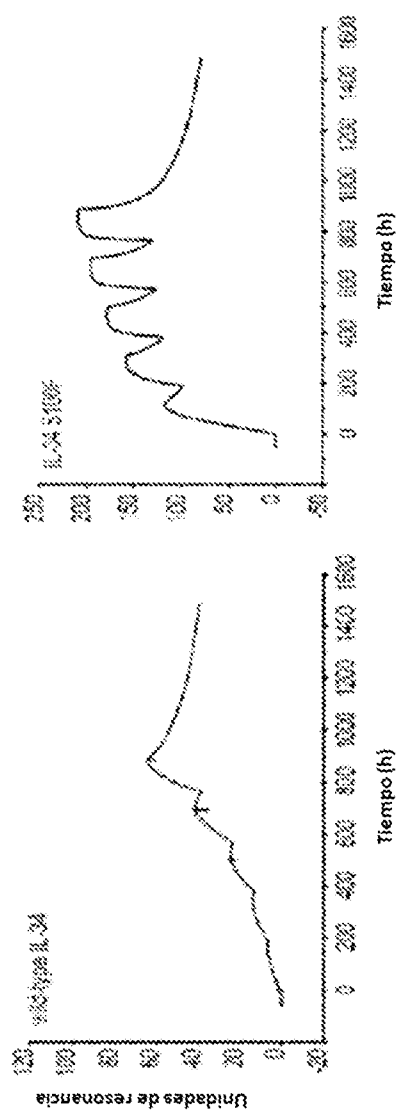


Figura 4A

Figura 4B

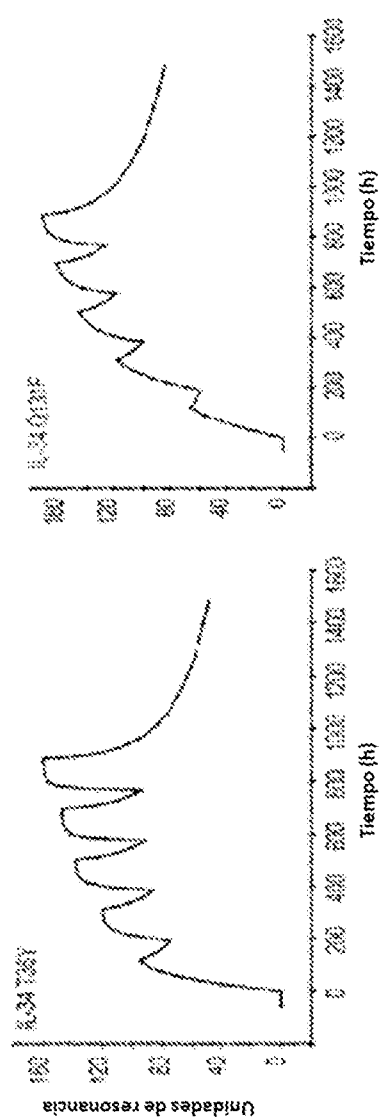


Figura 4C

Figura 4D

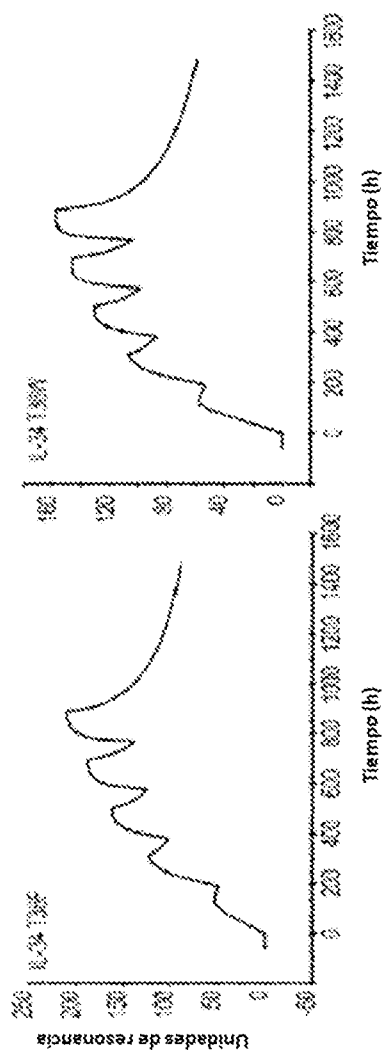


Figura 4E

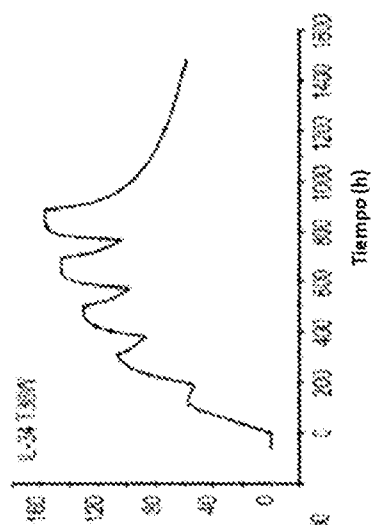


Figura 4F

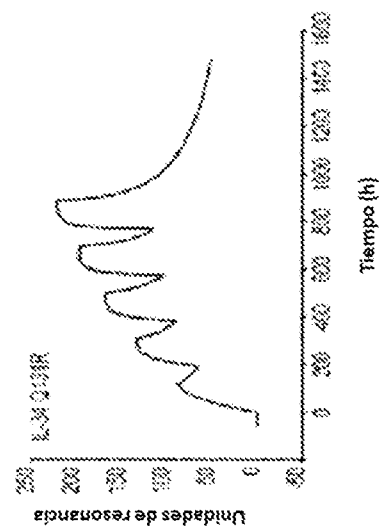


Figura 4G

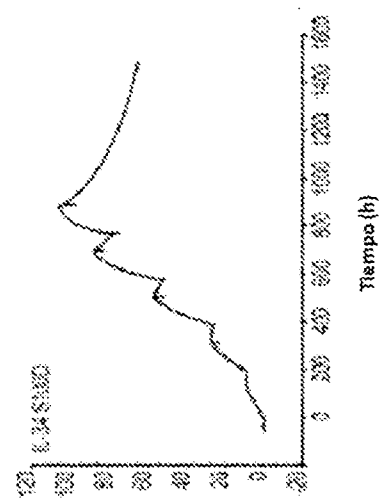


Figura 4H

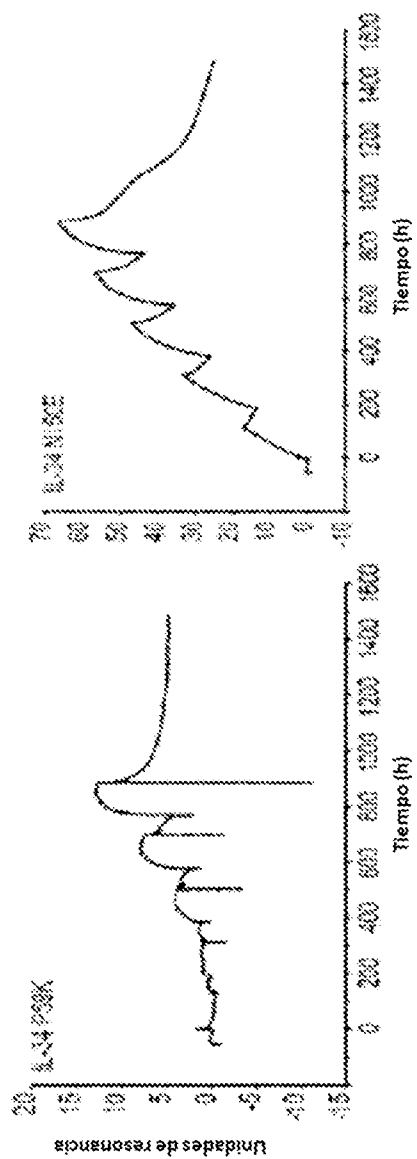


