

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 861 516**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2016 PCT/EP2016/078833**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017 WO17089555**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2016 E 16805351 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2021 EP 3380615**

54 Título: **Oligonucleótidos antisentido para IL-34 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**25.11.2015 US 201562260076 P**

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

**06.10.2021**

73 Titular/es:

**NOGRA PHARMA LIMITED (100.0%)  
33 Sir John Rogerson's Quay  
Dublin 2/IE, IE**

72 Inventor/es:

**MCNULTY, MARIE;  
VITI, FRANCESCA y  
BELLINIA, SALVATORE**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 861 516 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

Oligonucleótidos antisentido para IL-34 y métodos de uso de los mismos

## 5 Antecedentes

La interleucina 34 (IL-34) es un factor estimulante de colonias de macrófagos que se superpone funcionalmente a las citocinas recientemente descubierto (M-CSF, también conocido como MCSF1 y MCSF-1), un mediador de inflamación y osteoclastogénesis en enfermedades degenerativas óseas como la artritis reumatoide. Las enfermedades inflamatorias, tanto agudas como crónicas, son una categoría importante de enfermedades que aún no se comprende completamente.

Por ejemplo, la enfermedad inflamatoria intestinal es un trastorno inflamatorio crónico del tracto gastrointestinal que sufren aproximadamente 1,4 millones de pacientes en los Estados Unidos. Es una de las cinco enfermedades gastrointestinales más prevalentes en los Estados Unidos, con un costo total de atención médica de más de \$ 1.700 millones de dólares. Cada año en los Estados Unidos, la enfermedad inflamatoria intestinal representa más de 700.000 visitas médicas, 100.000 hospitalizaciones y discapacidad en 119.000 pacientes. Actualmente, no existe una cura médica, por lo que el manejo de la enfermedad requiere cuidados de por vida. Se han utilizado anticuerpos contra IL-34 para tratar la colitis experimental (consultar Takuya Yoshino et al., IL-34 Antibody Ameliorates Experimental Colitis by Alternating IL-12p40 Expression in Macrophages, Gastroenterology 148 (4): S-8 (2015)).

Las dos formas más comunes de enfermedad inflamatoria intestinal son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Aunque la enfermedad de Crohn puede afectar todo el tracto gastrointestinal, afecta principalmente al íleon (la porción distal o inferior del intestino delgado) y al intestino grueso. La colitis ulcerosa afecta principalmente al colon y al recto. La etiología de la enfermedad inflamatoria intestinal no se comprende completamente, aunque se cree que tanto los factores ambientales como los genéticos juegan un papel en la enfermedad. Los componentes ambientales pueden incluir alteraciones en la flora intestinal que se ven afectadas por la exposición a los alimentos y medicamentos ingeridos.

La enfermedad inflamatoria intestinal está asociada con dolor abdominal, vómitos, diarrea, sangrado rectal, calambres severos, espasmos musculares, pérdida de peso, desnutrición, fiebre y anemia. Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal también pueden sufrir lesiones cutáneas, dolor en las articulaciones, inflamación de los ojos y trastornos hepáticos, y los niños que padecen colitis ulcerosa pueden sufrir defectos de crecimiento. Aunque rara vez son fatales, estos síntomas disminuyen la calidad de vida de los pacientes.

Por tanto, existe una necesidad imperiosa de desarrollar métodos confiables para el tratamiento de trastornos inflamatorios tales como la enfermedad inflamatoria intestinal. Existe una necesidad adicional de identificar métodos de tratamiento que proporcionen un alivio efectivo y permanente de los síntomas en un amplio espectro de pacientes y que no estén asociados con efectos secundarios negativos o ciclos de inflamación y remisión.

## 40 Resumen

En el presente documento se describen oligonucleótidos antisentido contra IL-34. La invención proporciona un oligonucleótido antisentido contra IL-34 que incluye la secuencia de oligonucleótidos antisentido de 5'-agctgctcagtgtaa-3' (SEQ ID NO: 5).

En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido puede ser un oligonucleótido antisentido en el que al menos un enlace nucleósido de la secuencia es un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace fosfotriéster, un enlace alquilfosfonato, un enlace aminoalquilfosfotriéster, un enlace alquilén fosfonato, un enlace fosfinato, un enlace fosforamidato y un enlace aminoalquilfosforamidato, un enlace tiofosforamidato, un enlace tionoalquilfosfonato, un enlace tionoalquilfosfotriéster, un enlace tiofosfato, un enlace selenofosfato o un enlace boranofosfato. En una realización particular, al menos un enlace internucleosídico de la secuencia de oligonucleótidos antisentido es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, todos los enlaces internucleosídicos de la secuencia de oligonucleótidos antisentido son enlaces fosforotioato.

El número de nucleótidos incluidos en los oligonucleótidos antisentido para IL-34 descritos en el presente documento puede variar. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de 22 a 40 nucleótidos. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de 20 a 30, o de 30 a 40 nucleótidos.

También se describen en este documento métodos de tratamiento en los que se administra un oligonucleótido antisentido para IL-34 a un paciente que lo necesita. Por ejemplo, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad inflamatoria, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en el presente documento. También se describe en el presente documento un método para inhibir la producción de citocinas inflamatorias en células de un paciente que

padece una enfermedad inflamatoria, que comprende administrar una cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en el presente documento.

5 También se describe en el presente documento un método para reducir o inhibir una respuesta inflamatoria mediada por IL-34 en células de un paciente que padece una enfermedad inflamatoria, que comprende administrar una cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido para IL-34. También se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad inflamatoria asociada con la expresión alterada de IL-34 en un paciente que lo necesita, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido para IL-34.

10 Los métodos descritos en este documento pueden usarse para tratar enfermedades inflamatorias que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, psoriasis, osteoartritis, diabetes (tipo I y II), rechazo de tejidos u órganos, esclerosis múltiple, inflamación periodontal, periodontitis, sinovitis villonodular pigmentada, hepatitis, sinusitis, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de colon asociado a colitis, cáncer colorrectal esporádico, enfermedad de las arterias coronarias, síndrome de Sjogren (SS), obesidad, inflamación crónica, sarcoidosis pulmonar, lesiones cutáneas, una enfermedad inflamatoria del SNC o una enfermedad autoinmune. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o fibrosis pulmonar idiopática (FPI). En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria intestinal. En algunas realizaciones, la enfermedad intestinal inflamatoria es enfermedad de Crohn, enfermedad de Crohn gastroduodenal, colitis de Crohn (granulomatosa), colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis de derivación, enfermedad de Behçet, colitis microscópica, proctitis ulcerosa, proctosigmoiditis, yeyunoileitis, colitis del lado izquierdo, pancolitis, ileocolitis, ileítis o colitis indeterminada. En realizaciones particulares, la enfermedad intestinal inflamatoria es enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

25 En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido para IL-34 se administra por vía tópica, parenteral, oral, pulmonar, intratraqueal, intranasal, transdérmica o intraduodenal. En una realización particular, el oligonucleótido antisentido para IL-34 se administra por vía oral.

30 En algunas realizaciones, el paciente que necesita tratamiento es un ser humano.

También se describe en el presente documento una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es adecuada para la administración tópica, parenteral, oral, pulmonar, intratraqueal, intranasal, transdérmica o intraduodenal.

35 También se describe en el presente documento un oligonucleótido antisentido para IL-34 para su uso como medicamento.

40 También se describe en el presente documento el uso de un oligonucleótido antisentido para IL-34 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria es enfermedad intestinal inflamatoria, artritis reumatoide, psoriasis, osteoartritis, diabetes (tipo I y II), rechazo de tejido u órgano, esclerosis múltiple, inflamación periodontal, periodontitis, sinovitis villonodular pigmentada, hepatitis, sinusitis, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de colon asociado a colitis, cáncer colorrectal esporádico, enfermedad de las arterias coronarias o síndrome de Sjogren (SS), obesidad, inflamación crónica, sarcoidosis pulmonar, lesiones cutáneas, una enfermedad inflamatoria del SNC o una enfermedad autoinmune. También se describe en el presente documento el uso de un oligonucleótido antisentido para IL-34 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF). En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria intestinal. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria intestinal es enfermedad de Crohn, enfermedad de Crohn gastroduodenal, colitis de Crohn (granulomatosa), colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis de derivación, enfermedad de Behçet, colitis microscópica, proctitis ulcerosa, proctosigmoiditis, yeyunoileitis, colitis del lado izquierdo, pancolitis, ileocolitis, ileítis o colitis indeterminada.

55 También se describe en el presente documento un oligonucleótido antisentido para IL-34 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria es enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, psoriasis, osteoartritis, diabetes (tipo I y II), rechazo de tejido u órgano, esclerosis múltiple, inflamación periodontal, periodontitis, sinovitis villonodular pigmentada, hepatitis, sinusitis, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de colon asociado a colitis, cáncer colorrectal esporádico, enfermedad de las arterias coronarias o síndrome de Sjogren (SS), obesidad, inflamación crónica, sarcoidosis pulmonar, lesiones cutáneas, una enfermedad inflamatoria del SNC o una enfermedad autoinmune. También se describe en el presente documento el uso de un oligonucleótido antisentido para IL-34 para su uso en el tratamiento de asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF). En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria intestinal. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria intestinal es enfermedad de Crohn, enfermedad de Crohn gastroduodenal, colitis de Crohn (granulomatosa), colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis de derivación, enfermedad de Behçet, colitis microscópica,

proctitis ulcerosa, proctosigmoiditis yeyunoileitis, colitis del lado izquierdo, pancolitis, ileocolitis, ileítis o colitis indeterminada.

5 También se describe en el presente documento un método para tratar o prevenir la fibrosis, por ejemplo, fibrosis intestinal, fibrosis pulmonar o fibrosis hepática, o prevenir la deposición de colágeno, que comprende inhibir la IL-34 en un paciente que padece fibrosis. También se describe en el presente documento un método para tratar o prevenir la fibrosis o prevenir el depósito de colágeno, en el que el método comprende inhibir la IL-34 en una célula, por ejemplo, una célula intestinal. También se describe en el presente documento un método para tratar o prevenir la fibrosis o prevenir la deposición de colágeno en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente una  
10 cantidad eficaz de un inhibidor específico de IL-34, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido contra IL-34.

También se describe en el presente documento el uso de un oligonucleótido antisentido para IL-34 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la fibrosis. En algunas realizaciones, la fibrosis es fibrosis intestinal. En algunas realizaciones, la fibrosis es fibrosis pulmonar. En otras realizaciones, la fibrosis es fibrosis renal, fibrosis  
15 cardíaca, fibrosis endomiocárdica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal o fibrosis sistémica nefrogénica.

También se describe en el presente documento un oligonucleótido antisentido para IL-34 para su uso en el tratamiento de la fibrosis. En algunas realizaciones, la fibrosis es fibrosis intestinal. En algunas realizaciones, la fibrosis es fibrosis pulmonar. En otras realizaciones, la fibrosis es fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis endomiocárdica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal o fibrosis sistémica nefrogénica.  
20

En algunas realizaciones, el paciente que padece fibrosis, por ejemplo, fibrosis intestinal, ha padecido previamente enfermedad inflamatoria intestinal o padece enfermedad inflamatoria intestinal, o enfermedad inflamatoria intestinal precedida de fibrosis intestinal en el paciente. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa.  
25

En algunas realizaciones, el paciente que padece fibrosis intestinal padecía previamente colitis o sufre colitis, o colitis precedida de fibrosis intestinal en el paciente. En algunas realizaciones, la colitis es una colitis aguda. En algunas realizaciones, la colitis es una colitis crónica.  
30

En algunas realizaciones de la invención, el paciente es un mamífero, por ejemplo, un primate, por ejemplo, un ser humano.

Se apreciará que el oligonucleótido antisentido para IL-34 administrado al paciente que tiene fibrosis en los métodos descritos en el presente documento, puede administrarse mediante diversas vías de administración. En varias realizaciones, el oligonucleótido antisentido para IL-34 puede administrarse por una o varias vías, incluidas vía oral, tópica, parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, por inhalación en aerosol o por vía rectal. El término parenteral como se usa en este documento incluye inyecciones subcutáneas, administración intrapancreática y técnicas de inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e intraesternal. En una realización preferida, el oligonucleótido antisentido para IL-34 se puede administrar por vía oral al paciente que tiene fibrosis, por ejemplo, fibrosis intestinal o fibrosis pulmonar.  
35  
40

También se proporcionan métodos que incluyen la administración de un oligonucleótido antisentido para IL-34 capaz de dirigirse al ARN de IL-34 para su degradación, interferir con el empalme de ARN o prevenir la expresión del gen de IL-34 o la traducción de proteínas. Los oligonucleótidos antisentido para IL-34 de la invención y descritos en este documento pueden dirigirse a diversas regiones del ARNm de IL-34 humano para la unión. La secuencia de ARNm de IL-34 humana es la secuencia de la Secuencia de Referencia del NCBI: NM\_001172771.1 (SEQ ID NO: 10), NM\_001172772.1 (SEQ ID NO: 11) o NM\_152456.2 (SEQ ID NO: 12).  
45

La secuencia del oligonucleótido antisentido para IL-34 puede seleccionarse de múltiples secuencias capaces de dirigirse al ARN de IL-34. En algunas realizaciones de la invención, el oligonucleótido antisentido es un fosforotioato de oligonucleótido antisentido, es decir, un oligonucleótido en el que al menos algunos de los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato adecuados para el suministro a células de un paciente. Además, los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden incluir nucleótidos modificados, por ejemplo, nucleótidos que contienen bases modificadas, por ejemplo, 5-metil-2'-desoxicitidina.  
50  
55

También se describe en el presente documento un método para tratar la fibrosis, por ejemplo, la fibrosis intestinal, prevenir la fibrosis intestinal o la fibrosis pulmonar, o prevenir la deposición de colágeno en un paciente que incluye administrar una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor específico de IL-34, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido contra IL-34 y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía parenteral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica incluye un recubrimiento entérico, por ejemplo, un recubrimiento entérico que comprende un copolímero de acrilato de etilo-ácido metacrílico.  
60  
65

Los métodos para tratar la fibrosis (por ejemplo, fibrosis intestinal o fibrosis pulmonar), prevenir la fibrosis (por ejemplo, fibrosis intestinal o fibrosis pulmonar), o prevenir la deposición de colágeno en un paciente incluyen la administración de cantidades variables de un oligonucleótido antisentido contra IL-34, o una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido contra IL-34. Algunas realizaciones incluyen administrar al menos 1 µg, al menos 5 µg, al menos 10 µg, al menos, 20 µg, al menos, 30 µg, al menos, 40 µg, al menos, 50 µg, al menos, 60 µg, al menos al menos, 70 µg, al menos, 80 µg, al menos, 90 o al menos 100 µg del oligonucleótido antisentido. Algunas realizaciones incluyen la administración de 35 mg a 500 mg, de 1 mg a 10 mg, de 10 mg a 20 mg, de 20 mg a 30 mg, de 30 mg a 40 mg, de 40 mg a 50 mg, de 50 mg a 60 mg, de 60 mg a 70 mg, de 70 mg a 80 mg, de 80 mg a 90 mg, de 90 mg a 100 mg, de 100 mg a 150 mg, de 150 mg a 200 mg, de 200 mg a 250 mg, de 250 mg a 300 mg, de 300 mg a 350 mg, de 350 mg a 400 mg, de 400 mg a 450 mg, de 450 mg a 500 mg, de 500 mg a 600 mg, de 600 mg a 700 mg, de 700 mg a 800 mg, de 800 mg a 900 mg, de 900 mg a 1 g, de 1 mg a 50 mg, de 20 mg a 40 mg o de 1 mg a 500 mg del oligonucleótido antisentido.

También se proporciona en el presente documento un método para prevenir o tratar la fibrosis hepática, la fibrosis pulmonar o la fibrosis intestinal, en el que el método comprende administrar a un paciente que lo necesite una preparación farmacéutica que comprende un inhibidor de IL-34, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido para IL-34 tal como un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en el presente documento. También se proporcionan métodos para prevenir o tratar fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal y/o fibrosis sistémica nefrogénica, en el que el método comprende administrar a un paciente que lo necesite una preparación farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido para IL-34 tal como un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en este documento.

#### Breve descripción de los dibujos

La invención se define en las reivindicaciones y cualquiera de las siguientes figuras que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan únicamente con fines comparativos.

La Figura 1A muestra un gráfico de barras de la expresión relativa de ARNm de IL-34 en células HT-29 que se dejaron sin estimular (U), expuestas a lipofectamina (L) o transfectadas con 0,5 µg/ml de un oligonucleótido antisentido para IL-34 (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 como se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 1).

La Figura 1B muestra un gráfico de barras de la expresión relativa del ARNm de IL-34 en células HT-29 que se dejaron sin estimular (U), expuestas a lipofectamina (L) o transfectadas con 1 µg/ml de un oligonucleótido antisentido para IL-34 (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 como se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 1). Figura 1C muestra un gráfico de barras de la expresión relativa del ARNm de IL-34 en células HT-29 que se dejaron sin estimular (U), expuestas a lipofectamina (L) o transfectadas con 2 µg/ml de un oligonucleótido antisentido para IL-34 (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 como se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 1).

La Figura 2A muestra un gráfico de barras de la expresión relativa de ARNm de IL-34 en células mononucleares de sangre periférica normal (PBMC) que se dejaron sin estimular (U), estimuladas con Poli (I:C) (poli) o estimuladas con Poli (I:C) y transfectadas con 0,5 µg/ml de un oligonucleótido antisentido para IL-34 (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 como se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 1).

La Figura 2B muestra un gráfico de barras de la expresión relativa de ARNm de IL-34 en PBMC que se dejaron sin estimular (sin estímulo), estimuladas con Poli (I:C) (poli) o estimuladas con Poli (I:C) y transfectadas con 1 µg/ml de oligonucleótido antisentido para IL-34 (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 como se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 1).

La Figura 2C muestra un gráfico de barras de la expresión relativa del ARNm de IL-34 en PBMC que se dejaron sin estimular (sin estímulo), estimuladas con Poli (I:C) (poli) o estimuladas con Poli (I:C) y transfectadas con 2 µg/mL de oligonucleótido antisentido para IL-34 (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 como se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 1).

La Figura 3 es un gráfico que muestra los niveles de ARNm de IL-34 normalizados en muestras de tejido emparejadas no tumorales (NT) y tumorales (T) de 12 pacientes con CRC esporádico.

La Figura 4A es una serie de micrografías (40x; recuadro 200x) de muestras de tejido de colon no tumoral (NT) y tumoral (T) de pacientes con CRC esporádico sondados con anticuerpo de control de isotipo (IgG, panel superior) o anticuerpo IL-34 (paneles inferiores).

La Figura 4B muestra una cuantificación del número de células positivas para IL-34 en tejido tumoral (T) de un paciente con CRC esporádico en comparación con tejido no tumoral (NT) por campo de alto aumento (hpf) (n = 8 pacientes; NT frente a T, p <0,0001; las barras representan el error estándar de la media (SEM)).

La Figura 4C muestra los resultados de un ELISA realizado en tejido de explante de colon tomado de las áreas no tumorales (NT) y tumorales (T) de 8 pacientes con CRC esporádico para medir los niveles de proteína IL-34 (NT frente a T,  $p = 0,002$ ; las barras representan SEM).

