

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 818**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2004 PCT/GB2004/004652**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2005 WO05046657**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2004 E 04798381 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 1686970**

54 Título: **Uso de un inhibidor de la actividad de CSF-1 para el tratamiento de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa**

30 Prioridad:

**05.11.2003 GB 0325836**

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

**03.12.2019**

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)  
Allée de la Recherche 60  
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**LAWSON, ALASTAIR, DAVID, G. y  
BOURNE, TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 733 818 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

Uso de un inhibidor de la actividad de CSF-1 para el tratamiento de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa

La presente invención se refiere, en general, al uso de inhibidores de la actividad de CSF-1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

5 El factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), también conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), es una citocina producida por una variedad de células, que incluyen macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. El CSF-1 está compuesto por dos polipéptidos "monómeros", que forman una proteína CSF-1 dimérica biológicamente activa. El CSF-1 existe en al menos tres formas maduras debido al corte y empalme de ARNm alternativo (véase, Cerretti et al. *Molecular Immunology*, 25:761 (1988)). Las tres formas de CSF-1 se traducen a partir  
10 de diferentes precursores de ARNm, que codifican monómeros polipeptídicos de 256 a 554 aminoácidos, que tienen una secuencia señal de 32 aminoácidos en el extremo amino y una supuesta región transmembrana de aproximadamente 23 aminoácidos cerca del extremo carboxilo. Los péptidos precursores se procesan posteriormente mediante escisiones proteolíticas de extremo amino y extremo carboxilo para liberar CSF-1 maduro. Los residuos 1-149 de las tres formas maduras de CSF-1 son idénticos y se cree que contienen secuencias esenciales para la actividad biológica de CSF-1. Los monómeros de CSF-1 *in vivo* se dimerizan a través de un enlace disulfuro y se glucosilan. El CSF-1 pertenece a un grupo de agonistas biológicos que promueven la producción de células sanguíneas. Específicamente, actúa como un factor de crecimiento y diferenciación para las células progenitoras de la médula ósea del linaje de fagocitos mononucleares. Además, el CSF-1 estimula la proliferación y la función de los macrófagos maduros a través de receptores específicos en células sensibles. El receptor de CSF-1 también se conoce  
15 como el producto del gen *c-fms* o CD115. Para revisión véase Roth y Stanley, 1992, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 181, 141-167.

La expresión "enfermedad inflamatoria intestinal" (EII) se refiere a los trastornos crónicos graves del tracto intestinal que se caracterizan por una inflamación crónica en diversos sitios del tracto gastrointestinal e incluye específicamente la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). La causa de la EII es desconocida, pero se piensa que es más  
25 común que surja de la activación inadecuada y continua del sistema inmunitario de la mucosa impulsada por la presencia de la flora luminal normal. Esta respuesta aberrante probablemente se ve facilitada por defectos tanto en la función de barrera del epitelio intestinal como en el sistema inmunitario de la mucosa, y se cree que tanto los factores genéticos como los ambientales contribuyen a la susceptibilidad a la EII (Podolsky, 2002, *N.Engl.J.Med*, 347, 6, 417-429). El tratamiento de la EII generalmente comienza con esteroides y fármacos con ácido 5-aminosalicílico, aunque existen problemas asociados con su uso a largo plazo. Además, aproximadamente el 30 % de los pacientes con EII no responden bien a ninguna de las dos terapias y requieren otros tratamientos, tales como agentes inmunosupresores e inmunorreguladores y cirugía (Sandborn, 1996, *Am.J.Gastroenterol*, 91, 423-432). La activación sostenida de las respuestas inmunitarias de la mucosa ha conducido a una caracterización extensa de las poblaciones de células inmunitarias y mediadores inflamatorios en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y en modelos murinos. Se ha observado un aumento en el número de macrófagos intestinales en EC y UC activas y parece que las células monocíticas están involucradas en todas las fases de la EII (Fiocchi, 1998, *Gastroenterology*, 115, 182-205). Se cree que las citocinas Th1 activan los macrófagos, que a su vez producen interleucina-12, interleucina-18 y factor inhibidor de la migración de macrófagos y, por lo tanto, estimulan aún más a Th1 en un ciclo autosostenido. Además, los macrófagos activados producen una potente mezcla de citocinas inflamatorias, que incluyen TNF, interleucina-1 e interleucina-6 (Podolsky, 2002, *N.Engl.J.Med*, 347, 417-429). La mucosa de los pacientes con EC establecida está dominada por linfocitos CD4+ con un fenotipo de linfocitos T auxiliares de tipo 1 (Th1) caracterizado por un aumento de la expresión de interferón  $\gamma$ , interleucina (IL)-2, seguido de un aumento posterior en la producción de las citocinas proinflamatorias TNF e IL-1 $\beta$ , y a continuación NF- $\kappa$ B, así como un aumento compensatorio en la citocina antiinflamatoria mediada por Th2, IL-10, y el factor de crecimiento transformante  $\beta$ . En la CU, la mucosa en los  
35 pacientes puede estar dominada por linfocitos CD4+ con un fenotipo de linfocitos T auxiliares de tipo 2 atípicos (Th2) y una respuesta de Th1 relativamente reducida. La respuesta de Th2 se caracteriza por un aumento de la expresión de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13.