Figura 4I

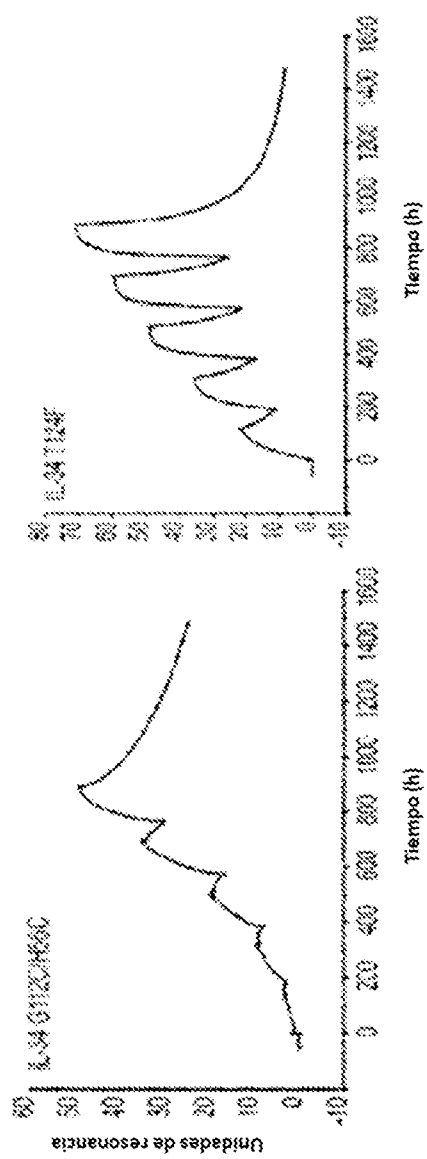


Figura 4J

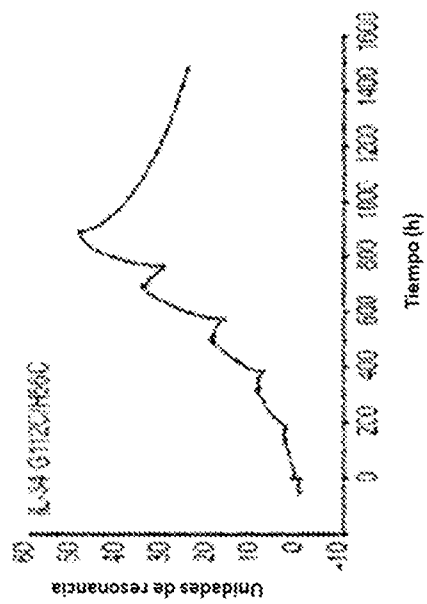


Figura 4K

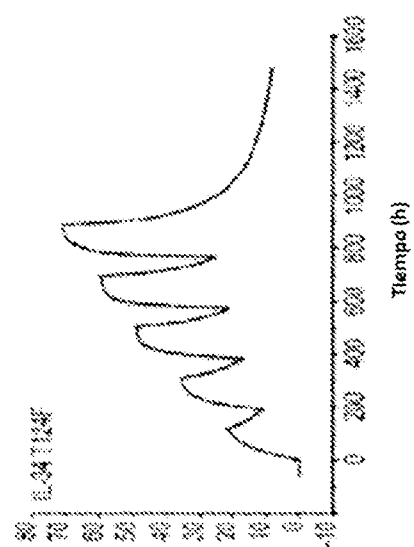


Figura 4L

Parámetros de unión

	Kd (DMS)	Kd (1S)	Kd (M)	Rmax (RU)
IL-34 WT	2.27E-04	1.81E-03	7.95E-08	104.72
IL-34 S100F	9.01E-06	0.01887	2.10E-09	171.8
IL-34 I36Y	6.82E-06	0.02064	3.03E-09	133.0
IL-34 Q131F	2.27E-05	0.001101	4.86E-09	144.6
IL-34 I36F	2.57E-05	0.001921	7.46E-09	174.6
IL-34 I36W	5.29E-05	0.002771	5.24E-09	130.3
IL-34 Q131R	6.91E-05	0.006411	9.28E-09	173.9
IL-34 S100D	7.22E-04	9.73E-04	1.35E-08	103.3
IL-34 P59K	/	/	/	/
IL-34 N150E	9.31E-04	0.001605	1.72E-08	59.65
IL-34 G112/H56C	2.65E-04	0.001156	4.37E-08	54.17
IL-34 I124F	1.70E-05	0.005717	3.37E-08	55.38
IL-34 Fc	2.79E-05	0.07467	2.67E-09	135.8