5 La Figura 4D muestra una transferencia Western de extracto de tejido de áreas no tumorales (NT) y tumorales (T) de 5 pacientes con CRC esporádico, sondados con anticuerpos IL-34 y  $\beta$ -actina (transferencia representativa de los resultados de 2 experimentos).

10 La Figura 5A es un gráfico que muestra el efecto sin estimulación (sin estímulo) o estimulación con IL-34 humana recombinante (25 ng/ml, 50 ng/ml o 100 ng/ml) sobre la proliferación de células DLD-1 ( $n = 4$ ; 50 ng/ml frente a sin estímulo,  $p = 0,006$ ; 100 ng/ml frente a sin estímulo,  $p = 0,02$ ; las barras representan SEM).

15 La Figura 5B es un gráfico que muestra el efecto de la estimulación con IL-34 humana recombinante (50 ng/ml, 48 horas) sobre la proliferación de células DLD-1 después de preincubación con inhibidores específicos de ERK1/2 o p38 (PD98059 o SB202190, respectivamente) o vehículo de dimetilsulfóxido (DMSO) ( $n = 4$ ; IL-34 + DMSO frente a DMSO,  $p = 0,01$ ; DMSO frente a IL-34 + SB202190,  $p = 0,01$ ; DMSO + IL-34 frente a PD98059 + IL-34,  $p = 0,006$ ; las barras representan SEM).

20 La Figura 6A es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte celular DLD-1 en muestras no estimuladas (sin estímulo) o muestras tratadas con IL-34 humana recombinante (25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) durante 48 horas ( $n = 4$ ; las barras representan la media  $\pm$  SEM; yoduro de propidio (PI); Anexina V (AV)).

25 Figura 6B es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células DLD-1 en muestras no estimuladas (sin estímulo) o muestras tratadas con IL-34 humana recombinante y/o ligando Fas (FasL) evaluado mediante tinción con PI y/o AV ( $n = 4$ ; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

30 La Figura 6C es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células DLD-1 en muestras no estimuladas (sin estímulo) o muestras tratadas con IL-34 humana recombinante y/o FasL de acuerdo con lo evaluado por tinción con AV solamente ( $n = 4$ ; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

La Figura 6D es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células DLD-1 en muestras no estimuladas (sin estímulo) o muestras tratadas con IL-34 humana recombinante y/o factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) de acuerdo con lo evaluado por tinción con PI y/o AV ( $n = 4$ ; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

35 La Figura 6E es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células DLD-1 en muestras no estimuladas (sin estímulo) o muestras tratadas con IL-34 humana recombinante y/o TNF- $\alpha$  de acuerdo con lo evaluado mediante tinción AV solamente ( $n = 4$ ; IL-34 v. IL34 + TNF $\alpha$ ,  $p = 0,03$ ; TNF $\alpha$  frente a IL34 + TNF $\alpha$ ,  $p = 0,05$ ; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

40 La Figura 7A es una serie de micrografías (200x; recuadro 400x) de muestras de tejido de colon de 3 pacientes de control (CTR) y 3 pacientes con CRC esporádico (CRC) sondados con un anticuerpo de control de isotipo (IgG, panel superior) o un anticuerpo específico del receptor del factor 1 estimulante de colonias de macrófagos (M-CSFR-1; paneles inferiores).

45 La Figura 7B es un gráfico que muestra los niveles de ARNm de M-CSFR-1 normalizados en tejido de colon no tumoral (NT) y tumoral (T) de 6 individuos con CRC esporádico. Los puntos de datos de NT y T en el gráfico del mismo paciente están conectados por líneas. Las barras horizontales representan la mediana de los valores de ARNm de M-CSFR-1 en cada uno de los grupos NT y T (NT frente a T,  $p = 0,01$ ).

50 La Figura 7C es un gráfico que muestra los niveles de ARNm de proteína tirosina fosfatasa zeta (PTP- $\zeta$ ) de tipo receptor normalizados en tejido de colon no tumoral (NT) y tumoral (T) de 6 individuos con CRC esporádico. Los puntos de datos NT y T en el gráfico del mismo paciente están conectados por líneas. Las barras horizontales representan la mediana de los valores de ARNm de PTP- $\zeta$  en cada uno de los grupos NT y T (NT frente a T,  $p = 0,03$ ).

55 La Figura 8A es un gráfico que muestra la proliferación de células DLD-1 en células no estimuladas (sin estímulo) o después de la exposición al factor 1 estimulante de colonias de macrófagos (MCSF-1) a 25 ng/ml, 50 ng/ml o 100 ng/ml ( $n = 11$ ; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

60 La Figura 8B es un gráfico que muestra la proliferación de células DLD-1 en células no estimuladas (sin estímulo) o después de la exposición a IL-34 recombinante humana a 25 ng/ml, 50 ng/ml o 100 ng/ml ( $n = 7$ ; sin estímulo frente a 25 ng/ml,  $p = 0,001$ ; sin estímulo frente a 50 ng/ml,  $p = 0,001$ ; sin estímulo frente a 100 ng/ml,  $p = 0,001$ ; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

65 La Figura 8C es un gráfico que muestra la muerte de células DLD-1 medida por tinción con AV y/o PI en células no estimuladas (sin estímulo) o después de la exposición a MCSF-1 a 25 ng/ml, 50 ng/ml o 100 ng/ml ( $n = 6$ ; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

La Figura 9 es un gráfico que muestra los niveles de expresión de ARNm de IL-34 normalizados en células DLD-1, HT-29, HCT-116 y NCM-460.

5 La Figura 10A es una imagen de una transferencia Western de extractos de células DLD-1 de células transfectadas con un oligonucleótido antisentido de control negativo (AS de NC) o un oligonucleótido antisentido para IL-34 (AS para IL-34) a una concentración de 2 µg/ml durante 48 horas, sondeado con anticuerpo IL-34 o β-actina (imagen representativa de uno de los cuatro experimentos mostrados).

10 La Figura 10B es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte celular en células DLD-1 transfectadas con un oligonucleótido antisentido de control negativo (AS de NC) o un oligonucleótido antisentido IL-34 (AS para IL-34; oligonucleótido antisentido para IL-34 de la SEQ ID NO: 5) a una concentración de 2 µg/ml durante 72 horas, teñido por AV y PI (n = 4; los datos se expresan como la media ± SEM).

15 La Figura 10C es un gráfico que muestra la proliferación celular relativa en células DLD-1 transfectadas con un oligonucleótido antisentido de control negativo (AS de NC) o un oligonucleótido antisentido para IL-34 (AS para IL-34; oligonucleótido antisentido para IL-34 de la SEQ ID NO: 5) en una concentración de 2 µg/ml durante 72 horas, evaluado por citometría de flujo después de la tinción con CFSE (n = 4; AS de NC frente a AS para IL-34, p = 0,01; los datos se expresan como la media ± SEM).

20 La Figura 10D es una imagen de una transferencia Western de extractos de células DLD-1 de células transfectadas con un oligonucleótido antisentido de control negativo (AS de NC) o un oligonucleótido antisentido para IL-34 (AS para IL-34; oligonucleótido antisentido para IL-34 de la SEQ ID NO: 5) a una concentración de 2 µg/ml durante 72 horas, sondeados con anticuerpos contra IL-34, ERK1/2 total (ERK1/2), ERK1/2 fosforilada (pERK1/2) o β-actina (imagen representativa de 4 experimentos).

25 La Figura 11A muestra una serie de micrografías que muestran tejido de colon tumoral (T) y no tumoral (NT) de un paciente con cáncer de colon asociado a colitis, teñido con un anticuerpo M-CSFR-1 (imagen representativa de los resultados de 3 pacientes; aumento de 40x, recuadros con un aumento de 200x).

30 La Figura 11B es un gráfico que muestra los niveles normalizados de ARNm de IL-34 en tejido de colon tumoral (T) y no tumoral (NT) extraído de ratones C57BL/6J de tipo silvestre 84 días después de la exposición al azoximetano (AOM) y la sal sódica de sulfato de dextrano (DSS). Los puntos de datos NT y T de los mismos animales están conectados por líneas. Las barras horizontales en cada columna representan la mediana de los valores de ARNm de IL-34 en los grupos NT y T (NT frente a T, p = 0,01).

35 La Figura 12A es un gráfico que muestra los niveles de expresión de ARNm de IL-34 en tejido de biopsia ileal de pacientes de control (CTR ileal), pacientes con enfermedad de Crohn inflamatoria (CD I) y pacientes con enfermedad de Crohn con fibroestenosis (CD con FS) (CD I frente a CTR ileal, p = 0,002; CD con FS frente a CTR ileal, p = 0,03; n = 5; los datos se expresan como media ± SEM).

40 La Figura 12B muestra una imagen de una transferencia Western que contiene extractos de proteínas de 2 pacientes de control (CTR ileal), 2 pacientes con CD I y 2 pacientes con CD con FS sondados con anticuerpos contra IL-34 y ERK1/2.

45 La Figura 12C es una serie de micrografías (100X) de secciones embebidas en parafina de muestras quirúrgicas intestinales de 1 paciente de control normal (CTR ileal) y 1 paciente que padece CD con FS teñido con un anticuerpo de detección de IL-34 (representativo de imágenes de 3 individuos de CTR ileal y 3 pacientes con CD con FS).

50 Figura 12D es un gráfico que muestra los niveles de expresión de ARNm de IL-34 normalizados en fibroblastos intestinales de 5 pacientes de control (CTR) y 5 pacientes con CD con FS (CTR frente a CD con FS, p = 0,003; los datos se representan como la media ± SEM).

55 La Figura 12E es una imagen de una transferencia Western que contiene extracto de proteína de fibroblastos intestinales de 2 pacientes de CTR y 2 pacientes con CD con FS y sondados con anticuerpos contra IL-34 y β-actina.

La Figura 13A es un gráfico que muestra los niveles de expresión de ARNm de M-CSFR-1 normalizados en tejido de biopsia ileal de 5 pacientes de control normal (CTR ileal), 5 pacientes con CD I y 5 pacientes con CD con FS (CTR ileal frente a CD I, p = 0,03; CTR ileal frente a CD con FS, p = 0,006; los datos se expresan como la media ± SEM).

60 La Figura 13B es una transferencia Western que contiene extractos de proteínas de tejido de biopsia ileal de 2 pacientes de control (CTR ileal), 2 pacientes que padecen CD I y 2 pacientes con CD con FS, y se sondaron con anticuerpos contra M-CSFR-1 y ERK1/2.

La Figura 14A es un gráfico que muestra los niveles normalizados de la cadena alfa 1 de colágeno tipo 1 (Col1A1) en fibroblastos que no se trataron (sin estímulo) o que se expusieron a la proteína IL-34 humana recombinante a una concentración de 50 ng/ml (IL-34) durante 6 horas (n = 4; los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM).

5 La Figura 14B es un gráfico que muestra los niveles normalizados de la cadena alfa 1 de colágeno tipo III (Col3A1) en fibroblastos que se dejaron sin tratar (sin estímulo) o que se expusieron a la proteína IL-34 humana recombinante a una concentración de 50 ng/ml (IL-34) durante 6 horas (sin estímulo frente a IL-34, p = 0,03; n = 4; los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM).

10 La Figura 14C es un gráfico que muestra los niveles de proteína de colágeno en fibroblastos que se dejaron sin tratar (sin estímulo) o que se expusieron a la proteína IL-34 humana recombinante a una concentración de 50 ng/ml (IL-34) durante 48 horas (sin estímulo frente a IL-34, p = 0,01; n = 4; los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM).

Descripción detallada

15 Oligonucleótidos antisentido para IL-34

"Oligonucleótido antisentido", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de oligonucleótidos sintética corta complementaria al ARN mensajero (ARNm), que codifica la proteína diana (por ejemplo, IL-34). Las secuencias de oligonucleótidos antisentido se hibridan con el ARNm produciendo un híbrido de doble cadena que puede conducir a la activación de enzimas catalíticas ubicuas, tales como RNasa H, que degrada las cadenas híbridadas de ADN/ARN evitando así la traducción de proteínas. Los oligonucleótidos antisentido pueden incluir ARN pequeño de horquilla (ARNph), ARN pequeño de interferencia (ARNpi), oligonucleótidos antisentido modificados que incluyen 2'-O-alquilo, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA) o químicas de oligómeros morfolino. Los oligonucleótidos antisentido pueden ser oligonucleótidos monocatenarios o bicatenarios, cuando solo una cadena del oligonucleótido es complementaria a la secuencia diana.

Los oligonucleótidos antisentido se pueden diseñar de manera que la porción de direccionamiento de la secuencia de nucleótidos incorporada de cada oligonucleótido antisentido sea completa o casi completamente complementaria a la secuencia de ARNm de IL-34 o la secuencia de ARNm de un compañero de interacción de IL-34. La incorporación de tales secuencias de nucleótidos complementarias o casi complementarias permite diseñar oligonucleótidos antisentido con un alto grado de especificidad para una diana dada. La especificidad puede evaluarse mediante la medición de parámetros tales como la constante de disociación u otros criterios tales como cambios en los niveles de expresión de proteínas o ARN u otros ensayos que miden la actividad o expresión de IL-34.

Un oligonucleótido antisentido para IL-34, tal como se describe en este documento, puede ser una secuencia de oligonucleótidos de 5 a 100 oligonucleótidos de longitud, por ejemplo, de 10 a 40 oligonucleótidos de longitud, por ejemplo, de 14 a 40 oligonucleótidos de longitud, de 10 a 30 oligonucleótidos de longitud, por ejemplo, de 14 a 30 oligonucleótidos de longitud, por ejemplo, de 14 a 25 o de 15 a 22 oligonucleótidos de longitud. Un oligonucleótido antisentido para IL-34 puede ser una secuencia de oligonucleótidos complementaria a una porción de la secuencia de ARNm de IL-34.

En la presente invención, un oligonucleótido antisentido contra IL-34 comprende una secuencia de 5'-AGCTGCTCAGTGTGAA-3' (SEQ ID NO: 5).

En una realización, al menos uno o más enlaces internucleosídicos de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 pueden tener un enlace modificado, tal como un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace fosfotriéster, un enlace alquilfosfonato, un enlace aminoalquilfosfotriéster, un enlace alquilen fosfonato, un enlace fosfinato, un enlace fosforamidato y un enlace aminoalquilfosforamidato, un enlace tiofosforamidato, un enlace tionoalquilfosfonato, un enlace tionoalquilfosfotriéster, un enlace tiofosfato un enlace selenofosfato y/o un enlace boranofosfato. Por ejemplo, en algunas realizaciones, uno, dos o más, por ejemplo, todos los enlaces internucleosídicos de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 pueden ser enlaces fosforotioato.

En realizaciones particulares, el oligonucleótido antisentido contra IL-34 es un oligonucleótido antisentido de fosforotioato contra IL-34, que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 5 (5'-AGCTGCTCAGTGTGAA-3'), en la que cada enlace internucleosídico del oligonucleótido antisentido es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido contra IL-34 es un oligonucleótido antisentido fosforotioato contra IL-34, que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 5 (5'-AGCTGCTCAGTGTGAA-3'), en la que uno o más de los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido antisentido son enlaces fosforotioato.

Se contempla que en una realización alternativa, un oligonucleótido antisentido divulgado que se dirige a IL-34 puede tener opcionalmente al menos una nucleobase modificada, por ejemplo, 5-metilcitosina, y/o al menos un nucleótido metilfosfonato en la secuencia, que se coloca, por ejemplo, en sólo uno de los extremos 5' o 3' o en ambos extremos 5' y 3' o a lo largo de la secuencia de oligonucleótidos.

65

Los oligonucleótidos antisentido para IL-34 contemplados pueden incluir opcionalmente al menos un azúcar modificado. Por ejemplo, la fracción de azúcar de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es una ribosa en la que el grupo 2'-OH puede ser reemplazado por cualquiera seleccionado del grupo que consiste en OR, R, R'OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NR<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN, F, Cl, Br e I (en el que R es un alquilo o arilo y R' es un alquileo).

5 Enfermedades autoinmunes e inflamatorias

La divulgación contempla, en parte, el tratamiento de trastornos inflamatorios relacionados con las actividades de IL-34 en un paciente que lo necesita, que comprende administrar un compuesto antisentido divulgado. En el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un paciente que lo necesita, que comprenden administrar un compuesto antisentido descrito. En algunas realizaciones de la divulgación, se puede administrar una cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 a un paciente que lo necesite para tratar una enfermedad inflamatoria, por ejemplo, para inhibir la producción de citocinas inflamatorias en las células de un paciente que padece una enfermedad inflamatoria y/o para reducir o inhibir una respuesta inflamatoria mediada por IL-34.

"Enfermedad inflamatoria", como se usa en este documento, se refiere a una serie de trastornos inflamatorios agudos y crónicos que incluyen, entre otros, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, psoriasis, osteoartritis, diabetes (tipo I y II), rechazo de tejidos u órganos, esclerosis múltiple, inflamación periodontal (por ejemplo, periodontitis), sinovitis villonodular pigmentada, hepatitis, sinusitis, cáncer de colon, enfermedad de las arterias coronarias o síndrome de Sjogren (SS), obesidad, inflamación crónica, sarcoidosis pulmonar, lesiones cutáneas, enfermedad inflamatoria del SNC o una enfermedad autoinmune.

Se proporcionan métodos para tratar lesiones cutáneas asociadas con el lupus en pacientes que lo necesitan, que comprenden la administración de un compuesto descrito. En algunas realizaciones, el tratamiento de lesiones cutáneas asociadas con el lupus comprende al menos un efecto seleccionado entre reducir el número de lesiones cutáneas, reducir la velocidad de formación de lesiones cutáneas y reducir la gravedad de las lesiones cutáneas. Se proporcionan métodos para tratar el lupus y/o la nefritis lúpica a pacientes que lo padecen, que incluyen la administración de un compuesto antisentido descrito. Se proporcionan métodos para ralentizar la progresión de una enfermedad renal asociada con el lupus.

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar, reducir el riesgo de desarrollar o retrasar la aparición de una enfermedad inflamatoria del SNC en un sujeto que lo necesita, que comprenden la administración de un compuesto descrito. Los métodos incluyen, por ejemplo, tratar a un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria del SNC; por ejemplo, administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antisentido para IL-34 descrito. Las enfermedades inflamatorias del SNC que pueden tratarse de esta manera incluyen esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune experimental, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Parkinson.

También se proporcionan en el presente documento métodos para tratar, reducir el riesgo de desarrollar o retrasar la aparición de una enfermedad autoinmune en un sujeto que lo necesita, que comprenden la administración de un compuesto descrito. Los métodos incluyen tratar a un sujeto con o en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune. Las enfermedades autoinmunes que se pueden tratar de esta manera incluyen artritis reumatoide, diabetes de tipo I, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar idiopática.