Los muchos tipos celulares diferentes de citocinas y linfocitos T implicados en la EII representan todos dianas potenciales para el tratamiento de la EII y se están desarrollando muchos tratamientos diferentes cuyas dianas incluyen TNF, integrina  $\alpha$ 4, IL-2, IL-12, interferón  $\gamma$ , ICAM 1 y ligando CD-40 (Sandborn, 2002, *Gastroenterology*, 122, 1592-1608).  
50

Se desconoce si CSF-1 desempeña algún papel en la patogenia de la EII. Se sabe que CSF-1 tiene un papel en la producción de macrófagos en el intestino, ya que los ratones que carecen de CSF-1 pierden la población residente de macrófagos intestinales (Cecchini et al., 1994, *Development*, 120, 1357-1372). Se han observado niveles séricos aumentados de CSF-1 en pacientes con EII activa, en comparación con pacientes en remisión o controles sanos (Makiyama et al., *Gastroenterol. Jpn.* 1993, 28, 740). En un estudio de intestino inflamado con EII se observó un aumento significativo en el número de células que expresaban tanto el ARNm como la proteína de CSF-1 en la lámina propia; sin embargo, no hubo diferencias en los niveles generales de ARNm de CSF-1 en las biopsias de colon de la mucosa y no se observó una correlación entre los niveles de ARNm y el grado de inflamación de la mucosa en las biopsias. Ninguno de los cambios en la frecuencia o la distribución celular de la expresión de CSF-1 observados en el estudio fueron específicos de la EII, ya que hubo hallazgos similares en la tuberculosis intestinal y la colitis isquémica  
60

(Klebl, 2001, Journal of Pathology, 195, 609-615). El documento WO9943839 describe los inhibidores de RPTK anormal, el documento WO0067777 describe un método para regular negativamente el nivel funcional de moléculas producidas endógenamente y el documento US2002/141994 describe el método de tratamiento de la inflamación.