Figura 5

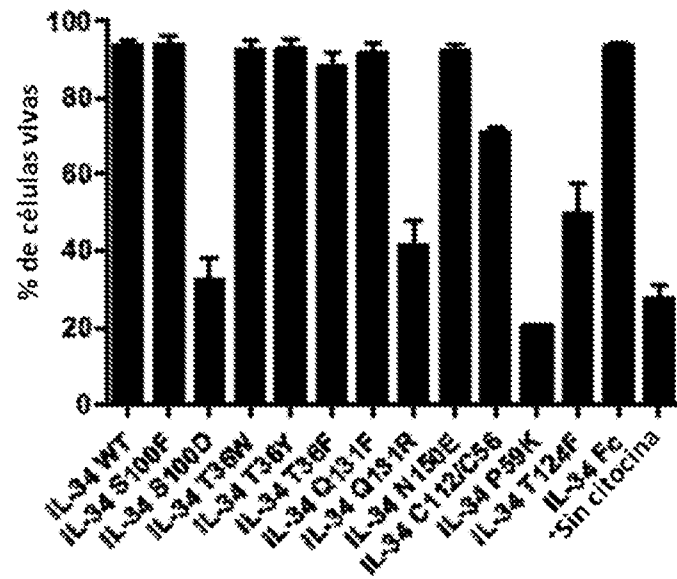


Figura 6A

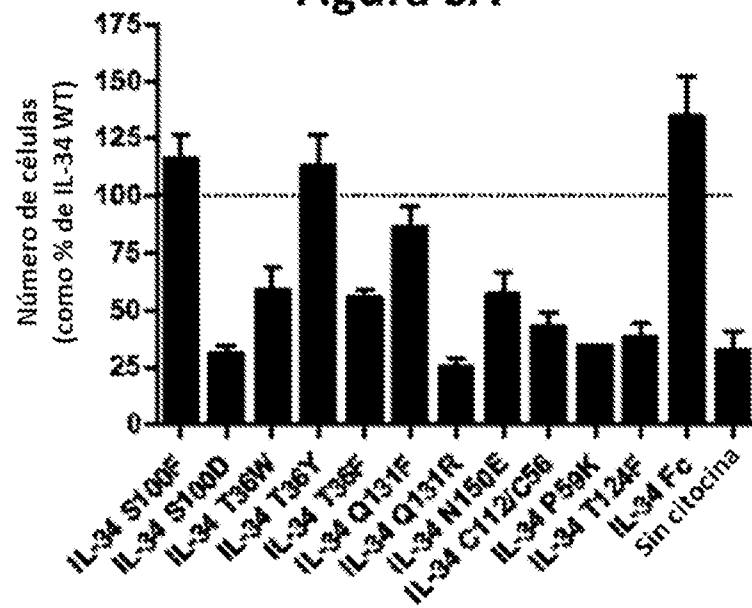


Figura 6B

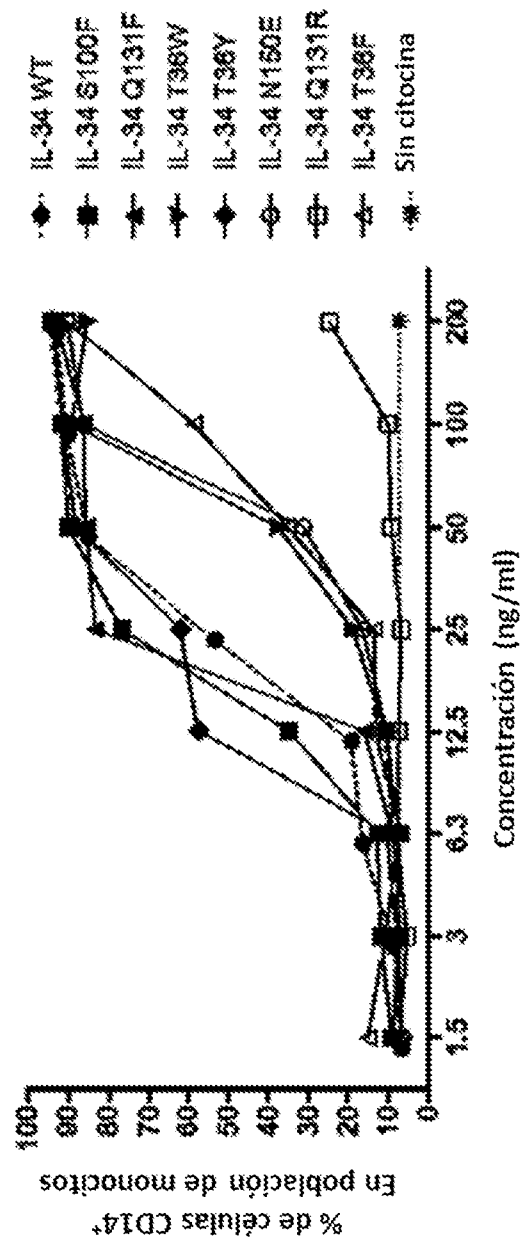


Figura 6C