45 Enfermedad inflamatoria intestinal

La presente divulgación también proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal a un paciente que lo necesita, que comprenden la administración de un compuesto divulgado. "Enfermedad inflamatoria intestinal", como se usa en este documento, se refiere a una serie de enfermedades inflamatorias crónicas que incluyen enfermedad de Crohn, enfermedad de Crohn gastroduodenal, colitis de Crohn (granulomatosa), colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis de derivación, enfermedad de Behçet, colitis microscópica, proctitis ulcerosa, proctosigmoiditis, yeyunoileítis, colitis del lado izquierdo, pancolitis, ileocolitis, ileítis y colitis indeterminada. La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son las dos formas más comunes de enfermedad inflamatoria intestinal. La enfermedad inflamatoria intestinal es una enfermedad autoinmune del sistema digestivo. La enfermedad de Crohn puede localizarse en cualquier parte del tracto gastrointestinal, incluido el íleon terminal, y puede afectar a todos los tipos de células del tracto gastrointestinal. La colitis ulcerosa se localiza en el colon y el recto y afecta únicamente a las células de la mucosa.

Se cree que tanto los factores ambientales como los genéticos juegan un papel en la enfermedad inflamatoria intestinal, aunque la identidad de dichos factores no está bien definida. Los componentes ambientales pueden incluir alteraciones en la flora intestinal que se ven afectadas por la exposición a los alimentos y medicamentos ingeridos.

La enfermedad inflamatoria intestinal está asociada con síntomas que incluyen dolor abdominal, vómitos, diarrea, sangrado rectal, calambres severos, espasmos musculares, pérdida de peso, desnutrición, fiebre, anemia, lesiones cutáneas, dolor articular, inflamación ocular, trastornos hepáticos, artritis, pioderma gangrenoso, colangitis esclerosante primaria y síndrome de enfermedad no tiroidea, y el tratamiento de estos síntomas usando un compuesto

antisentido descrito también se contempla en una realización, por ejemplo, el tratamiento de niños que padecen colitis ulcerosa que también pueden sufrir defectos de crecimiento.

Fibrosis intestinal

5 La fibrosis intestinal comúnmente resulta de la reacción del tejido intestinal a la inflamación, tal como la inflamación crónica causada por la EII. En la EII, los niveles elevados de SMAD7 bloquean la expresión de genes antiinflamatorios mediada por la activación de la vía TGF- $\beta$  y la fosforilación de Smad2/3. Los miofibroblastos expuestos a un aumento de la señalización de TGF- $\beta$  producen mayores cantidades de colágeno. En el contexto de la enfermedad de Crohn, la inflamación persistente y crónica promueve procesos fibróticos, lo que resulta en la formación de estenosis, incluidas estenosis del intestino delgado y del colon.

15 La fibrosis intestinal puede identificarse mediante cualquiera de varias técnicas de formación de imágenes, tal como la ecografía mejorada por contraste. Véase, por ejemplo, Quaiia et al. The value of small bowel wall contrast enhancement after sulfur hexafluoride-filled microbubble injection to differentiate inflammatory from fibrotic strictures in patients with Crohn's disease. *Ultrasound Med. Biol.* 38, 1324-1332 (2012); Nylund et al. Quantitative contrast-enhanced ultrasound comparison between inflammatory and fibrotic lesions in patients with Crohn's disease. *Ultrasound Med. Biol.* 39, 1197-1206 (2013); Stidham et al. Ultrasound elasticity imaging for detecting intestinal fibrosis and inflammation in rats and humans with Crohn's disease. *Gastroenterology* 141, 819-826 (2011). También se pueden utilizar técnicas de IRM tales como IRM de transferencia de magnetización. Véase, por ejemplo, Maccioni et al. Value of T2-weighted magnetic resonance imaging in the assessment of wall inflammation and fibrosis in Crohn's disease. *Abdom. Imaging* 37, 944-957 (2012); Adler et al. Magnetization transfer helps detect intestinal fibrosis in an animal model of Crohn disease. *Radiology* 259, 127-135 (2011); Pazahr et al. Magnetization transfer for the assessment of bowel fibrosis in patients with Crohn's disease: initial experience. *Magn. Reson. Mat. Phys. Biol. Med.* 26, 291-301 (2013).

Fibrosis

30 Los métodos para prevenir o tratar la fibrosis, tales como fibrosis hepática, fibrosis pulmonar y/o fibrosis intestinal, forman parte de esta descripción. Dichos métodos pueden comprender administrar a un paciente que lo necesite o un paciente en riesgo, una preparación farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido para IL-34 tal como un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en este documento. Por ejemplo, se proporciona un método para prevenir o tratar la fibrosis hepática que comprende administrar a un paciente que lo necesite un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en el presente documento. Alternativamente, se proporciona un método para prevenir o tratar la fibrosis intestinal que comprende administrar a un paciente que lo necesite un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en este documento. Alternativamente, se proporciona un método para prevenir o tratar la fibrosis pulmonar que comprende administrar a un paciente que lo necesite un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en el presente documento.

40 Los pacientes tratados usando un método anterior pueden tener o no fibrosis detectable. En algunas realizaciones, el paciente tiene al menos aproximadamente un 5%, 10%, 20%, 30%, 40% o incluso 50% o más de reducción en la cantidad de fibrosis presente en el paciente después de administrar un oligonucleótido antisentido para IL-34, después, por ejemplo de 1 día, 2 días, 1 semana, 1 mes o 6 meses o más. La administración de tal oligonucleótido antisentido para IL-34 puede realizarse, por ejemplo, al menos diariamente. El compuesto se puede administrar por vía oral. El retraso de la manifestación clínica de la fibrosis en un paciente como consecuencia de la administración de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en este documento puede ser al menos, por ejemplo, 6 meses, 1 año, 18 meses o incluso 2 años o más en comparación con un paciente al que no se le ha administrado un oligonucleótido antisentido para IL-34 tal como el que se describe en el presente documento.

50 Un paciente que lo necesite puede tener fibrosis hepática que se ha convertido en cirrosis. Un paciente en riesgo de fibrosis hepática puede incluir aquellos pacientes con hepatitis B, hepatitis C o esteatohepatitis no alcohólica (NASH). NASH está incluida en el espectro de enfermedades del hígado graso no alcohólico, incluidas la esteatosis y la cirrosis. NASH es un componente del síndrome metabólico, que se caracteriza por obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y dislipidemia, y eventualmente puede conducir a carcinoma hepatocelular.

55 También se proporcionan métodos para tratar trastornos asociados con la fibrosis hepática, tales como el tratamiento de al menos una de: ciertas enfermedades de almacenamiento y errores innatos del metabolismo, tales como deficiencia de alfa 1-antitripsina, enfermedades de almacenamiento de cobre (por ejemplo, enfermedad de Wilson), fructosemia, galactosemia, enfermedades por almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, tipos III, IV, VI, IX y X), síndromes de sobrecarga de hierro (por ejemplo, hemocromatosis), anomalías lipídicas (por ejemplo, enfermedad de Gaucher), trastornos peroxisomales (por ejemplo, síndrome de Zellweger) y tirosinemia; infecciones bacterianas (por ejemplo, brucelosis); infecciones parasitarias (por ejemplo, equinococosis); NASH; infecciones virales (por ejemplo, hepatitis B o hepatitis C, incluyendo hepatitis B o C crónica); Síndrome de Budd-Chiari; insuficiencia cardíaca; enfermedad hepática venooclusiva; y trombosis de la vena porta. También se contemplan métodos para tratar la fibrosis hepática congénita. La composición se puede administrar por vía oral.

El abuso de drogas y/o alcohol se ha implicado en casos de fibrosis hepática. En el presente documento se contemplan métodos para tratar la fibrosis hepática en un paciente con antecedentes de abuso de drogas y/o alcohol. Por ejemplo, un paciente con antecedentes de abuso de al menos uno de los siguientes: alcohol, amiodarona, clorpromazina, isoniazida, metotrexato, metildopa, oxifenisatina y tolbutamida.

Un paciente con riesgo de fibrosis intestinal puede incluir aquellos pacientes con colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad de Crohn. Un paciente en riesgo también puede incluir aquellos pacientes con una edad temprana en el momento del diagnóstico de enfermedad de Crohn o colitis, enfermedad colónica extensa y/o severa, pacientes con la presencia de colangitis esclerosante primaria y/o pacientes con antecedentes familiares de cáncer.

También se proporcionan métodos para tratar trastornos asociados con la fibrosis intestinal, tales como el tratamiento de al menos uno de: colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad de Crohn.

En el presente documento se contemplan métodos para prevenir o tratar la fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal o fibrosis sistémica nefrogénica, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite, una preparación farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido para IL-34 tal como un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en el presente documento.

Los oligonucleótidos antisentido para IL-34 de la invención se pueden usar solos o en combinación entre sí cuando al menos dos oligonucleótidos antisentido para IL-34 de la invención se usan juntos en una composición única o como parte de un régimen de tratamiento. Los oligonucleótidos antisentido para IL-34 de la invención también pueden usarse en combinación con otros fármacos para el tratamiento del abuso de fármacos y/o alcohol, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal o fibrosis sistémica nefrogénica, abuso de drogas y/o alcohol.

#### Tratamiento y evaluación

Un "paciente", como se describe en el presente documento, se refiere a cualquier animal en riesgo de padecer o diagnosticado de una enfermedad inflamatoria, incluidos, entre otros, mamíferos, primates y humanos. En determinadas realizaciones, el paciente puede ser un mamífero no humano tal como, por ejemplo, un gato, un perro o un caballo. Un paciente puede ser un individuo diagnosticado con un alto riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria, alguien a quien se le ha diagnosticado una enfermedad inflamatoria, alguien que previamente padeció una enfermedad inflamatoria o un individuo evaluado por síntomas o indicaciones de una enfermedad inflamatoria, por ejemplo, señal de expresión de IL-34.

"Un paciente necesitado", como se usa en el presente documento, se refiere a un paciente que padece cualquiera de los síntomas o manifestaciones de una enfermedad inflamatoria, un paciente que puede sufrir cualquiera de los síntomas o manifestaciones de una enfermedad inflamatoria, o cualquier paciente que podría beneficiarse de un método de la divulgación para tratar una enfermedad inflamatoria. Un paciente necesitado puede incluir un paciente al que se le diagnostica un riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria, un paciente que ha sufrido una enfermedad inflamatoria en el pasado o un paciente que ha sido tratado previamente por una enfermedad inflamatoria. Son de particular relevancia los individuos que padecen una enfermedad inflamatoria asociada con niveles elevados de expresión o actividad de IL-34.

Los términos "tratar", "tratamiento", "que se trata" y similares se utilizan en este documento para significar en general la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curar parcial o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" como se usa en este documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado por tenerla; (b) inhibir la enfermedad, es decir, evitar que la enfermedad aumente en gravedad o alcance; (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar una mejora parcial o completa de la enfermedad; o (d) prevenir la recaída de la enfermedad, es decir, evitar que la enfermedad vuelva a un estado activo después de un tratamiento previo exitoso de los síntomas de la enfermedad o el tratamiento de la enfermedad.

"Cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un agente que es suficiente para tratar al menos parcialmente una afección cuando se administra a un paciente. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo de la gravedad de la afección, la vía de administración del componente y la edad, peso, etc. del paciente que está siendo tratado. Por consiguiente, una cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 es la cantidad del oligonucleótido antisentido para IL-34 necesaria para tratar una enfermedad inflamatoria en un paciente de manera que la administración del agente previene que se produzca una enfermedad inflamatoria en un sujeto, previene una progresión de la enfermedad inflamatoria (por ejemplo, previene la aparición o el aumento de la gravedad de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal tal como hemorragia rectal, anemia o inflamación

gastrointestinal), o alivia o mejora completamente todos los síntomas asociados de una enfermedad inflamatoria, es decir, provoca la regresión de la enfermedad.

5 La eficacia del tratamiento puede evaluarse mediante la evaluación de síntomas generales asociados con una enfermedad inflamatoria, análisis de histología tisular, ensayo bioquímico, métodos de formación de imágenes tales como, por ejemplo, formación de imágenes por resonancia magnética u otros métodos conocidos. Por ejemplo, la eficacia del tratamiento puede evaluarse analizando los síntomas generales de la enfermedad, tales como cambios en el dolor abdominal, vómitos, diarrea, sangrado rectal, calambres, espasmos musculares, pérdida de peso, desnutrición, fiebre, anemia u otros aspectos de la patología general asociada con una enfermedad inflamatoria  
10 después de la administración de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 a un paciente que padece una enfermedad inflamatoria.

15 La eficacia del tratamiento también puede evaluarse a nivel tisular o celular, por ejemplo, mediante la obtención de una biopsia de tejido (por ejemplo, una biopsia de tejido gastrointestinal) y la evaluación de la morfología o las propiedades de tinción generales del tejido o la célula. También pueden usarse ensayos bioquímicos que examinan la expresión de proteínas o ARN para evaluar la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, se pueden evaluar IL-34, IL-6, IL-8, TNF-alfa, o niveles de otra proteína o producto génico indicativos de una enfermedad inflamatoria, producción de citocinas inflamatorias o una respuesta inflamatoria mediada por IL-34 en células disociadas o tejido no disociado mediante métodos inmunocitoquímicos, inmunohistoquímicos, de transferencia Western o transferencia Northern, o  
20 métodos útiles para evaluar los niveles de ARN tales como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o semicuantitativa. También se puede evaluar la presencia o el nivel de expresión de biomarcadores útiles encontrados en materia fecal, plasma o suero para evaluar el estado de la enfermedad y la eficacia del tratamiento.

25 Al evaluar la eficacia del tratamiento, se pueden elegir controles adecuados para asegurar una evaluación válida. Por ejemplo, se pueden comparar los síntomas evaluados en un paciente con una enfermedad inflamatoria después de la administración de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 con esos síntomas en el mismo paciente antes del tratamiento o en un punto anterior en el curso del tratamiento o en otro paciente no diagnosticado con la enfermedad inflamatoria. Alternativamente, se pueden comparar los resultados del análisis bioquímico o histológico del tejido gastrointestinal después de la administración de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 con los  
30 del tejido gastrointestinal del mismo paciente o de un individuo no diagnosticado con la enfermedad inflamatoria o del mismo paciente antes de la administración del oligonucleótido antisentido para IL-34. Además, se pueden comparar muestras de sangre, suero, células o heces después de la administración del oligonucleótido antisentido para IL-34 con muestras comparables de un individuo no diagnosticado con la enfermedad inflamatoria o del mismo paciente antes de la administración del oligonucleótido antisentido para IL-34.

35 La validación de la inhibición de IL-34 puede determinarse mediante evaluación directa o indirecta de los niveles de expresión o actividad de IL-34. Por ejemplo, se pueden usar ensayos bioquímicos que miden la expresión de ARN o proteína IL-34 para evaluar la inhibición total de IL-34. Por ejemplo, se pueden medir los niveles de proteína IL-34 en el tejido gastrointestinal mediante transferencia Western para evaluar los niveles generales de IL-34. También se  
40 pueden medir los niveles de ARNm de IL-34 mediante transferencia Northern o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para determinar la inhibición total de IL-34. También se pueden evaluar los niveles de proteína IL-34 o los niveles de otra proteína indicativos de la actividad de señalización de IL-34 en células disociadas, tejido no disociado, sangre, suero o materia fecal mediante métodos inmunocitoquímicos o inmunohistoquímicos.

45 La inhibición de IL-34 también se puede evaluar indirectamente midiendo parámetros tales como la generación o proliferación de macrófagos o monocitos, o midiendo alteraciones en otros parámetros correlacionados con cambios en la actividad de IL-34, incluida la fosforilación de MAP quinasa y otros indicadores de activación de señalización del receptor de IL-34, el receptor del factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSFR-1, también conocido como MCSFR-1, M-CSFR1 y CSF1R). Por ejemplo, se pueden medir los niveles de fosforilación de MAPK1 o MAPK3  
50 activa en células de un paciente tratado con un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 como una indicación de la actividad de IL-34 en dichas células. También se puede evaluar la presencia o el nivel de expresión de biomarcadores útiles que se encuentran en plasma, sangre, materia fecal o tejido para evaluar la eficacia de la inhibición de IL-34.

55 Los métodos de tratamiento descritos en este documento incluyen métodos para inhibir la producción de citocinas inflamatorias. "Producción de citocinas inflamatorias" se refiere a la expresión de citocinas que inician y/o promueven una respuesta de citocinas inflamatorias. Una "respuesta inflamatoria de citocinas" se refiere a una respuesta inmune que puede caracterizarse por reclutamiento de granulocitos, reclutamiento de linfocitos, inflamación sistémica (especialmente del tracto gastrointestinal o una porción o porciones del mismo), fiebre, destrucción de tejidos, choque  
60 y/o muerte. Una respuesta inflamatoria de citocinas puede caracterizarse por la unión de citocinas individuales a su receptor de superficie celular afin (por ejemplo, unión de IL-34 a CSF1R) y cascadas posteriores de señalización intracelular que alteran las funciones celulares y la expresión génica. Las citocinas inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, IL-1, IL-6, IL-8, IL-34 y TNF-alfa. La expresión de citocinas inflamatorias puede ocurrir en, por ejemplo, macrófagos, monocitos, células mononucleares de la lámina propia u otras células del tracto gastrointestinal o células del sistema inmunológico. Los métodos para inhibir la producción de citocinas inflamatorias incluyen métodos que  
65 reducen los niveles de expresión de algunas o todas las citocinas inflamatorias en un paciente que padece una

enfermedad inflamatoria. Los métodos para inhibir la producción de citocinas inflamatorias también incluyen métodos que reducen los niveles de expresión de algunas o todas las citocinas inflamatorias en las células de un paciente que padece una enfermedad inflamatoria.

5 Los métodos de la divulgación para inhibir la producción de citocinas inflamatorias incluyen métodos para reducir o inhibir una respuesta inflamatoria mediada por IL-34. Una "respuesta inflamatoria mediada por IL-34", como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta inflamatoria iniciada, facilitada o promovida por la expresión de IL-34 o la actividad de señalización de IL-34. Una respuesta inflamatoria mediada por IL-34 puede dar como resultado la expresión de citocinas inflamatorias que incluyen, pero no se limitan a, IL-34, IL-6, IL-8 o TNF-alfa, y activación de la  
10 señalización de citocinas inflamatorias. Además, una respuesta inflamatoria mediada por IL-34 puede caracterizarse por reclutamiento de granulocitos, reclutamiento de linfocitos, inflamación sistémica (especialmente del tracto gastrointestinal o una porción o porciones del mismo), fiebre, destrucción de tejidos, choque y/o muerte. Una respuesta inflamatoria mediada por IL-34 también puede caracterizarse por la activación de la señalización de IL-34, por ejemplo, la unión de IL-34 a CSF1R y la fosforilación de MAP quinasas secuencia abajo. Reducir o inhibir una respuesta  
15 inflamatoria mediada por IL-34 se refiere a aliviar todos y cada uno de los cambios celulares y sistémicos asociados con una respuesta inflamatoria mediada por IL-34. Por ejemplo, una reducción en la producción de citocinas inflamatorias, el reclutamiento de células inmunes o la inflamación de los tejidos indicaría una reducción o inhibición de una respuesta inflamatoria mediada por IL-34.