- 5 El CSF-1 se ha usado en el tratamiento de la inmunodepresión, en el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas, víricas o fúngicas, en la estimulación de los glóbulos blancos y en la cicatrización de heridas, mientras que los inhibidores de CSF-1 se han usado para tratar enfermedades tumorales (EP1223980). Los inhibidores de la actividad de CSF-1 son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, se han descrito anticuerpos neutralizantes contra CSF-1 y CSF-1R (Weir et al., 1996, J Bone Miner. Res.11, 1474-1481; Haran-Ghera et al., 1997, Blood, 89, 2537-2545) y también se han descrito antagonistas antisentido de CSF-1 (EP1223980).
- 10 Sorprendentemente, los inventores pudieron demostrar que los inhibidores de la actividad de CSF-1 están activos en un modelo animal de EII. Específicamente, los inventores pudieron demostrar que un anticuerpo anti-CSF-1 que inhibe la actividad de CSF-1 es activo en un modelo animal de EII. Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de un inhibidor de la actividad de CSF-1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.
- 15 La expresión "enfermedad inflamatoria intestinal" incluye enfermedades que se caracterizan por una inflamación crónica en diversos sitios del tracto gastrointestinal. Las enfermedades inflamatorias ilustrativas del intestino incluyen, pero no se limitan a, enteritis regionales (o enfermedad de Crohn), colitis ulcerosa idiopática, proctocolitis idiopática y colitis infecciosa.
- 20 La expresión "actividad de CSF-1", como se emplea en la presente memoria, se refiere al espectro de actividad entendido en la técnica para CSF-1, en particular la actividad de CSF-1 humano, es decir, cuando se aplica al ensayo estándar de estimulación de colonias *in vitro* de Metcalf, J.Cell.Physiol (1970) 76-89.
- 25 Un inhibidor de la actividad de CSF-1 según la presente invención es un agente que interfiere en la actividad de CSF-1, en particular la actividad de CSF-1 en la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa. Particularmente preferidos son los agentes que interfieren en la actividad de CSF-1 en la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa en seres humanos. Los inhibidores según la presente invención pueden inhibir parcial o completamente la actividad de CSF-1. Los inhibidores de uso en la presente invención incluyen, sin limitación, inhibidores que son capaces de interactuar con (p. ej., que se unen a o que reconocen) CSF-1 o el receptor de CSF-1 (CSF-1R) o una molécula de ácido nucleico que codifica CSF-1 o CSF-1R, o son capaces de inhibir la expresión de CSF-1 o CSF-1R o son capaces de inhibir la interacción entre CSF-1 y CSF-1R. Dichos inhibidores pueden ser anticuerpos o fragmentos activos funcionales de los mismos.
- 30 También se describen inhibidores que incluyen, pero no se limitan a, un fragmento funcional sintético del receptor de CSF-1 que se une a CSF-1 e interfiere en la unión al receptor de CSF-1 nativo, un anticuerpo que se une a CSF-1 o al receptor de CSF-1 e interfiere en la interacción receptor de CSF-1-ligando, una molécula de ácido nucleico antisentido que hibrida específicamente con ARNm que codifica CSF-1 o el receptor de CSF-1 o una molécula pequeña u otro fármaco que inhibe la actividad de CSF-1 o su receptor.
- 35 Los inhibidores de la actividad de CSF-1 son bien conocidos en la técnica, como lo son métodos para identificar y producir tales inhibidores. Los anticuerpos neutralizantes anti-CSF-1 se han descrito, por ejemplo, por Weir et al., 1996, J Bone Miner. Res.11, 1474-1481 y Haran-Ghera et al., 1997, Blood, 89, 2537-2545. Este último también describe anticuerpos anti-CSF-1R y también se han descrito antagonistas antisentido de CSF-1 (EP1223980).
- 40 También se describen agentes que pueden ser inhibidores adecuados y pueden seleccionarse de una amplia variedad de agentes candidatos. Los ejemplos de agentes candidatos incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos (p. ej. ADN y ARN), carbohidratos, lípidos, proteínas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y otros fármacos. Los agentes pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida o de fase en solución paralelas espacialmente direccionables; métodos de biblioteca sintética que requieren desconvolución; el método de la biblioteca "una perla-un compuesto"; y métodos de bibliotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de la biblioteca biológica es adecuado para las bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a las bibliotecas de compuestos peptídicos, oligómeros no peptídicos o de moléculas pequeñas (Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12:145; U.S. 5.738.996; y U.S. 5.807.683).
- 45 Ejemplos de métodos adecuados basados en la presente descripción para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en la técnica, por ejemplo en: DeWitt et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90:6909; Erb et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 91:11422; Zuckermann et al., 1994, J. Med. Chem. 37:2678; Cho et al., 1993, Science 261:1303; Carrell et al., 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carell et al., 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; y Gallop et al., 1994, J. Med. Chem. 37:1233.
- 50 Las bibliotecas de compuestos se pueden presentar, por ejemplo, en solución (p. ej. Houghten, 1992, Bio/Techniques 13:412-421), o sobre perlas (Lam, 1991, Nature 354:82-84), chips (Fodor, 1993, Nature 364:555-556), bacterias (US 5.223.409), esporas (US 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), plásmidos (Cull et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:1865-1869) o fagos (Scott y Smith, 1990, Science 249:386-390; Devlin, 1990, Science 249:404-406; Cwirla

et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 87:6378-6382; y Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222:301-310).

También se describe el inhibidor que puede ser un ácido nucleico. En particular, las moléculas de ácido nucleico de CSF-1 o CSF-1R pueden usarse como moléculas antisentido, para alterar la expresión de sus respectivos polipéptidos mediante la unión a ácidos nucleicos complementarios. Los ácidos nucleicos de CSF-1 o CSF-1 R pueden obtenerse usando técnicas de clonación estándar a partir de ADN genómico o ADNc o pueden sintetizarse usando técnicas bien conocidas y disponibles en el mercado. Los ácidos nucleicos de CSF-1 o CSF-1R pueden contener una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de CSF-1 o CSF-1R. Se pueden usar técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica para introducir mutaciones, incluyendo mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Un ácido nucleico antisentido incluye un ácido nucleico de CSF-1 o CSF-1R capaz de hibridar en virtud de cierta complementariedad de secuencia con una parte de un ARN (preferiblemente ARNm) que codifica el polipéptido respectivo. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una región codificante y/o no codificante de un ARNm que codifica dicho polipéptido. De la forma más preferible, los ácidos nucleicos antisentido dan como resultado la inhibición de la expresión del polipéptido de CSF-1 o CSF-1R. También se describe un método para el tratamiento y/o la profilaxis de la EII que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la actividad de CSF-1, en donde el inhibidor comprende al menos ocho nucleótidos que son antisentido para un gen o ADNc que codifica un polipéptido de CSF-1 o CSF-1R. También se describe el uso de ácidos nucleicos que comprenden al menos ocho nucleótidos que son antisentido para un gen o ADNc que codifica un polipéptido de CSF-1 o CSF-1R para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la EII. Ejemplos de secuencias se proporcionan en el documento EP1223980.