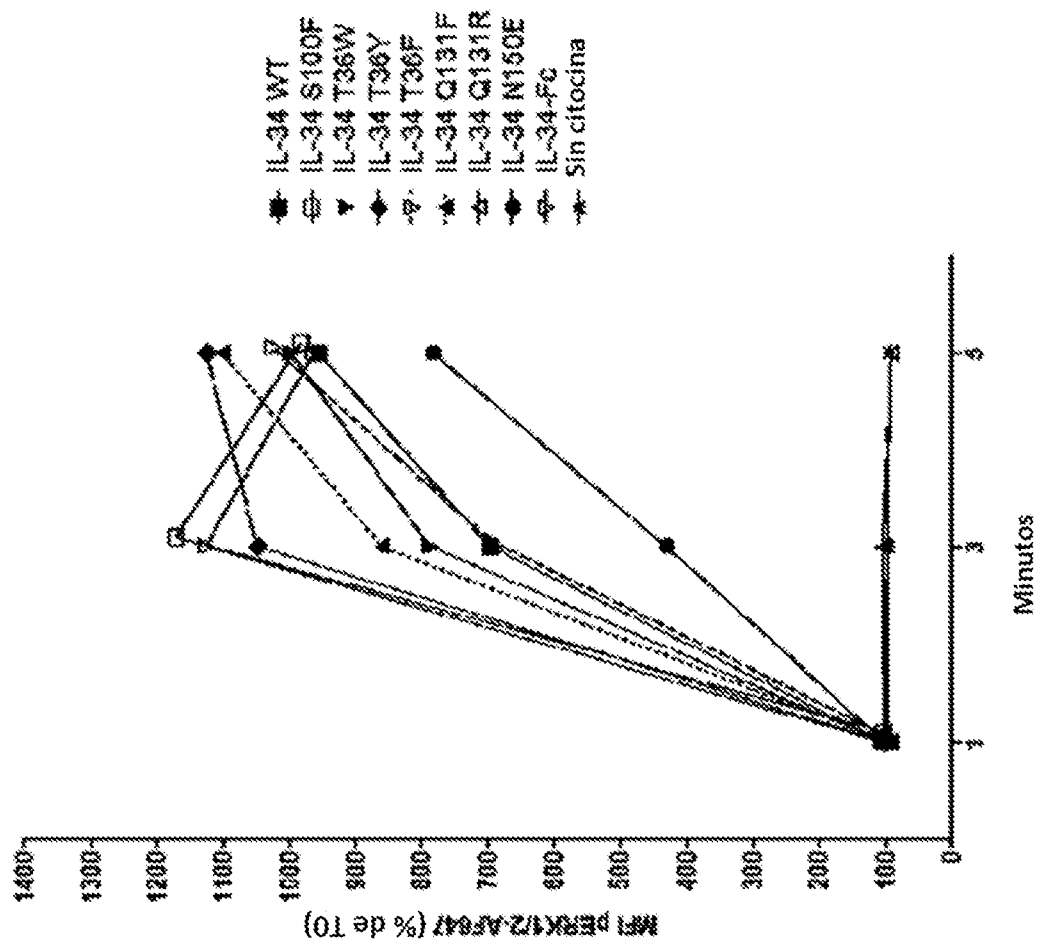


Figura 7B

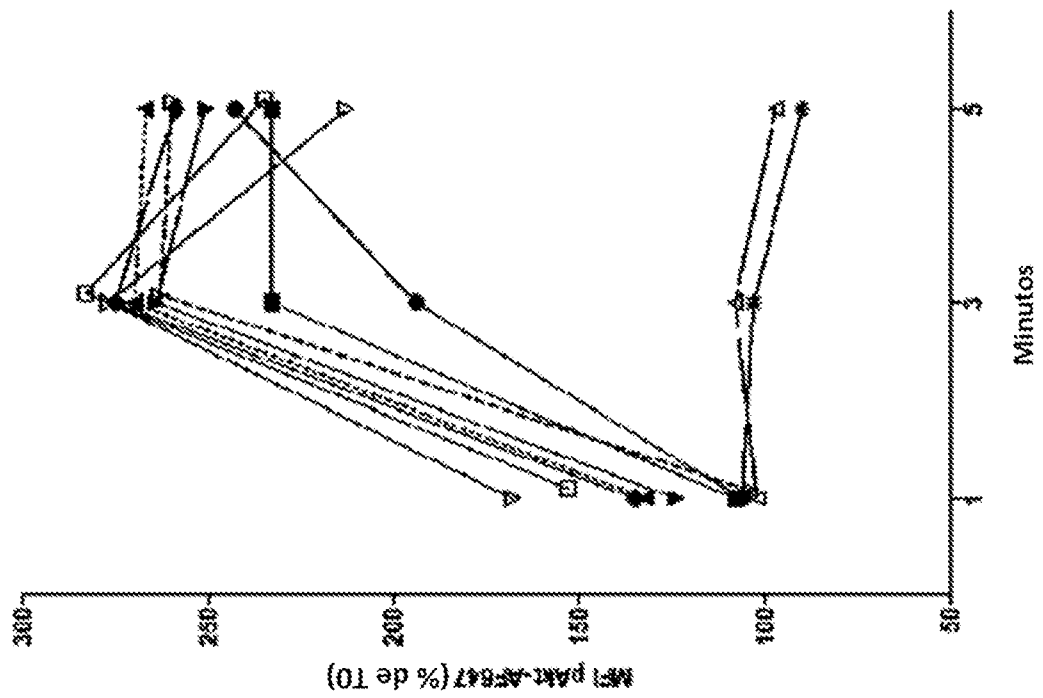


Figura 7A

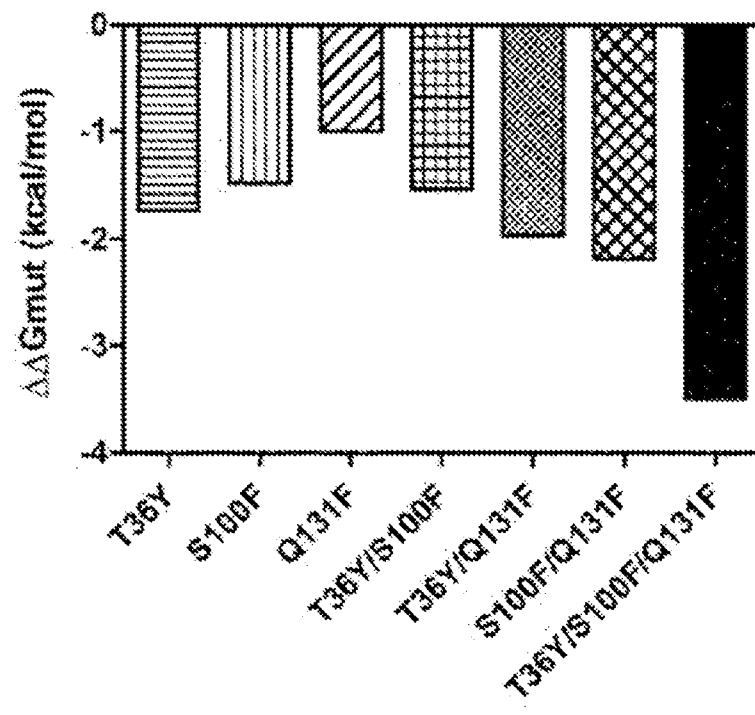


Figura 8

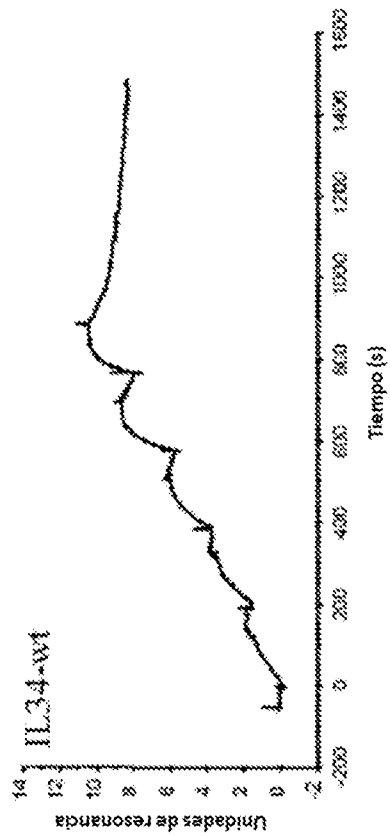