20 La divulgación también proporciona métodos para inhibir IL-34 en células de un paciente que padece una enfermedad inflamatoria. La IL-34 puede inhibirse en cualquier célula en la que se produzca la expresión o la actividad de IL-34, incluidas las células del tracto gastrointestinal, el sistema inmunológico y la sangre. Las células del tracto gastrointestinal (incluidas las células del estómago, el duodeno, el yeyuno, el íleon, el colon, el recto y el canal anal) incluyen células epiteliales columnares, células epiteliales mucosas, células cimógenas, células mucosas del cuello,  
25 células parietales, células de gastrina, células caliciformes, células de paneth, células de oligomucus y células absortivas de vellosidades. Las células del sistema inmunológico incluyen leucocitos, fagocitos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas), monocitos, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células asesinas naturales, células innatas, linfocitos, células B y células T. Las células sanguíneas incluyen glóbulos rojos (eritrocitos) y glóbulos blancos (leucocitos, monocitos y plaquetas).

30 Composiciones farmacéuticas y vías de administración

La presente divulgación también proporciona métodos para tratar una enfermedad inflamatoria mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34.  
35 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. La composición farmacéutica puede estar compuesta por un oligonucleótido antisentido descrito que se dirige a IL-34 y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en este documento, el término "composición farmacéutica" significa, por ejemplo, una mezcla que contiene una cantidad especificada de un compuesto terapéutico, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz, de un compuesto terapéutico en un  
40 vehículo farmacéuticamente aceptable para ser administrado a un mamífero, por ejemplo, un ser humano, para tratar una enfermedad inflamatoria. En algunas realizaciones, en el presente documento se contemplan composiciones farmacéuticas que comprenden un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria. "Medicamento", como se usa en este  
45 documento, tiene esencialmente el mismo significado que el término "composición farmacéutica".

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa tampones, vehículos y excipientes adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. El  
50 vehículo o vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de las formulaciones y no perjudiciales para el receptor. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen tampones, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía oral e incluye un recubrimiento entérico adecuado para regular el sitio de absorción de las sustancias encapsuladas dentro del sistema digestivo o intestino. Por ejemplo, un recubrimiento entérico puede incluir un copolímero de acrilato de etilo-ácido metacrílico.

En una realización, un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 y cualquier composición farmacéutica del mismo pueden administrarse por una o varias vías, incluyendo tópica, parenteral, oral, pulmonar, intratraqueal, intranasal, transdérmica o intraduodenal. El término parenteral, como se usa en este documento, incluye inyecciones subcutáneas, administración intrapancreática, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal o técnicas de infusión. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 puede administrarse subcutáneamente a un sujeto. En otro ejemplo, un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 puede administrarse  
65 por vía oral a un sujeto. En otro ejemplo, un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 puede administrarse

directamente al sistema gastrointestinal, o regiones específicas del sistema gastrointestinal (por ejemplo, el íleon, colon o recto) mediante administración parenteral.

5 Las composiciones farmacéuticas que contienen un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34, tal como los descritos en este documento, pueden presentarse en una forma unitaria de dosificación y pueden prepararse mediante cualquier método adecuado. Se debe formular una composición farmacéutica para que sea compatible con su vía de administración prevista. Pueden prepararse formulaciones útiles mediante métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (Mack Publishing Company, 1990).

10 Las formulaciones farmacéuticas, por ejemplo, son estériles. La esterilización se puede lograr, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización por filtración puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución.

#### Administración parenteral

15 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden formularse para administración parenteral, por ejemplo, formularse para inyección a través de las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, intralesional o intraperitoneal. La preparación de una composición acuosa, tal como una composición farmacéutica acuosa que contiene un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34, será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Típicamente, tales composiciones se pueden preparar como inyectables, tal como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para usar para preparar soluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección; y las preparaciones también se pueden emulsionar.

20 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen 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 para que sea fácilmente inyectable. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

25 Se pueden preparar soluciones de compuestos activos tales como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezcladas de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. Además, se pueden emplear aceites fijos estériles tales como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden utilizar ácidos grasos tal como el ácido oleico en la preparación de inyectables. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, tal como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer, U.S.P., y la solución isotónica de cloruro de sodio. En una realización, un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 puede suspenderse en un fluido portador que comprende carboximetilcelulosa de sodio al 1% (p/v) y TWEEN<sup>MR</sup> 80 al 0,1 % (v/v). En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

30 Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. 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. Las soluciones inyectables estériles de la divulgación se pueden preparar incorporando un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 en la cantidad requerida del disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro retenedor de bacterias.

35 También se contempla la preparación de más soluciones altamente concentradas para inyección intramuscular. A este respecto, se prefiere el uso de DMSO como disolvente ya que esto dará como resultado una penetración extremadamente rápida, liberando altas concentraciones del oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 para un área pequeña.

40 Los conservantes adecuados para usar en tal solución incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Los tampones adecuados incluyen ácido bórico, bicarbonato de sodio y potasio, boratos de sodio y potasio, carbonato de sodio y potasio, acetato de sodio, bifosfato de sodio y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH entre aproximadamente pH 6 y pH 8, y por ejemplo, entre aproximadamente pH 7 y pH 7,5. Los agentes de tonicidad adecuados son dextrano 40, dextrano 70, dextrosa, glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro de sodio y similares, de manera que el equivalente de cloruro de sodio de la solución está en el intervalo de 0,9 más o menos 0,2%. Los antioxidantes y estabilizadores adecuados incluyen bisulfito de sodio,

metabisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, tiourea y similares. Los agentes humectantes y clarificantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol. Los agentes que aumentan la viscosidad adecuados incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, vaselina, polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares.

#### Administración oral

En algunas realizaciones, se contemplan en el presente documento composiciones adecuadas para la administración oral de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34, por ejemplo, tabletas que incluyen un recubrimiento entérico, por ejemplo, un recubrimiento gastrorresistente, de modo que las composiciones pueden administrar el oligonucleótido antisentido para IL-34, por ejemplo, al tracto gastrointestinal de un paciente. Por ejemplo, tal administración puede dar como resultado un efecto tópico, aplicando sustancialmente por vía tópica el oligonucleótido antisentido para IL-34 directamente a una parte afectada del tracto gastrointestinal de un paciente. Tal administración, en algunas realizaciones, puede evitar sustancialmente la absorción sistémica no deseada del oligonucleótido antisentido para IL-34.

Por ejemplo, se proporciona un comprimido para administración oral que comprende gránulos (por ejemplo, está formado al menos parcialmente a partir de gránulos) que incluyen un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido para IL-34, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido representado por la SEQ ID NO: 1 y excipientes farmacéuticamente aceptables. Un comprimido de este tipo puede recubrirse con un recubrimiento entérico. Los comprimidos contemplados pueden incluir excipientes farmacéuticamente aceptables tales como rellenos, aglutinantes, desintegrantes y/o lubricantes, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saborizantes tales como gualteria, naranja, xilitol, sorbitol, fructosa y maltodextrina y agentes perfumantes, conservantes y/o antioxidantes.

Las formulaciones farmacéuticas contempladas incluyen una fase intragranular que incluye un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido para IL-34, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido representado por la SEQ ID NO: 1, y una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido para IL-34, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido representado por la SEQ ID NO: 1, y un relleno farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 y un relleno se pueden mezclar, opcionalmente, con otros excipientes y formar gránulos. En algunas realizaciones, la fase intragranular se puede formar usando granulación húmeda, por ejemplo, se añade un líquido (por ejemplo, agua) al compuesto de oligonucleótido antisentido mezclado para IL-34 y el relleno, y luego la combinación se seca, muele y/o tamiza para producir gránulos. Un experto en la técnica entendería que pueden usarse otros procesos para lograr una fase intragranular.

En algunas realizaciones, las formulaciones contempladas incluyen una fase extragranular, que puede incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, y que se pueden mezclar con la fase intragranular para formar una formulación descrita.

Una formulación descrita puede incluir una fase intragranular que incluye un relleno. Los ejemplos de rellenos incluyen, pero no se limitan a, celulosa, gelatina, fosfato de calcio, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, sorbitol, celulosa microcristalina, pectina, poliacrilatos, dextrosa, acetato de celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, almidón parcialmente pregelatinizado, carbonato de calcio y otros que incluyen combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, una formulación descrita puede incluir una fase intragranular y/o una fase extragranular que incluye un aglutinante, que generalmente puede funcionar para mantener juntos los ingredientes de la formulación farmacéutica. Los ejemplos de aglutinantes de la divulgación pueden incluir, pero no se limitan a, los siguientes: almidones, azúcares, celulosa o celulosa modificada tal como hidroxipropilcelulosa, lactosa, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa, alcoholes de azúcar y otros incluyendo combinaciones de los mismos.

Las formulaciones contempladas, por ejemplo, que incluyen una fase intragranular y/o una fase extragranular, pueden incluir un desintegrante tal como, entre otros, almidón, celulosa, polivinilpirrolidona entrecruzada, glicolato de almidón sódico, carboximetilcelulosa de sodio, alginatos, almidón de maíz, crosmelosa de sodio, carboximetilcelulosa entrecruzada, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, goma arábiga y otros, incluidas combinaciones de los mismos. Por ejemplo, una fase intragranular y/o una fase extragranular pueden incluir un desintegrante.

En algunas realizaciones, una formulación contemplada incluye una fase intragranular que comprende un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 y excipientes elegidos entre: manitol, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa y glicolato de almidón sódico o combinaciones de los mismos, y una fase extragranular que comprende uno o más de: celulosa microcristalina, glicolato de almidón sódico y estearato de magnesio o mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, una formulación contemplada puede incluir un lubricante, por ejemplo, una fase extragranular puede contener un lubricante. Los lubricantes incluyen, pero no se limitan a, talco, sílice, grasas, estearina, estearato de magnesio, fosfato de calcio, dióxido de silicón, silicato de calcio, fosfato de calcio, dióxido de silicio coloidal, estearatos metálicos, aceite vegetal hidrogenado, almidón de maíz, benzoato de sodio, polietilenglicoles, acetato de sodio, estearato de calcio, lauril sulfato de sodio, cloruro de sodio, lauril sulfato de magnesio, talco y ácido esteárico.

En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un recubrimiento entérico. Generalmente, los recubrimientos entéricos crean una barrera para la medicación oral que controla la ubicación en la que se absorbe el fármaco a lo largo del tracto digestivo. Los recubrimientos entéricos pueden incluir un polímero que se desintegra a diferentes velocidades de acuerdo con el pH. Los recubrimientos entéricos pueden incluir, por ejemplo, acetato ftalato de celulosa, copolímeros de acrilato de metilo-ácido metacrílico, succinato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de metacrilato de metilo-ácido metacrílico, copolímeros de acrilato de etilo-ácido metacrílico, copolímero de ácido metacrílico tipo C, acetato-ftalato de polivinilo y acetato ftalato de celulosa.

Los ejemplos de recubrimientos entéricos incluyen los grados de Opadry® AMB, Acryl-EZE®, Eudragit®. En algunas realizaciones, un recubrimiento entérico puede comprender aproximadamente el 5% a aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5% a aproximadamente el 20%, el 8 a aproximadamente el 15%, aproximadamente el 8% a aproximadamente el 20%, aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% o aproximadamente el 12% hasta aproximadamente el 20%, o aproximadamente el 18% en peso de un comprimido contemplado. Por ejemplo, los recubrimientos entéricos pueden incluir un copolímero de acrilato de etilo-ácido metacrílico.

Por ejemplo, en una realización contemplada, se proporciona un comprimido que comprende o consta esencialmente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 70%, por ejemplo, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10%, o de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, en peso de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un comprimido de este tipo puede incluir, por ejemplo, de aproximadamente un 0,5% a aproximadamente un 60% en peso de manitol, por ejemplo, de aproximadamente 30% a aproximadamente 50% en peso de manitol, por ejemplo, aproximadamente 40% en peso de manitol; y/o de aproximadamente 20% a aproximadamente 40% en peso de celulosa microcristalina, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% en peso de celulosa microcristalina. Por ejemplo, un comprimido descrito puede comprender una fase intragranular que incluye aproximadamente un 30% a aproximadamente un 60%, por ejemplo, aproximadamente 45% a aproximadamente 65% en peso, o alternativamente, aproximadamente 5 a aproximadamente 10% en peso de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34, aproximadamente 30% a aproximadamente 50%, o alternativamente, aproximadamente 5% a aproximadamente 15% en peso de manitol, aproximadamente 5% a aproximadamente 15% de celulosa microcristalina, aproximadamente 0% a aproximadamente 4%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 7% de hidroxipropilmetilcelulosa, y aproximadamente 0% a aproximadamente 4%, por ejemplo, de aproximadamente 2% a aproximadamente 4% en peso de glicolato de almidón de sodio.

En otra realización contemplada, una formulación de comprimido farmacéutico para la administración oral de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 comprende una fase intragranular, en la que la fase intragranular incluye un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (tal como una sal de sodio) y un relleno farmacéuticamente aceptable, y que también puede incluir una fase extragranular, que puede incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como un desintegrante. La fase extragranular puede incluir componentes seleccionados de celulosa microcristalina, estearato de magnesio y mezclas de los mismos. La composición farmacéutica también puede incluir un recubrimiento entérico de aproximadamente un 12% a un 20% en peso del comprimido. Por ejemplo, un comprimido farmacéuticamente aceptable para uso oral puede comprender alrededor de 0,5% a 10% en peso de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, aproximadamente de 30% a 50% en peso de manitol, aproximadamente 10% a 30% en peso de celulosa microcristalina y un recubrimiento entérico que comprende un copolímero de acrilato de etilo-ácido metacrílico.

En otro ejemplo, un comprimido farmacéuticamente aceptable para uso oral puede comprender una fase intragranular, que comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 10% en peso de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, aproximadamente 40% en peso de manitol, aproximadamente 8% en peso de celulosa microcristalina, aproximadamente 5% en peso de hidroxipropilmetilcelulosa y aproximadamente 2% en peso de glicolato de almidón sódico; una fase extragranular que comprende aproximadamente 17% en peso de celulosa microcristalina, aproximadamente 2% en peso de glicolato de almidón sódico, aproximadamente 0,4% en peso de estearato de magnesio; y un recubrimiento entérico sobre el comprimido que comprende un copolímero de acrilato de etilo-ácido metacrílico.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener un recubrimiento entérico que comprende aproximadamente el 13% o aproximadamente el 15%, 16%, 17% o 18% en peso, por ejemplo, AcrylEZE® (véase, por ejemplo, la publicación PCT No. WO2010/054826).

La velocidad a la que se disuelve el recubrimiento y se libera el ingrediente activo es su velocidad de disolución. En una realización, un comprimido contemplado puede tener un perfil de disolución, por ejemplo, cuando se prueba en un aparato USP/EP Tipo 2 (paleta) a 100 rpm y 37 °C en un tampón de fosfato con un pH de 7,2, de aproximadamente 50% a aproximadamente 100% del oligonucleótido antisentido para IL-34 que se libera después de aproximadamente 120 minutos hasta aproximadamente 240 minutos, por ejemplo después de 180 minutos. En otra realización, un comprimido contemplado puede tener un perfil de disolución, por ejemplo, cuando se prueba en un aparato USP/EP Tipo 2 (paleta) a 100 rpm y 37 °C en HCl diluido con un pH de 1,0, en el que sustancialmente no se libera nada del oligonucleótido antisentido para IL-34 después de 120 minutos. Un comprimido contemplado, en otra realización, puede tener un perfil de disolución, por ejemplo, cuando se prueba en un aparato USP/EP Tipo 2 (paleta) a 100 rpm y 37 °C en un tampón de fosfato con un pH de 6,6, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, o no más de aproximadamente 50%, del oligonucleótido antisentido para IL-34 liberado después de 30 minutos.

Formulaciones contempladas, por ejemplo comprimidos, en algunas realizaciones, cuando se administran por vía oral al paciente, pueden dar como resultado una concentración plasmática mínima del oligonucleótido antisentido para IL-34 en el paciente. En otra realización, las formulaciones descritas, cuando se administran por vía oral a un paciente, se administran por vía tópica al colon o recto de un paciente, por ejemplo, a un sitio afectado o enfermo de un paciente.

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden incluir además la administración de al menos otro agente que está dirigido al tratamiento de enfermedades y trastornos descritos en el presente documento. En una realización, se pueden coadministrar otros agentes contemplados (por ejemplo, secuencial o simultáneamente).

Los agentes contemplados incluyen agentes inmunosupresores que incluyen glucocorticoides, citostáticos, anticuerpos, agentes que actúan sobre inmunofilinas, interferones, opioides, proteínas de unión a TNF, micofenolato y pequeños agentes biológicos. Por ejemplo, los agentes inmunosupresores contemplados incluyen, pero no se limitan a: tacrolimus, ciclosporina, pimecrolimus, sirolimus, everolimus, ácido micofenólico, fingolimod, dexametasona, fludarabina, ciclofosfamida, metotrexato, azatioprina, leflunomida, teriflunomida, anakinra, globulina antitimocitos, globulina anti-linfocitos, muromonab-CD3, afutuzumab, rituximab, teplizumab, efalizumab, daclizumab, basiliximab, adalimumab, infliximab, certolizumab pegol, natalizumab y etanercept. Otros agentes contemplados incluyen antibióticos, antidiarreicos, laxantes, analgésicos, suplementos de hierro y suplementos de calcio o vitamina D o B-12.

#### Posología y frecuencia de administración

Los ejemplos de formulaciones incluyen formas de dosificación que incluyen o consisten esencialmente en aproximadamente 35 mg a aproximadamente 500 mg de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34. Por ejemplo, las formulaciones que incluyen aproximadamente 35 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg o 250 mg de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34 se contemplan en el presente documento. En una realización, una formulación puede incluir aproximadamente 40 mg, 80 mg o 160 mg de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34. En algunas realizaciones, una formulación puede incluir al menos 100 µg de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir aproximadamente 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg o 25 mg de un oligonucleótido antisentido descrito para IL-34. La cantidad administrada dependerá de variables tales como el tipo y extensión de la enfermedad o indicación a tratar, la salud general y el tamaño del paciente, la potencia in vivo del oligonucleótido antisentido para IL-34, la formulación farmacéutica y la vía de administración. La dosis inicial puede aumentarse más allá del nivel superior para alcanzar rápidamente el nivel deseado en sangre o en tejido. Alternativamente, la dosis inicial puede ser menor que la óptima y la dosis puede incrementarse progresivamente durante el curso del tratamiento. La dosificación en humanos se puede optimizar, por ejemplo, en un estudio convencional de aumento de dosis de fase I diseñado para pasar de 40 mg a 160 mg. La frecuencia de la dosificación puede variar, dependiendo de factores tales como la vía de administración, la cantidad de dosificación y la enfermedad que se está tratando. Los ejemplos de frecuencias de dosificación son una vez al día, una vez a la semana y una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la dosificación es una vez al día durante 7 días.

#### Métodos de diagnóstico

La divulgación también proporciona un método para diagnosticar a un paciente con una enfermedad inflamatoria que se basa en la detección de niveles de señal de expresión de IL-34 en una o más muestras biológicas de un paciente. Como se usa en el presente documento, el término "señal de expresión de IL-34" puede referirse a cualquier indicación de expresión del gen de IL-34, o actividad del gen o producto génico. Los productos génicos de IL-34 incluyen ARN (por ejemplo, ARNm), péptidos y proteínas. Los índices de expresión del gen de IL-34 que pueden evaluarse incluyen, pero no se limitan a, gen de IL-34 o estado de cromatina, interacción del gen de IL-34 con componentes celulares que regulan la expresión génica, niveles de expresión del producto génico de IL-34 (por ejemplo, niveles de expresión de ARN de IL-34, niveles de expresión de proteína de IL-34) o interacción de ARN o proteína de IL-34 con la maquinaria de procesamiento transcripcional, traduccional o postraduccional. Los índices de actividad del producto génico de IL-34 incluyen, entre otros, la evaluación de la actividad de señalización de IL-34 (por ejemplo, evaluación de la activación de CSF1R o fosforilación de MAPK1/MAPK3) y la evaluación de la unión al receptor de IL-34 (por ejemplo, unión de CSF1R).

La detección de la señal de expresión de IL-34 se puede lograr mediante métodos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. En una realización preferida, los métodos de la divulgación se pueden llevar a cabo *in vitro*. Los métodos de detección pueden implicar la detección en sangre, suero, materia fecal, tejido o células de un paciente. La detección puede lograrse midiendo la señal de expresión de IL-34 en tejido completo, explantes de tejido, cultivos celulares, células disociadas, extracto celular o fluidos corporales, incluyendo sangre o suero. Los métodos de detección contemplados incluyen ensayos que miden los niveles de expresión del producto génico de IL-34 tales como transferencia Western, FACS, ELISA, otros ensayos de unión cuantitativa, ensayos de crecimiento celular o tisular, transferencias Northern, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o semicuantitativa, métodos de obtención de imágenes médicas (por ejemplo, IRM), o métodos de inmunotinción (por ejemplo, inmunohistoquímica o inmunocitoquímica).

## Ejemplos

La invención se define en las reivindicaciones y cualquiera de los siguientes ejemplos que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines comparativos.

La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance o contenido de la divulgación de ninguna manera.

Ejemplo 1: Los oligonucleótidos antisentido para IL-34 reducen la expresión de ARNm de IL-34 en células HT-29 y PBMC estimuladas con Poli (I:C)

Se investigó el efecto de los oligonucleótidos antisentido para IL-34 sobre la expresión de ARNm de IL-34 en células HT-29. Se usó Lipofectamine 3000 (Life Technologies) para transfectar oligonucleótidos antisentido para IL-34 (Tabla 1) en células HT-29. Se cultivaron células HT-29 en medio de McCoy y RPMI1640, respectivamente, complementadas con FBS al 10% y se transfectaron con concentraciones crecientes de oligonucleótidos antisentido (0,5 µg/ml, 1 µg/ml o 2 µg/ml) durante 24 h. La expresión de IL-34 se evaluó mediante PCR en tiempo real (RT-PCR), utilizando β-actina como referencia.

Tabla 1

SEQ ID	Secuencia
1	5'-GCTGGGTGACGCTTT-3'
2	5'-TGGTCACTCAGTCAGG-3'
3	5'-CCAAGATAGCGCAGCC-3'
4	5'-GTCAAGGGCCACATCT-3'
5	5'-AGCTGCTCAGTGTGAA-3'
6	5'-ACAGAGGCCTAAGCA-3'
7	5'-CTCATTCTGCGTCAAG-3'
8	5'-TCGGGGCAGCAGAG-3'
9	5'-GGAGTGAGCAGGTGC-3'

La Figura 1A muestra que la expresión de ARNm de IL-34 se redujo en células HT-29 transfectadas con 0,5 µg/ml del oligonucleótido antisentido para IL-34 (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) en comparación con el control no estimulado (U). La Figura 1B muestra que la expresión de ARNm de IL-34 se redujo en células HT-29 transfectadas con 1 µg/ml de oligonucleótido antisentido para IL-34 de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8). No se observó reducción en la expresión de ARNm de IL-34 en células transfectadas con 1 µg/ml del oligonucleótido antisentido de la SEQ ID NO: 9. La Figura 1C muestra que la expresión de ARNm de IL-34 se redujo en células HT-29 transfectadas con 2 µg/ml de oligonucleótido antisentido para IL-34 (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9). Estos resultados se resumen en la Tabla 2, que muestra el porcentaje de reducción de ARNm de IL-34 en células HT-29 transfectadas con los oligonucleótidos antisentido para IL-34 en comparación con el control no estimulado (U). Los resultados demuestran que la transfección de cada uno de los oligonucleótidos antisentido para IL-34 probados fue capaz de reducir la expresión de ARNm de IL-34 en células HT-29 (con la excepción de la transfección del oligonucleótido antisentido de la SEQ ID NO: 9 a una concentración de 1 µg/mL).

Tabla 2

SEQ ID	0,5 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL
1	13%	20%	41%
2	11%	27%	45%

(continuación)

SEQ ID	0,5 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL
3	35%	18%	45%
4	41%	4%	40%
5	55%	26%	53%
6	39%	16%	39%
7	29%	39%	29%
8	33%	32%	42%
9	20%	0%	47%

Se investigaron los efectos de los oligonucleótidos antisentido para IL-34 sobre la expresión de ARNm de IL-34 en células mononucleares de sangre periférica normal (PBMC) estimuladas con Poli (I:C). Se usó Lipofectamine 3000 (Life Technologies) para transfectar oligonucleótidos antisentido para IL-34 (Tabla 1) en PBMC. Las PBMC se cultivaron en medio de McCoy y RPMI1640, respectivamente, complementadas con FBS al 10% y se transfectaron con concentraciones crecientes de oligonucleótidos antisentido (0,5 µg/ml, 1 µg/ml o 2 µg/ml) durante 24 h. La expresión de IL-34 se evaluó mediante RT-PCR, utilizando β-actina como referencia. Para inducir la expresión de IL-34 en PBMC, las células se trataron con 8 mg/ml de Poli (I:C) durante 6 horas después de la transfección.

La Figura 2A muestra que la expresión de ARNm de IL-34 se redujo en PBMC estimuladas con Poli (I:C) transfectadas con 0,5 µg/ml del oligonucleótido antisentido para IL-34 de la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en comparación con PBMC estimuladas con Poli (I:C) no transfectadas (poli). No se observó reducción en los niveles de expresión de ARNm de IL-34 en PBMC estimuladas con Poli (I:C) transfectadas con 0,5 µg/ml del oligonucleótido antisentido para IL-34 de la SEQ ID NO: 9. La Figura 2B muestra que la expresión de ARNm de IL-34 se redujo en PBMC estimuladas con Poli (I:C) transfectadas con 1 µg/ml del oligonucleótido antisentido para IL-34 (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9). La Figura 2C muestra que la expresión de ARNm de IL-34 se redujo en PBMC estimuladas con Poli (I:C) transfectadas con 2 µg/ml del oligonucleótido antisentido para IL-34 de la SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 6, 7, y 8. No se observó reducción en los niveles de expresión de ARNm de IL-34 en PBMC estimuladas con Poli (I:C) transfectadas con 2 µg/ml del oligonucleótido antisentido para IL-34 de la SEQ ID NO: 2 o 9. Los resultados de la transfección de PBMC estimulada por (I:C) con oligonucleótidos antisentido para IL-34 a concentraciones de 0,5 µg/ml y 1 µg/ml se resume en la Tabla 3, que muestra el porcentaje de reducción de ARNm de IL-34 en PBMC estimuladas con Poli (I:C) transfectadas con los oligonucleótidos antisentido para IL-34 en comparación con el control (poli). Los resultados demuestran que la transfección de cada uno de los oligonucleótidos antisentido para IL-34 ensayados fue capaz de reducir la expresión de ARNm de IL-34 en PBMC estimuladas con Poli (I:C) en casi todas las concentraciones de transfección ensayadas.

Tabla 3

SEQ ID	0,5 µg/mL	1 µg/mL
1	75%	48%
2	86%	12%
3	3%	39%
4	56%	58%
5	79%	75%
6	71%	51%
7	76%	47%
8	29%	74%
9	0%	13%

Ejemplo 2: La expresión de IL-34 aumenta en el tejido tumoral de cáncer colorrectal (CRC)

Para determinar si el aumento de la expresión de IL-34 está asociado con tejido tumoral colorrectal, se recogieron explantes de colónicos emparejados de áreas no tumorales (NT) y tumorales (T) de 12 pacientes con CRC esporádico. Se realizó RT-PCR para analizar el nivel de expresión de ARNm de IL-34 en los explantes. Los niveles de ARNm de IL-34 se normalizaron utilizando los niveles de ARNm de β-actina como referencia. Los resultados del análisis de RT-PCR se muestran en la Figura 3. Cada punto del gráfico de la Figura 3 representa el nivel de expresión de ARNm de IL-34 en un solo paciente, con líneas que conectan los puntos de datos recopilados de tejido tumoral y no tumoral del

mismo paciente. Las barras horizontales en las columnas NT y T indican la mediana del valor de expresión de ARNm de IL-34 en cada grupo. Los resultados demuestran que la expresión de IL-34 aumentó en todas las muestras de tejido tumoral individuales en comparación con las muestras de tejido no tumoral del mismo paciente. Los resultados también demuestran que el nivel medio global de ARNm de IL-34 aumentó significativamente en el tejido tumoral en comparación con el tejido no tumoral de los pacientes con CRC (Figura 3; NT frente a T,  $p = 0,01$ ).

Ejemplo 3: La expresión de IL-34 aumenta en el tejido tumoral de CRC esporádico

Para determinar si la expresión de la proteína IL-34 aumenta en tejido tumoral de CRC esporádico, se recogieron muestras de tejido de colon de pacientes con CRC esporádico de áreas no tumorales (NT) y tumorales (T) de tejido de colon y se analizaron mediante inmunohistoquímica. Las muestras de tejido congeladas se expusieron a anticuerpo de control de isotipo (IgG) (Figura 4A, panel superior) o anticuerpo de IL-34 (Figura 4A, paneles inferiores). El tejido expuesto al control de isotipo y el tejido no tumoral expuesto a un anticuerpo de detección de IL-34 mostró poca o ninguna señal de anticuerpo de IL-34 visible. El tejido tumoral expuesto al anticuerpo de detección de IL-34 mostró un claro aumento en la señal del anticuerpo de IL-34 en comparación con el tejido no tumoral y las muestras de control de isotipo (Figura 4A). Las fotomicrografías representativas muestran el anticuerpo de detección de IL-34 y la tinción de control de isotipo con un aumento de 40x, con imágenes de 200x insertadas (Figura 4A). La cuantificación del número de células positivas para IL-34 en tejido tumoral (T) en comparación con tejido no tumoral (NT) demostró un aumento significativo en el número de células positivas para IL-34 por campo de alta potencia (hpf; es decir, 200x) (Figura 4B;  $n = 8$  pacientes; NT frente a T,  $p < 0,0001$ ; las barras representan SEM).

También se realizó ELISA en tejido de explante de colon tomado de las áreas no tumorales (NT) y tumorales (T) de 8 pacientes con CRC esporádico para medir los niveles de proteína IL-34 (Figura 4C). La cuantificación de la concentración de proteína IL-34 en tejido tumoral (T) en comparación con tejido no tumoral (NT) demostró un aumento significativo en la concentración de proteína IL-34 en tejido tumoral (Figura 4C;  $n = 8$  pacientes; NT frente a T,  $p = 0,002$ ; las barras representan SEM).

También se realizó una transferencia Western para determinar si los niveles de proteína IL-34 están aumentados en tejido de colon tumoral de pacientes con CRC esporádico. El anticuerpo de detección de IL-34 se usó para sondar transferencias Western que contenían extracto de tejido de áreas no tumorales (NT) y tumorales (T) de 5 pacientes con CRC esporádico. Las transferencias también se sondaron con un anticuerpo de  $\beta$ -actina para proporcionar un control. La Figura 4D muestra una transferencia Western representativa de extractos de tejido de colon tumoral y no tumoral de 2 pacientes con CRC esporádico sondeados con anticuerpo IL-34 y anticuerpo de control de  $\beta$ -actina. El análisis de las transferencias Western sondadas con anticuerpo IL-34 mostró un claro aumento en el nivel de la señal del anticuerpo IL-34 en el tejido de colon tumoral en comparación con el tejido de colon no tumoral de pacientes con CRC esporádico.

Estos resultados demuestran que los niveles de proteína IL-34 aumentaron significativamente en el tejido de colon tumoral de pacientes con CRC esporádico, en comparación con el tejido de colon no tumoral.

Ejemplo 4: IL-34 induce la proliferación celular a través de una vía dependiente de ERK1/2

Para determinar si IL-34 estimula la proliferación celular, las células cancerosas DLD-1 privadas de suero se dejaron sin estimular (sin estímulo) o se estimularon con dosis crecientes de proteína IL-34 humana recombinante (25, 50 o 100 ng/ml) durante 48 horas. Se evaluó la proliferación de células DLD-1 con tinción de éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) mediante citometría de flujo. La estimulación de células DLD-1 con 50 ng/ml y 100 ng/ml resultó en un aumento significativo en la proliferación celular en comparación con las muestras de control no estimuladas (Figura 5A;  $n = 4$ ; 50 ng/ml frente a sin estímulo,  $p = 0,006$ ; 100 ng/ml frente a sin estímulo,  $p = 0,02$ ; las barras representan SEM). Estos resultados demuestran que IL-34 estimuló aumentos significativos en la proliferación celular de células DLD-1 privadas de suero.

Para determinar si IL-34 estimula la proliferación celular a través de una vía dependiente de ERK1/2 o p38, se preincubaron células DLD-1 privadas de suero con inhibidores específicos de ERK1/2 o p38 (PD98059 o SB202190, respectivamente) o con vehículo DMSO durante 1 hora y luego se estimuló con proteína IL-34 humana recombinante a una concentración de 50 ng/ml durante 48 horas. La proliferación de células DLD-1 se evaluó con tinción de CFSE mediante citometría de flujo. La estimulación de células DLD-1 privadas de suero con proteína IL-34 dio como resultado un aumento significativo en la proliferación celular en comparación con la proliferación de células expuestas solo al vehículo (Figura 5B;  $n = 4$ ; IL-34 + DMSO frente a DMSO,  $p = 0,01$ ; las barras representan SEM). La estimulación con IL-34 de células preincubadas con el bloqueador de p38 SB202190 dio como resultado un aumento significativo de la proliferación celular en comparación con los controles no estimulados preincubados con vehículo (comparable al aumento de la proliferación celular de las células expuestas a IL-34 sola) pero no en comparación con las células que se preincubaron con vehículo y se estimularon con IL-34 sola (Figura 5B, DMSO frente a IL-34 + SB202190,  $p = 0,01$ ; las barras representan SEM). Sin embargo, la proliferación de células DLD-1 estimuladas con IL-34 y preincubadas con vehículo fue significativamente mayor que la proliferación de células DLD-1 preincubadas con el bloqueador de ERK1/2 PD98059 y posteriormente estimuladas con proteína IL-34 (Figura 5B; DMSO + IL-34 frente a PD98059 + IL-

34,  $p = 0,006$ ; las barras representan SEM). Estos resultados demuestran que la proteína IL-34 fue capaz de estimular la proliferación de células a través de una vía dependiente de ERK1/2.

Ejemplo 5: IL-34 aumenta la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  en una línea celular de CRC

Para determinar si IL-34 estimula la apoptosis de las células CRC, las células DLD-1 privadas de suero se dejaron sin estimular (sin estímulo) o se estimularon con dosis crecientes de IL-34 humana recombinante (25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) durante 48 horas. Las células se analizaron mediante citometría de flujo para PI y AV para determinar el porcentaje de muerte celular en cada muestra. No se observó un aumento significativo en la muerte celular en las muestras estimuladas con IL-34 en comparación con los controles no estimulados (Figura 6A;  $n = 4$ ; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

Para determinar si IL-34 potencia la muerte celular mediada por ligando Fas, las células DLD-1 privadas de suero se dejaron sin estimular (sin estímulo) o se estimularon con IL-34 humana recombinante a una concentración de 50 ng/ml y/o Ligando Fas (FasL) a una concentración de 200 ng/ml durante 48 horas. Las células se analizaron mediante citometría de flujo para la señal de PI y/o AV para determinar el porcentaje de muerte celular en cada muestra. La Figura 6B muestra el porcentaje de muerte celular de acuerdo con lo evaluado por tinción con AV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>, AV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> y AV<sup>-</sup>PI<sup>+</sup>. La Figura 6C muestra el porcentaje de muerte celular evaluado mediante tinción con AV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> solamente. La estimulación de las células DLD-1 con IL-34 y FasL no dio como resultado un aumento significativo en la muerte celular en comparación con la estimulación de FasL solamente (Figura 6B y 6C;  $n = 4$ ; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

Para determinar si la IL-34 potencia la muerte celular mediada por TNF $\alpha$ , las células DLD-1 privadas de suero se dejaron sin estimular (sin estímulo) o se estimularon con IL-34 humana recombinante a una concentración de 50 ng/ml y/o TNF $\alpha$  a una concentración de 100 ng/ml durante 48 horas. Las células se analizaron mediante citometría de flujo para la señal de PI y/o AV para determinar el porcentaje de muerte celular en cada muestra. La Figura 6D muestra el porcentaje de muerte celular evaluado por tinción con AV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>, AV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> y AV<sup>-</sup>PI<sup>+</sup>. La Figura 6E muestra el porcentaje de muerte celular evaluada mediante tinción con AV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> solamente. La estimulación de las células DLD-1 con IL-34 y TNF $\alpha$  dio como resultado un aumento significativo en la muerte celular en comparación con la estimulación con IL-34 o TNF $\alpha$  solamente (Figura 6D y 6E;  $n = 4$ ; IL-34 frente a IL34 + TNF $\alpha$ ,  $p = 0,03$ ; TNF $\alpha$  frente a IL34 + TNF $\alpha$ ,  $p = 0,05$ ; las barras representan la media  $\pm$  SEM). Estos resultados demuestran que la IL-34 fue capaz de potenciar la cantidad de muerte celular en las células CRC provocada por la estimulación de TNF $\alpha$  solamente.

Ejemplo 6: Los receptores de IL-34 aumentan en el CRC esporádico humano

Para determinar si la expresión de la proteína receptora de IL-34 aumenta en el CRC esporádico humano, se recogieron muestras de tejido de colon de 3 pacientes de control (CTR) y 3 pacientes con CRC esporádico, se seccionaron y se tiñeron con anticuerpo específico para el receptor del factor 1 estimulante de colonias de macrófagos receptor de IL-34 (M-CSFR-1) o IgG de control de isotipo. Las fotomicrografías de las secciones de tejido teñidas con el isotipo de control IgG no mostraron ninguna señal significativa (Figura 7A, panel superior). Las secciones de tejido incluidas en parafina teñidas con M-CSFR-1 de pacientes de control (Figura 7A, panel inferior izquierdo) mostraron cantidades más bajas de señal de M-CSFR-1 en comparación con las secciones de tejido de pacientes con CRC esporádico (Figura 7A, panel inferior derecho; las microfotografías son representativas de todas las muestras; aumento original, 200x; recuadro, 400x).