Figura 9A

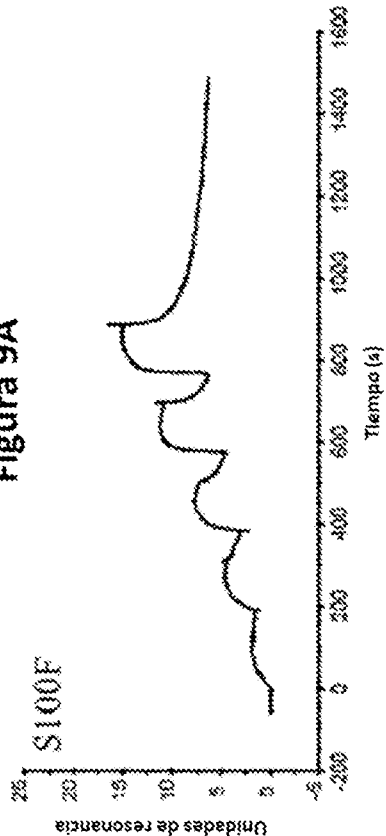


Figura 9B

Parámetros de unión:

KD (M)	
IL-34 WT	5.74E-09
IL-34 S100F	3.12E-09

Figura 9C

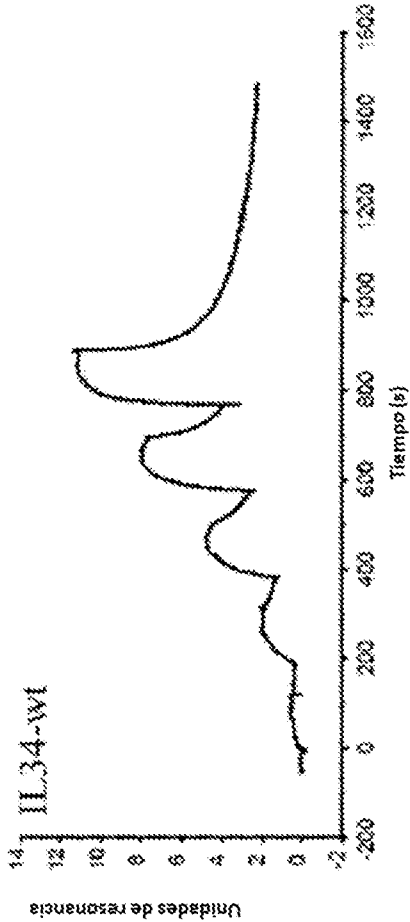


Figura 10A

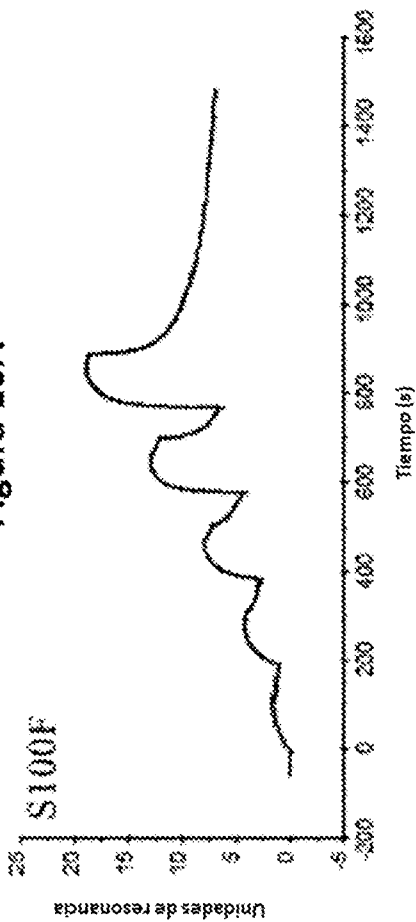


Figura 10B

Parámetros de unión:

KD (M)	
IL-34 WT	1.28E-08
IL-34 S100F	7.46E-09

Figura 10C