Para determinar si la expresión del ARNm del receptor de IL-34 aumenta en el CRC esporádico humano, se analizaron explantes de colon recolectados del tejido de colon no tumoral (NT) y tumoral (T) de 6 pacientes con CRC esporádico para la expresión de ARNm de M-CSFR-1 por RT-PCR. El tejido de colon también se analizó para la expresión de ARNm que codifica un receptor alternativo de IL-34 PTP- $\zeta$ . Los resultados se normalizaron utilizando los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina como referencia. La Figura 7B muestra niveles normalizados de ARNm de M-CSFR-1 en tejido de colon NT y T de 6 individuos con CRC esporádico. La Figura 7C muestra niveles normalizados de ARNm de PTP- $\zeta$  en tejido de colon NT y T de 6 individuos con CRC esporádico. Los puntos de datos NT y T en cada gráfico del mismo paciente están conectados por líneas. Las barras horizontales en cada columna de la Figura 7B y 7C representan la mediana de los valores de ARNm de M-CSFR-1 o PTP- $\zeta$ , respectivamente, en cada uno de los grupos NT y T. La Figura 7B indica que los niveles de ARNm de M-CSFR-1 eran más altos en el tejido de colon tumoral en comparación con el tejido de colon no tumoral en cada individuo, y que los niveles medios de M-CSFR-1 eran significativamente más altos en el tejido de colon tumoral en comparación con tejido de colon no tumoral (Figura 7B,  $p = 0,01$ ). La Figura 7C indica que los niveles de ARNm de PTP- $\zeta$  eran más altos en el tejido de colon tumoral en comparación con el tejido de colon no tumoral en cada individuo, y que los niveles medios de PTP- $\zeta$  eran significativamente más altos en el tejido de colon tumoral en comparación con el tejido de colon no tumoral (Figura 7C,  $p = 0,03$ ).

Estos resultados demuestran que tanto los niveles de ARNm como de proteína de los receptores de IL-34 aumentan en el tejido tumoral de pacientes con CRC esporádico.

Ejemplo 7: El factor 1 estimulante de colonias de macrófagos no afecta el crecimiento celular ni la muerte de las células CRC

Para determinar si el factor 1 estimulante de colonias de macrófagos del ligando M-CSFR-1 (MCSF-1) afecta el crecimiento de células CRC, las células DLD-1 privadas de suero se dejaron sin estimular (sin estímulo) o se estimularon con dosis crecientes de MCSF-1 humano recombinante (25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml). Se analizó la proliferación celular de las células DLD-1 contando las células positivas para 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). No se detectó ningún aumento significativo en la proliferación celular después de la estimulación con MCSF-1 (Figura 8A, n = 11; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

Las células DLD-1 privadas de suero también se dejaron sin estimular (sin estímulo) o se estimularon con dosis crecientes de IL-34 humana recombinante (25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml). La proliferación celular de las células DLD-1 se analizó contando las células positivas para BrdU. La estimulación con IL-34 en todas las concentraciones dio como resultado un aumento significativo en la proliferación celular en comparación con los controles no estimulados (Figura 8B, n = 7; sin estímulo frente a 25 ng/ml, p = 0,001; sin estímulo frente a 50 ng/ml, p = 0,001; sin estímulo frente a 100 ng/ml, p = 0,001; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

Para determinar si el factor 1 estimulante de colonias de macrófagos del ligando de M-CSFR-1 (MCSF-1) afecta la muerte de células de CRC, las células DLD-1 privadas de suero se dejaron sin estimular (sin estímulo) o se estimularon con dosis crecientes de MCSF-1 humano recombinante (25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml). Las células se analizaron mediante citometría de flujo para la señal de PI y/o AV para determinar el porcentaje de muerte celular en cada muestra. No se detectó ningún aumento significativo en la muerte celular después de la estimulación con MCSF-1 (Figura 8C, n = 6; las barras representan la media  $\pm$  SEM).

Estos resultados demuestran que, a diferencia de IL-34, MCSF-1 del ligando M-CSFR-1 no tiene un efecto apreciable sobre la proliferación celular o el crecimiento de células de CRC.

Ejemplo 8: Las líneas celulares de CRC HT-29 expresan IL-34 a niveles altos

Para evaluar la expresión de IL-34 en líneas celulares de CRC humanas, se analizó la expresión de ARNm de IL-34 mediante RT-PCR en las líneas celulares de CRC humanas DLD-1, HT-29 y HCT-116, y en las líneas de células epiteliales intestinales normales NCM-460. Los niveles de expresión de ARNm de IL-34 se normalizaron utilizando los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina como referencia. Como se muestra en la Figura 9, la expresión de ARNm de IL-34 fue abundante en células HT-29.

Ejemplo 9: Un oligonucleótido antisentido para IL-34 derriba los niveles de IL-34 e inhibe la proliferación de células CRC a través de un mecanismo dependiente de ERK1/2

Para determinar si los oligonucleótidos antisentido para IL-34 son capaces de subregular la expresión de la proteína IL-34 en la línea celular de CRC DLD-1, se transfectaron células DLD-1 con un oligonucleótido antisentido de control negativo (AS de NC) o una concentración de H antisentido para IL-34 de 2  $\mu$ g/ml durante 48 horas. Se extrajo proteína de células DLD-1 y se sondaron transferencias Western con un anticuerpo IL-34 o un anticuerpo  $\beta$ -actina para proporcionar un control. La transfección del oligonucleótido antisentido para IL-34 dio como resultado una disminución apreciable en la señal del anticuerpo de IL-34 (Figura 10A; imagen representativa de uno de los cuatro experimentos mostrados). Este resultado demuestra que un oligonucleótido antisentido para IL-34 fue capaz de derribar apreciablemente los niveles de IL-34 en una línea celular de CRC.

Para determinar si la disminución de los niveles de IL-34 en las células DLD-1 da como resultado un aumento de la muerte celular, se transfectaron células DLD-1 con un oligonucleótido antisentido de control negativo (AS de NC) o un oligonucleótido antisentido para IL-34 (AS para IL-34; oligonucleótido antisentido para IL-34 de la SEQ ID NO: 5) a una concentración de 2  $\mu$ g/ml durante 72 horas. El porcentaje de muerte celular se evaluó mediante análisis de citometría de flujo como porcentaje de células positivas para AV y/o positivas para PI. No se observó un aumento significativo en la muerte de células DLD-1 en las muestras AS para IL-34 en comparación con las muestras AS de NC (Figura 10B; n = 4; los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM). Estos resultados demuestran que la inactivación de IL-34 no tuvo un efecto significativo sobre la muerte celular en la línea celular DLD-1.

Para determinar si la disminución de los niveles de IL-34 en las células DLD-1 da como resultado una mayor proliferación celular, se transfectaron células DLD-1 con un oligonucleótido antisentido de control negativo (AS de NC) o un oligonucleótido antisentido para IL-34 (AS para IL-34; oligonucleótido antisentido para IL-34 de la SEQ ID NO: 5) a una concentración de 2  $\mu$ g/ml durante 72 horas. La proliferación celular se evaluó mediante citometría de flujo después de la tinción con CFSE. La transfección con AS para IL-34 dio como resultado una disminución significativa en la proliferación de células DLD-1 en comparación con la transfección AS de NC (Figura 10C; n = 4; AS de NC frente a AS para IL-34, p = 0,01; los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM). Este resultado demuestra que la inactivación de IL-34 disminuyó significativamente la proliferación de células DLD-1.

Para determinar si la inactivación de IL-34 afecta la expresión de la proteína ERK1/2, las células DLD-1 se transfectaron con AS de NC o AS para IL-34 (oligonucleótido antisentido para IL-34 de la SEQ ID NO: 5) a una concentración de 2  $\mu$ g/ml durante 72 horas. Se extrajo proteína de células DLD-1 y se sondaron transferencias Western

para IL-34, ERK1/2 total (ERK1/2), ERK1/2 fosforilada (pERK1/2) o  $\beta$ -actina. La transfección con AS para IL-34 dio como resultado una inactivación apreciable en los niveles de IL-34 así como de pERK1/2, pero no de ERK1/2 total (Figura 10D; imagen representativa de 4 experimentos). Estos resultados demuestran que la inactivación de IL-34 también provocó una disminución en los niveles de pERK1/2 en las células DLD-1. Estos resultados también sugieren que la expresión de IL-34 era necesaria para mantener niveles más altos de pERK1/2, y que los efectos de IL-34 sobre la proliferación de células CRC pueden ocurrir a través de una vía dependiente de ERK1/2.

Ejemplo 10: IL-34 y su receptor se expresan en tumores de cáncer de colon asociados a colitis

Para determinar si M-CSFR-1 se expresa en tejido tumoral de cáncer de colon asociado a colitis (CAC), se seccionó tejido de colon tumoral y no tumoral recogido de tres pacientes con CAC, se incluyó en parafina y se tiñó con un anticuerpo M-CSFR-1. La señal de M-CSFR-1 apareció más abundante en el tejido tumoral de colon, en comparación con el tejido no tumoral de colon (Figura 11A; micrografías representativas tomadas con un aumento de 40x; insertos con un aumento de 200x).

Para determinar si la IL-34 se expresa en tejido tumoral CAC, se recogió tejido de colon tumoral y no tumoral de ratones C57BL/6J de tipo silvestre en el que se indujo CAC por exposición a AOM y DSS. Se recogieron explantes emparejados de áreas tumorales y no tumorales de tejido de colon de 7 ratones sacrificados el día 84 después de que se analizó la expresión de ARNm de IL-34 mediante RT-PCR después del tratamiento con AOM + DSS. Los niveles de ARNm de IL-34 se normalizaron a los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina. La Figura 11B muestra niveles normalizados de ARNm de IL-34 en tejido de colon no tumoral (NT) y tumoral (T) de 7 ratones. Los puntos de datos NT y T del mismo animal están conectados por líneas. Las barras horizontales en cada columna representan la mediana de los valores de ARNm de IL-34 en los grupos NT y T. La mediana de los niveles de IL-34 fueron significativamente más altos en el tejido de colon tumoral en comparación con el tejido de colon no tumoral de ratones con CAC (Figura 11B,  $p = 0,01$ ).

Estos resultados demuestran que los niveles tanto de IL-34 como de su receptor, M-CSFR-1, aumentan en el tejido tumoral con CAC.

Ejemplo 11: La expresión de IL-34 está elevada en la enfermedad de Crohn con fibroestenosis

Para evaluar si la expresión de ARN de IL-34 está elevada en el tejido intestinal de los individuos que padecen enfermedad de Crohn con fibroestenosis (CD con FS), se recolectaron biopsias ileales de 5 pacientes de control (CTR ileal) que no padecían enfermedad de Crohn inflamatoria (CD I) o CD con FS, 5 pacientes con CD I y 5 pacientes con CD con FS. El nivel de expresión de ARNm de IL-34 en cada biopsia se evaluó mediante RT-PCR. Los niveles de ARNm de IL-34 se normalizaron usando la señal de expresión de ARNm de  $\beta$ -actina. Los niveles de expresión de ARNm de IL-34 fueron significativamente más altos en las muestras de CD I y CD con FS en comparación con las muestras de control (Figura 12A; CD I frente a CTR ileal,  $p = 0,002$ ; CD con FS frente a CTR ileal,  $p = 0,03$ ; los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM).

Para evaluar si los niveles de proteína IL-34 están elevados en el tejido intestinal de individuos que padecen CD con FS, se recolectaron biopsias ileales de pacientes de control (CTR ileal) que no padecen de CD I o CD con FS, pacientes con CD I, y pacientes con CD con FS. Los extractos de proteínas de tejido biopsiado se analizaron mediante análisis de transferencia Western, utilizando anticuerpos contra IL-34 y ERK1/2 como control de carga. La señal de la proteína IL-34 apareció más alta en las muestras de CD I y CD con FS en comparación con las muestras de control (Figura 12B; transferencia representativa que muestra los resultados de la sonda de extractos de 2 pacientes de CTR ileal, 2 pacientes con CD I y 2 pacientes con CD con FS).

Para analizar más a fondo si los niveles de proteína IL-34 están elevados en CD con FS, se tiñeron secciones incluidas en parafina de muestras intestinales quirúrgicas recogidas de 1 control normal (CTR ileal) y de 1 paciente que padecía CD con FS usando un anticuerpo de detección de IL-34. El análisis de las secciones teñidas reveló la presencia de células positivas para IL-34 tanto en la lámina propia como en los compartimientos estromales del intestino de pacientes con CD con FS. El número de células positivas para IL-34 apareció más alto en secciones de tejido de pacientes con CD con FS que en secciones comparables de individuos de control (Figura 12C; las fotomicrografías a 100 aumentos son representativas de imágenes de 3 individuos de CTR ileal y 3 pacientes con CD con FS).

Para determinar si la expresión de ARNm y proteína de IL-34 está elevada en fibroblastos intestinales de pacientes con CD con FS, se recogieron fibroblastos intestinales de 5 pacientes de control (CTR) y 5 pacientes con CD con FS. La expresión de ARNm de IL-34 en fibroblastos se evaluó mediante RT-PCR. Los niveles de expresión de ARNm de IL-34 se normalizaron usando la señal de expresión de ARNm de  $\beta$ -actina. El análisis de RT-PCR demostró que los niveles de expresión de ARNm de IL-34 estaban significativamente elevados en los fibroblastos intestinales de los pacientes con CD con FS en comparación con los pacientes de CTR (Figura 12D; CTR frente a CD con FS,  $p = 0,003$ ; los datos se representan como la media  $\pm$  SEM). Los extractos de proteínas totales de fibroblastos intestinales de pacientes de CTR y con CD con FS se analizaron mediante transferencia Western. Las transferencias de extractos de fibroblastos se sondaron con anticuerpos contra IL-34 y  $\beta$ -actina (control de carga). La señal de detección de IL-34 apareció elevada en extractos de fibroblastos intestinales de pacientes con CD con FS en comparación con muestras

de pacientes de control (Figura 12E; imagen representativa que muestra extractos sondados de 2 pacientes de CTR y 2 con CD con FS).

5 Estos resultados demuestran que los niveles de expresión de ARNm y proteínas de IL-34 estaban elevados en tejido ileal y en células de fibroblastos intestinales individuales de pacientes que padecían CD con FS en comparación con los niveles de expresión de ARNm y proteínas de IL-34 en pacientes sanos. Estos resultados también demuestran que los niveles de expresión de ARNm y proteínas de IL-34 estaban elevados en el tejido ileal de pacientes que padecían CD I en comparación con los niveles de expresión de ARNm y proteínas de IL-34 en pacientes sanos.

10 Ejemplo 12: La expresión del receptor de IL-34 M-CSFR-1 está elevada en la enfermedad de Crohn inflamatoria y en la enfermedad de Crohn con fibroestenosis

15 Para evaluar si la expresión del receptor de IL-34, M-CSFR-1, está elevada en CD con FS, se recolectaron biopsias ileales de 5 pacientes de control normal (CTR Ileal), 5 pacientes que padecían CD I y 5 pacientes con CD con FS. Los niveles de ARNm de M-CSFR-1 se evaluaron en cada muestra mediante RT-PCR. Los niveles de ARNm de M-CSFR-1 se normalizaron usando la señal de expresión de ARNm de  $\beta$ -actina. Los niveles de expresión de ARNm de M-CSFR-1 fueron significativamente elevados en las muestras de CD I y CD con FS en comparación con las muestras de control (Figura 13A; CTR Ileal frente a CD I,  $p = 0,03$ ; CTR Ileal frente a CD con FS,  $p = 0,006$ ; los datos se expresa como la media  $\pm$  SEM). Se analizaron extractos de proteínas de tejido de biopsia ileal de pacientes de control (CTR Ileal), pacientes que padecían CD I y pacientes con CD con FS mediante transferencia Western para evaluar los niveles de expresión de la proteína M-CSFR-1 en CD con FS. Se sondaron transferencias de extractos de tejido de biopsia ileal con anticuerpos contra M-CSFR-1 y ERK1/2 (control de carga). La señal de detección de M-CSFR-1 apareció elevada en extractos de pacientes con CD I y CD con FS en comparación con muestras de pacientes de control (Figura 13B; imagen representativa que muestra extractos sondados de 2 pacientes de CTR Ileal, 2 con CD I y 2 con CD con FS).

Estos resultados demuestran que los niveles de expresión de proteínas y ARNm del receptor de IL-34, M-CSFR-1, están elevados en el tejido intestinal de pacientes con CD I y CD con FS.

30 Ejemplo 13: IL-34 estimula la producción de colágeno en fibroblastos normales

35 Para evaluar si la exposición a IL-34 afecta la producción de colágeno, se aislaron fibroblastos normales de pacientes de control y se dejaron sin tratar (sin estímulo) o se expusieron a la proteína IL-34 humana recombinante a una concentración de 50 ng/ml durante 6-48 horas. Después de 6 horas, se evaluaron los niveles de ARNm de la cadena alfa 1 de colágeno tipo 1 (Col1A1; Figura 14A) y de la cadena alfa 1 de colágeno tipo III (Col3A1; Figura 14B) mediante RT-PCR. Los niveles de ARNm de Col1A1 y Col3A1 se normalizaron en relación con la señal de expresión de ARNm de  $\beta$ -actina. Los niveles de expresión de ARNm de Col1A1 se elevaron en las muestras tratadas con IL-34 en comparación con las muestras no tratadas (Figura 14A;  $n = 4$ ; los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM). Los niveles de expresión de ARNm de Col3A1 se elevaron significativamente en las muestras tratadas con IL-34 en comparación con las muestras no tratadas (Figura 14B; sin estímulo frente a IL-34,  $p = 0,03$ ;  $n = 4$ ; los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM). Después de 48 horas, se evaluó la secreción de colágeno en los sobrenadantes celulares mediante el ensayo de Sircol. A las 48 horas, los niveles de colágeno se elevaron significativamente en las muestras tratadas con IL-34 en comparación con las muestras no tratadas (Figura 14C; sin estímulo frente a IL-34,  $p = 0,01$ ;  $n = 4$ ; los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM). Estos resultados demuestran que IL-34 estimuló la expresión de colágeno en células de fibroblastos.

## REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido para IL-34 que comprende la secuencia de nucleótidos 5'-AGCTGCTCAGTGTGAA-3' (SEQ ID NO: 5).
2. El oligonucleótido antisentido para IL-34 de la reivindicación 1, en el que al menos un enlace nucleosídico de la secuencia se selecciona del grupo que consiste en un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace fosfotriéster, un enlace alquilfosfonato, un enlace aminoalquilfosfotriéster, un enlace alquilén fosfonato, un enlace fosfinato, un enlace fosforamidato y un enlace aminoalquilfosforamidato, un enlace tiofosforamidato, un enlace tionoalquilfosfonato, un enlace tionoalquilfosfotriéster, un enlace tiofosfato, un enlace selenofosfato y un enlace boranofosfato, preferiblemente en el que al menos un enlace internucleosídico de la secuencia es un enlace fosforotioato; o preferiblemente en el que todos los enlaces internucleosídicos de la secuencia son enlaces fosforotioato.
3. El oligonucleótido antisentido para IL-34 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de 20 a 30, 30 a 40 o 22 a 40 nucleótidos.
4. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el oligonucleótido antisentido para IL-34 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que la composición farmacéutica es adecuada para administración tópica, parenteral, oral, pulmonar, intratraqueal, intranasal, transdérmica o intraduodenal, preferiblemente en la que la composición farmacéutica es adecuada para administración oral.
6. Un oligonucleótido antisentido para IL-34 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso como medicamento.
7. Un oligonucleótido antisentido para IL-34 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
8. El oligonucleótido antisentido para IL-34 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha enfermedad inflamatoria está asociada con una expresión alterada de IL-34.
9. El oligonucleótido antisentido para IL-34 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, psoriasis, osteoartritis, diabetes (tipo I y II), rechazo de tejido u órgano, esclerosis múltiple, inflamación periodontal, periodontitis, sinovitis villonodular pigmentada, hepatitis, sinusitis, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de colon asociado a colitis, cáncer colorrectal esporádico, enfermedad de las arterias coronarias, síndrome de Sjogren (SS), obesidad, inflamación crónica, sarcoidosis pulmonar, lesiones cutáneas, una enfermedad inflamatoria del SNC y una enfermedad autoinmune.
10. El oligonucleótido antisentido para IL-34 para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria intestinal.
11. El oligonucleótido antisentido para IL-34 para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, enfermedad de Crohn gastroduodenal, colitis de Crohn (granulomatosa), colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis de derivación, enfermedad de Behçet, colitis microscópica, proctitis ulcerosa, proctosigmoiditis, yeyunoileítis, colitis del lado izquierdo, pancolitis, ileocolitis, ileítis y colitis indeterminada.
12. El oligonucleótido antisentido para IL-34 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en un método para prevenir o tratar la fibrosis.
13. El oligonucleótido antisentido para IL-34 para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que:
- (a) la fibrosis es fibrosis intestinal; o
  - (b) la fibrosis es fibrosis pulmonar; o
  - (c) la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis endomiocárdica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal y fibrosis sistémica nefrogénica.
14. El oligonucleótido antisentido para IL-34 para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 parte (a), en el que se administra a un paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de una preparación farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido para IL-34 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, opcionalmente en el que la preparación farmacéutica se administra por vía oral; y/o en el que el paciente es un ser humano y/o en el que el paciente también padece enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal o colitis ulcerosa.

15. El oligonucleótido antisentido para IL-34 para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 parte (b), en el que se administra a un paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de una preparación farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido para IL-34 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, opcionalmente en el que la preparación farmacéutica se administra por vía oral; y/o en el que el paciente es un ser humano.

5

FIG. 1A

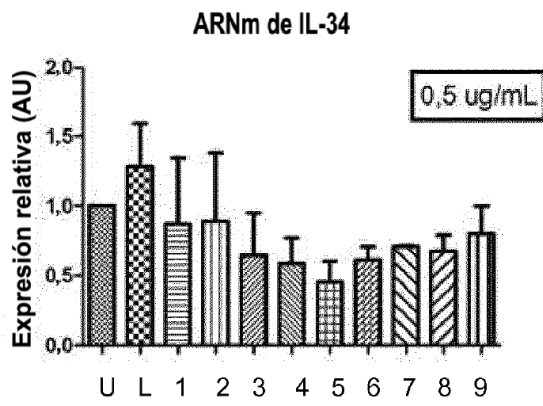


FIG. 1B

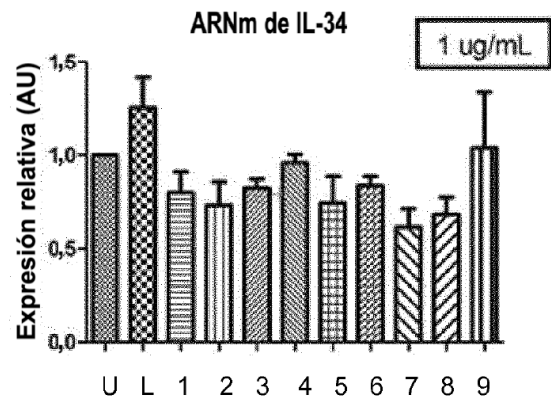
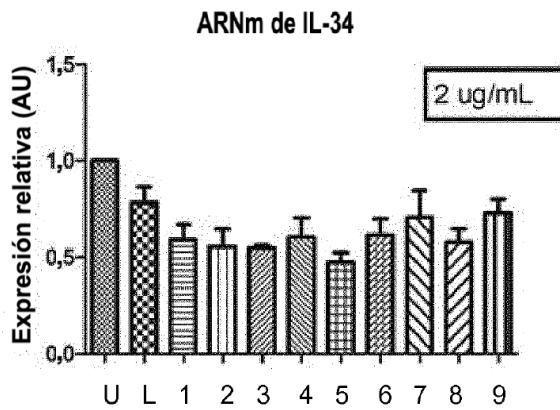
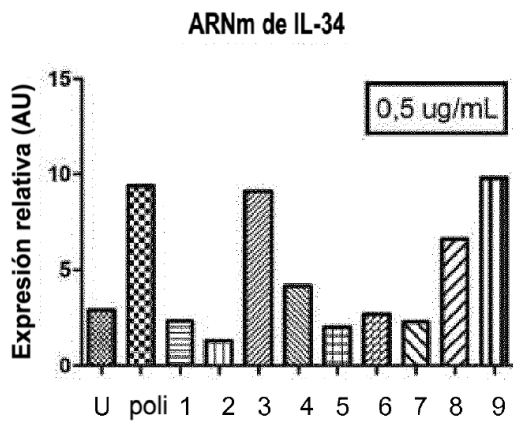


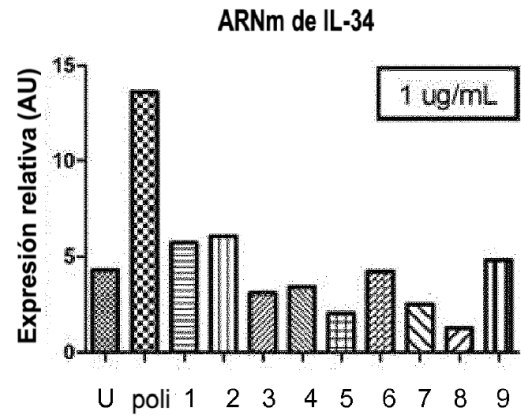
FIG. 1C



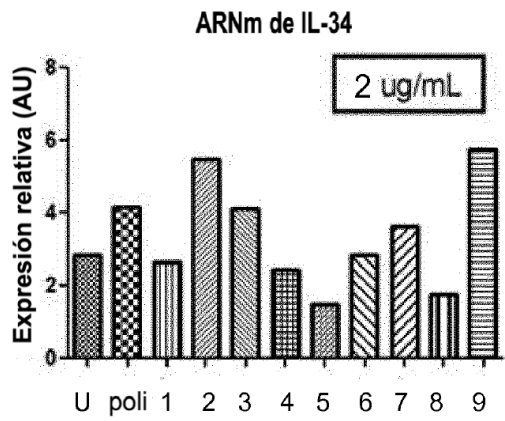
**FIG. 2A**



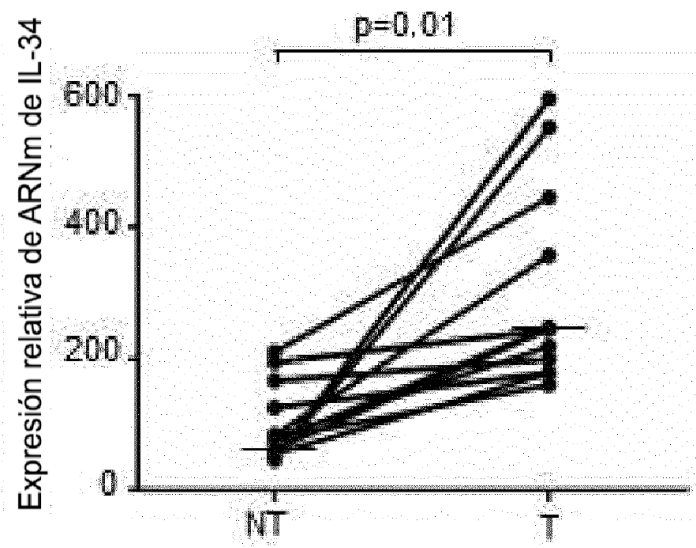
**FIG. 2B**



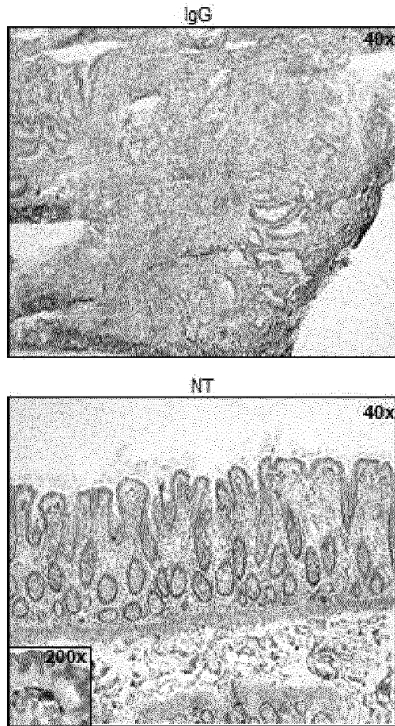
**FIG. 2C**



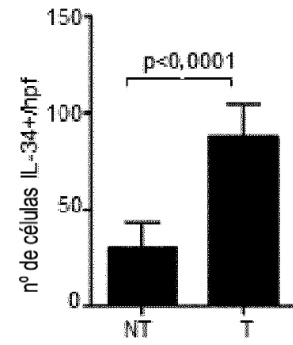
**FIG. 3**



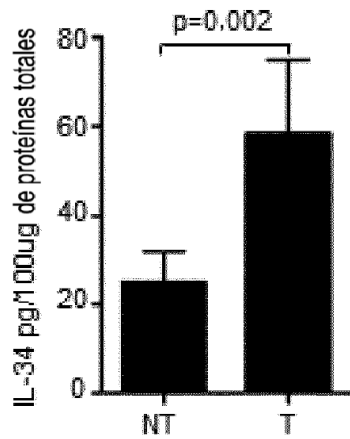
**FIG. 4A**



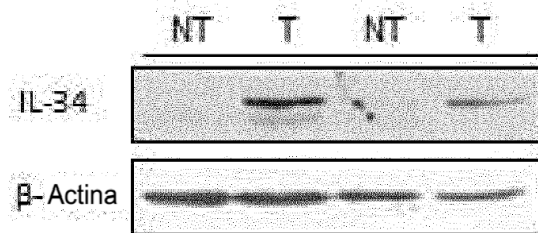
**FIG. 4B**



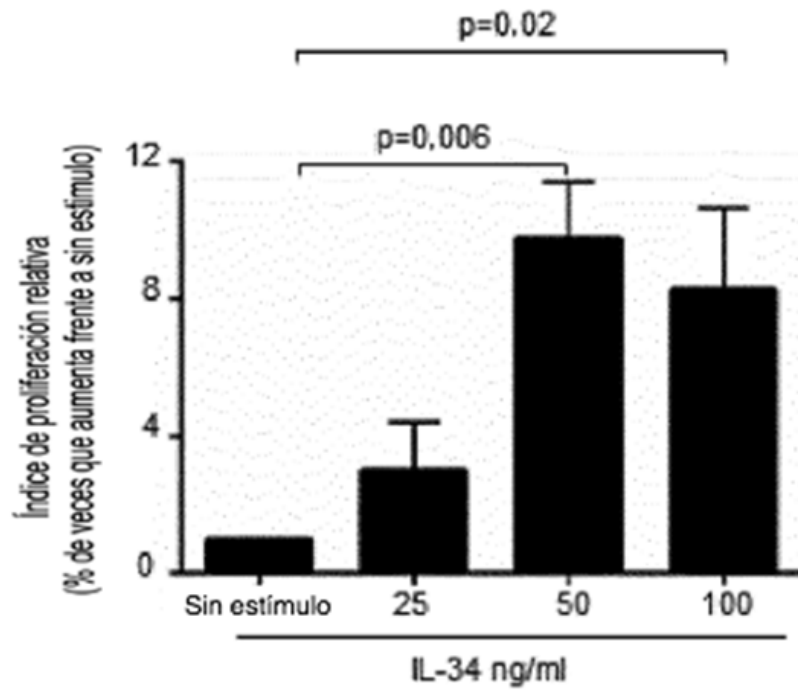
**FIG. 4C**



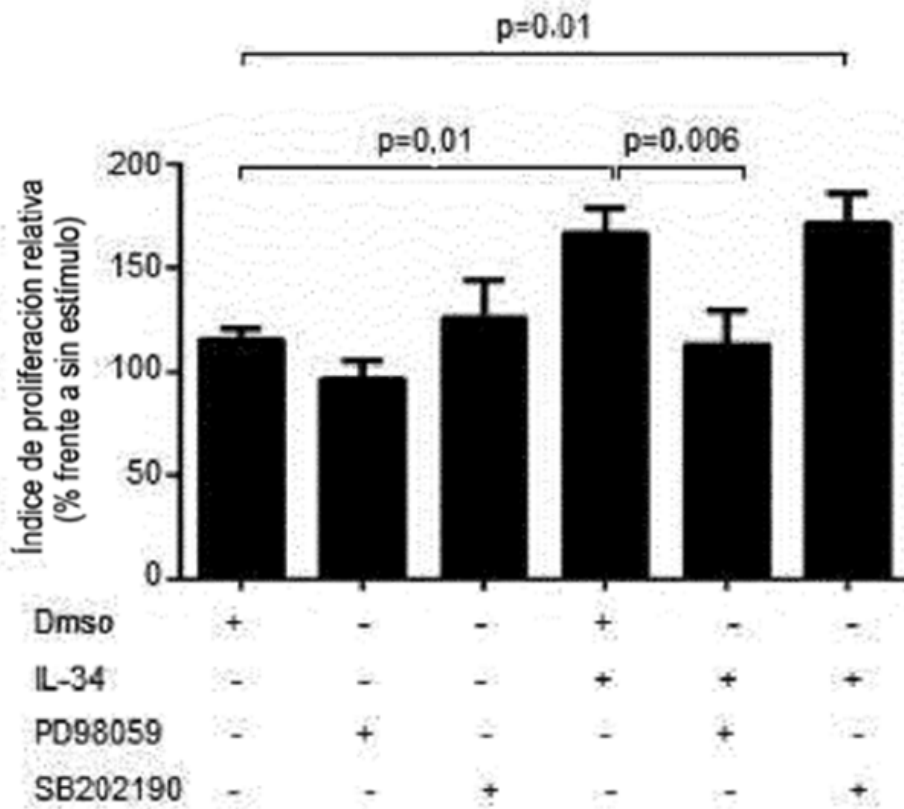
**FIG. 4D**



**FIG. 5A**

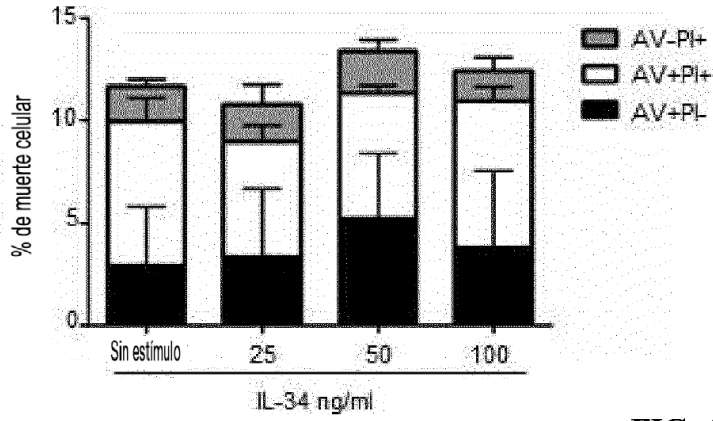


**FIG. 5B**

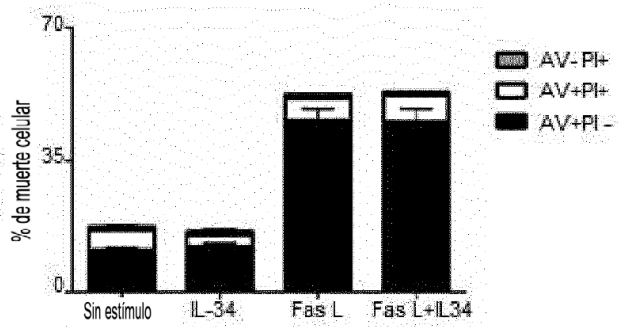


Dms	+	-	-	+	-	-
IL-34	-	-	-	+	+	+
PD98059	-	+	-	-	+	-
SB202190	-	-	+	-	-	+

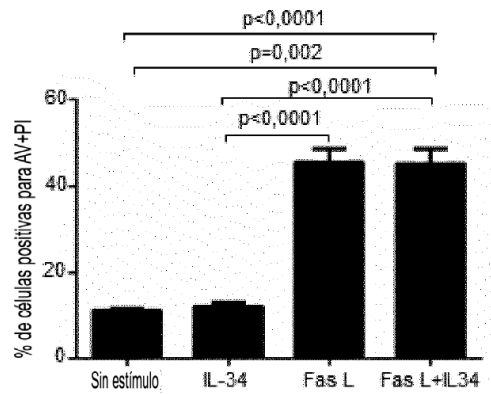
**FIG. 6A**



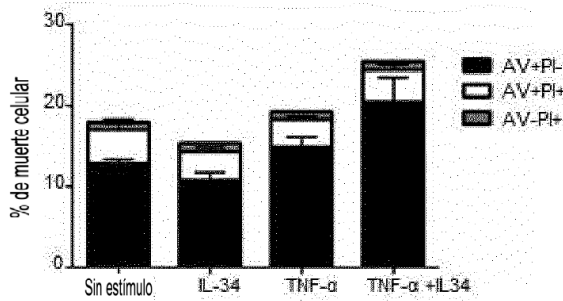
**FIG. 6B**



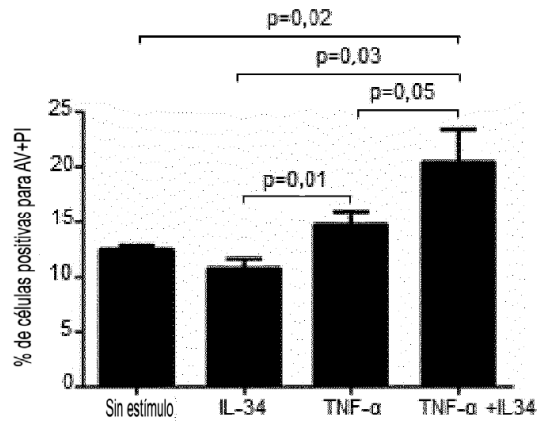
**FIG. 6C**



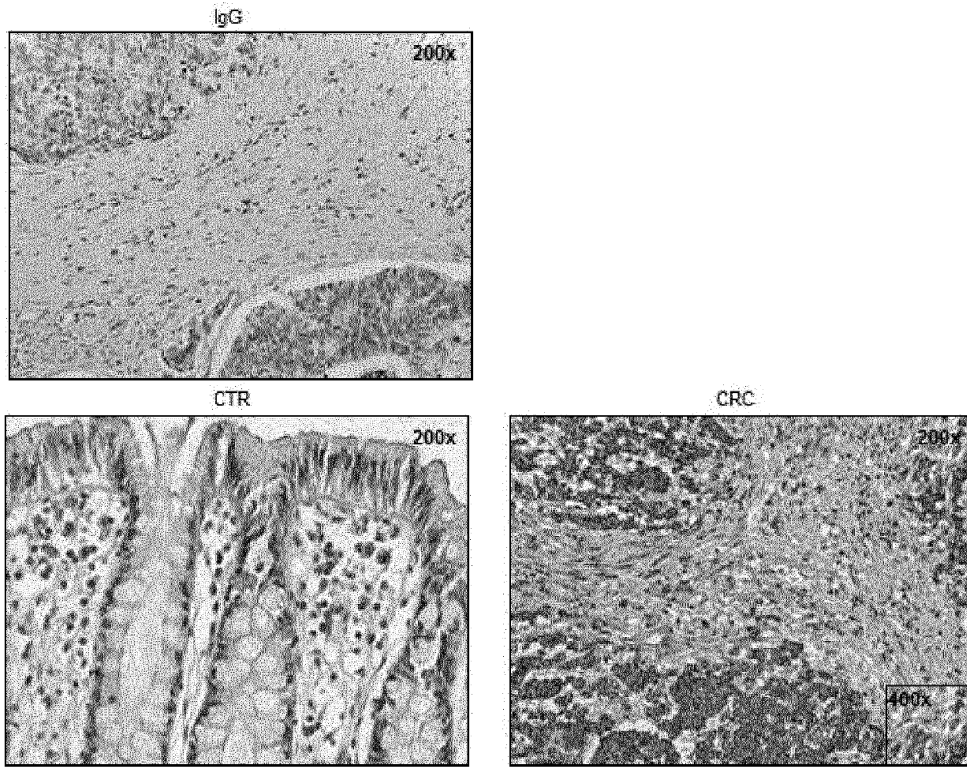
**FIG. 6D**



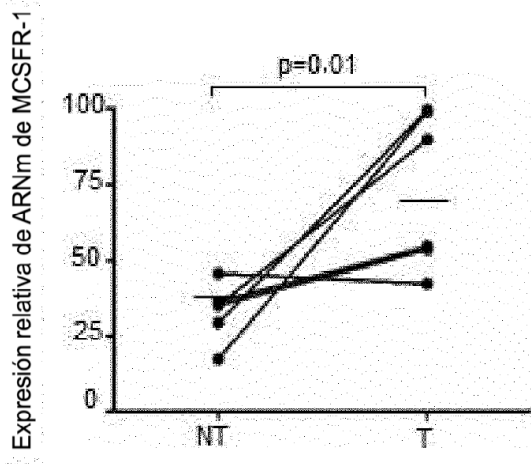
**FIG. 6E**



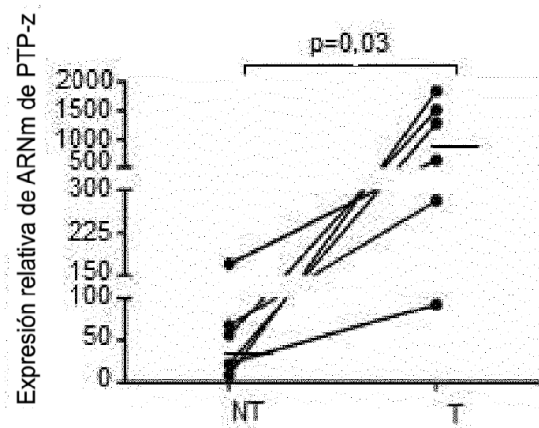
**FIG. 7A**



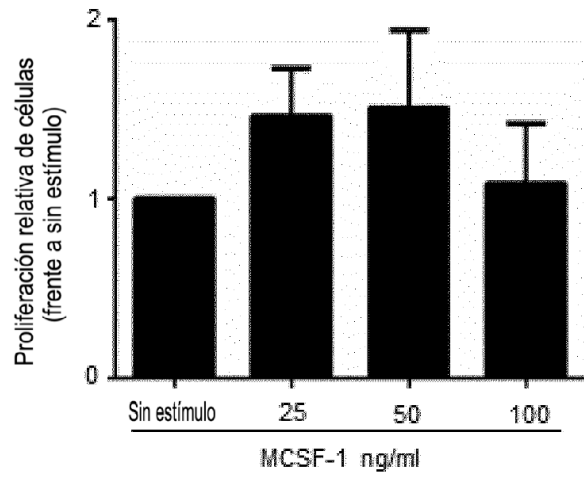
**FIG. 7B**



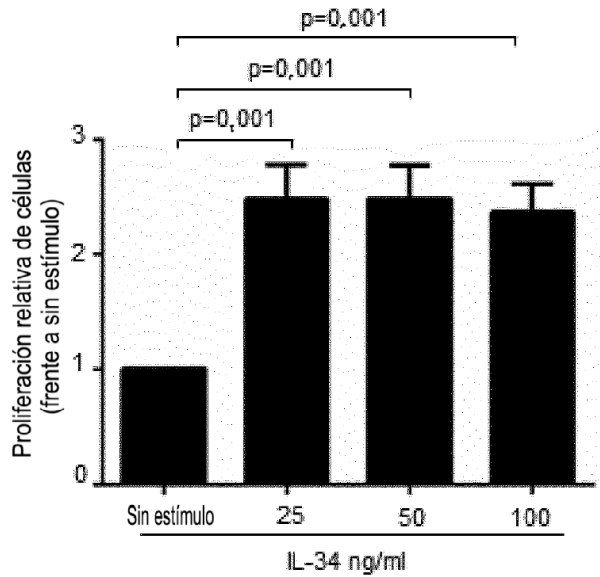
**FIG. 7C**



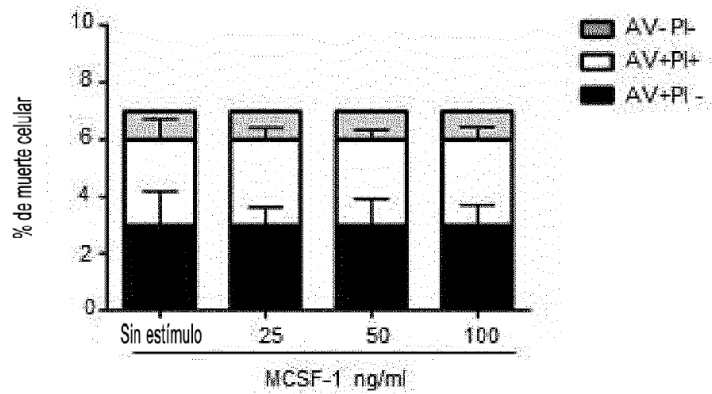
**FIG. 8A**



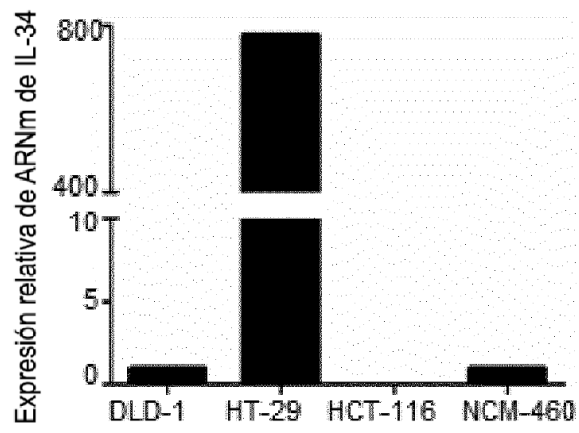
**FIG. 8B**



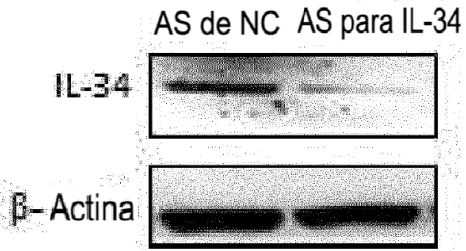
**FIG. 8C**



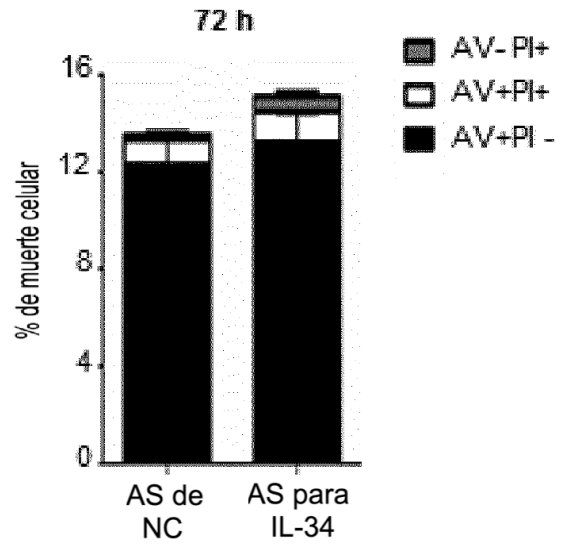
**FIG. 9**



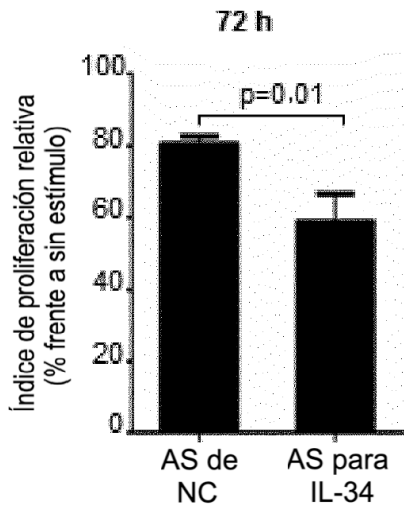
**FIG. 10A**



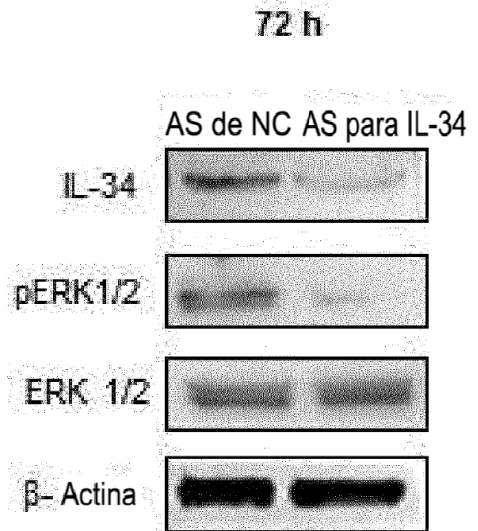
**FIG. 10B**



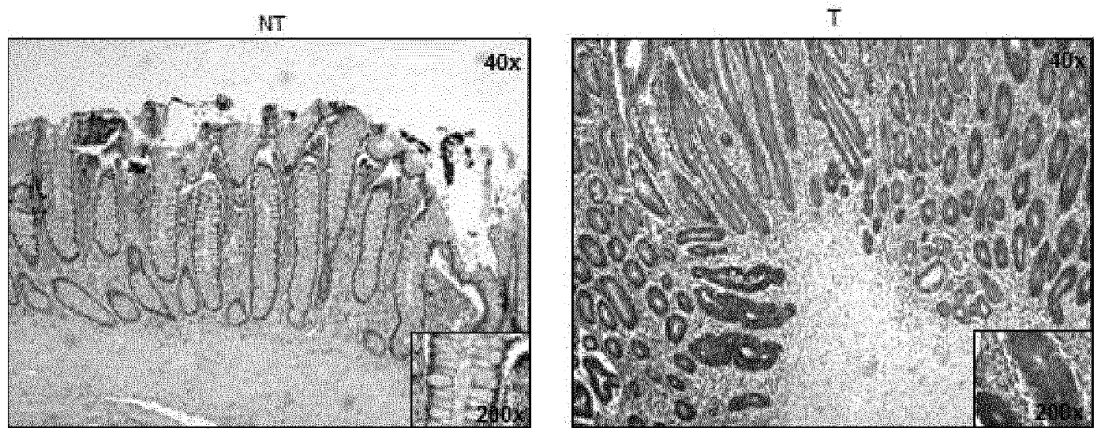
**FIG. 10C**



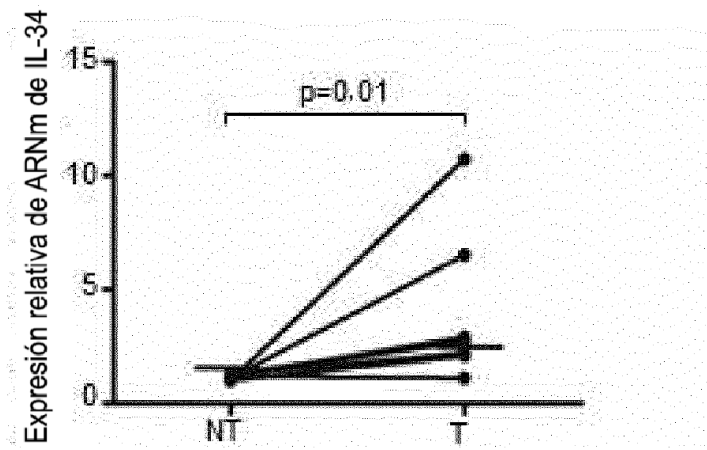
**FIG. 10D**



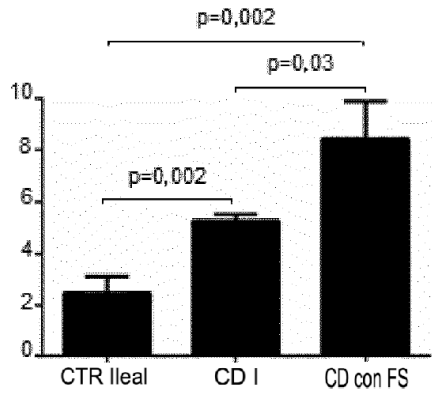
**FIG. 11A**



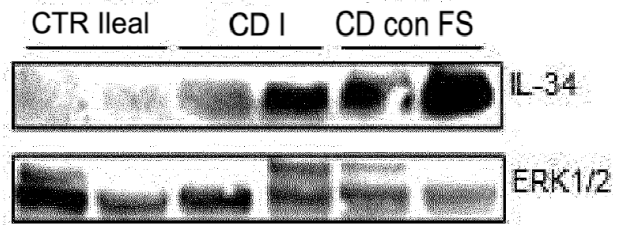
**FIG. 11B**



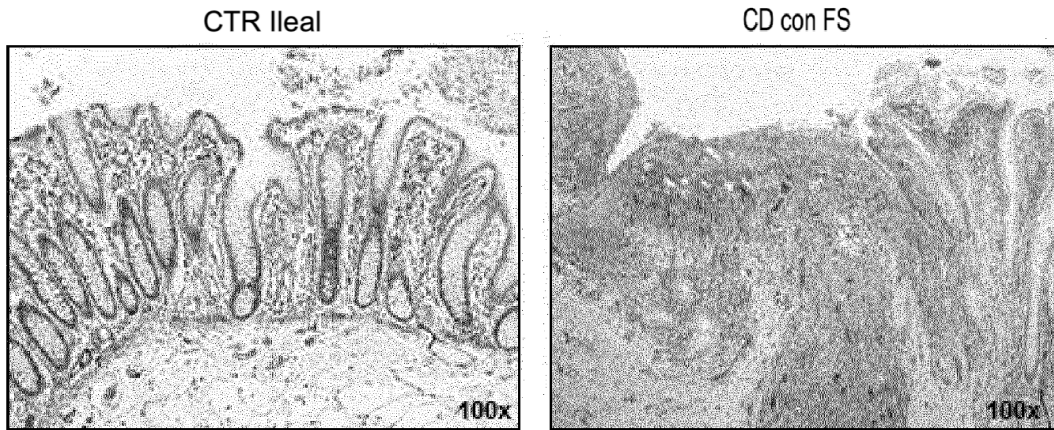
**FIG. 12A**



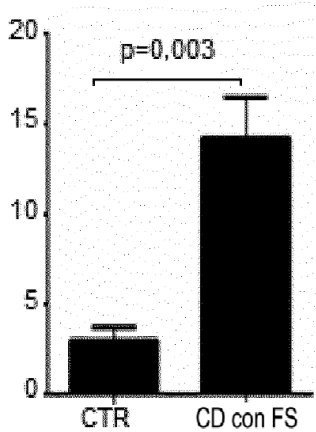
**FIG. 12B**



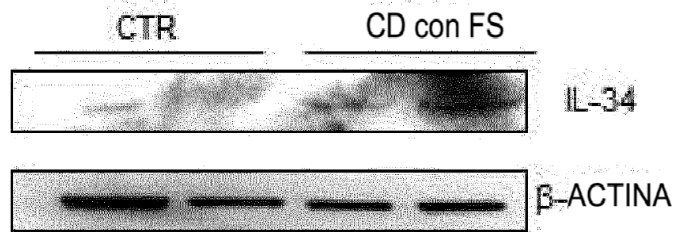
**FIG. 12C**



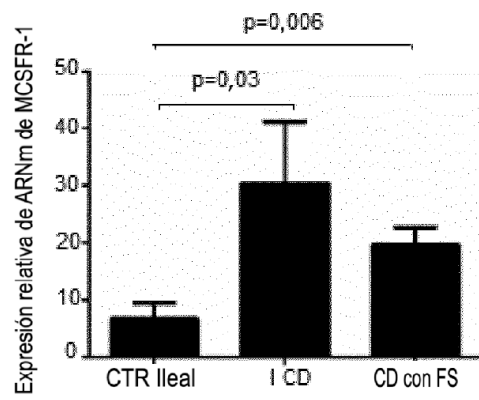
**FIG. 12D**



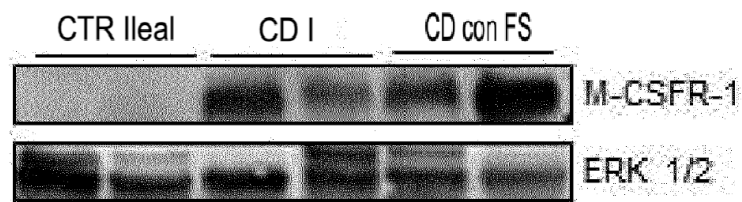
**FIG. 12E**



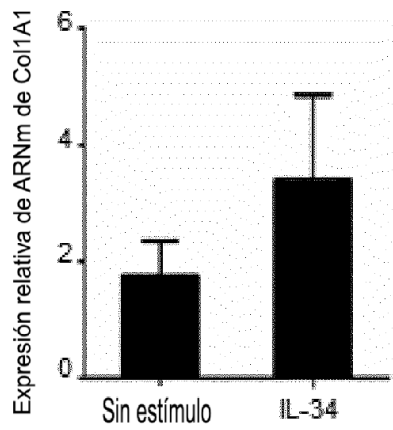
**FIG. 13A**



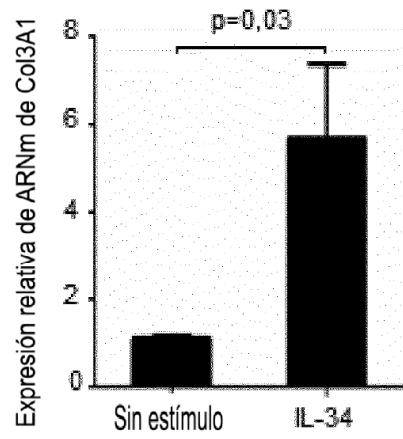
**FIG. 13B**



**FIG. 14A**



**FIG. 14B**



**FIG. 14C**