Según la invención, el inhibidor para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa es un anticuerpo que interactúa con (p. ej. se une a o reconoce) CSF-1 o su receptor e inhibe la actividad de CSF-1. Por consiguiente, se proporciona el uso de un anticuerpo que inhibe la actividad de CSF-1 para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.

En un ejemplo, los anticuerpos interactúan selectivamente con CSF-1. Interactuar selectivamente con (p. ej. reconocer o unirse a) significa que los anticuerpos tienen una mayor afinidad por los polipéptidos de CSF-1 que por otros polipéptidos. Ejemplos de anticuerpos adecuados son aquellos que inhiben la actividad de CSF-1 uniéndose a CSF-1 de tal manera que impiden que sea biológicamente activo impidiendo la unión de CSF-1 a su receptor. Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CSF-1 para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.

En otro ejemplo, los anticuerpos interactúan selectivamente con el receptor de CSF-1. Interactuar selectivamente con (p. ej. reconocer o unirse a) significa que los anticuerpos tienen una mayor afinidad por el polipéptido del receptor CSF-1 que por otros polipéptidos. Ejemplos de anticuerpos adecuados son aquellos que inhiben la actividad de CSF-1 impidiendo la señalización mediada por el CSF-1 desde el receptor impidiendo que el CSF-1 se una al receptor de CSF-1. Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CSF-1R para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.

Los polipéptidos de CSF-1 o del receptor de CSF-1 o células que expresan dichos polipéptidos se pueden usar para producir anticuerpos que reconocen específicamente dichos polipéptidos. Los polipéptidos de CSF-1 y CSF-1R pueden ser polipéptidos "maduros" o fragmentos biológicamente activos o derivados de los mismos. Preferiblemente, el polipéptido de CSF-1 contiene los aminoácidos 1-149 que se consideran importantes para la actividad biológica. Los polipéptidos de CSF-1 y CSF-1 R pueden prepararse mediante procesos bien conocidos en la técnica a partir de células huésped modificadas genéticamente que comprenden sistemas de expresión o pueden recuperarse de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se usan indistintamente a menos que se especifique lo contrario. Los polipéptidos de CSF-1 o CSF-1R pueden, en algunos casos, ser parte de una proteína más grande, tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada con una etiqueta de afinidad. Los anticuerpos generados contra estos polipéptidos pueden obtenerse administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos bien conocidos y rutinarios, véase por ejemplo Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Se pueden inmunizar muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas o cerdos. Sin embargo, generalmente se prefieren ratones, conejos, cerdos y ratas.

Los anticuerpos anti-CSF-1 y anti-receptor de CSF-1 para uso en la presente invención incluyen anticuerpos completos y fragmentos funcionalmente activos o derivados de los mismos y pueden ser, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, multivalentes, multiespecíficos, anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores.

Los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (p. ej. IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4:72) y la técnica de hibridoma-EBV (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, págs. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

- 5 Los anticuerpos para uso en la invención también pueden generarse usando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales clonando y expresando ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 93 (15):7843-7848, WO92/02551 y WO2004051268.

- 10 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, p. ej. US 5.585.089).

- 15 Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que han sido diseñados genéticamente para que los genes de las cadenas ligeras y pesadas estén compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Es probable que estos anticuerpos quiméricos sean menos antigénicos. Los anticuerpos bivalentes pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica (Milstein et al., 1983, *Nature* 305:537-539; WO 93/08829, Traunecker et al., 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659). Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo, WO 92/22853).

- 20 Los anticuerpos para uso en la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman et al. (en *J. Immunol. Methods*, 1995, 182:41-50), Ames et al. (*J. Immunol. Methods*, 1995, 184:177-186.), Kettleborough et al. (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24:952-958), Persic et al. (*Gene*, 1997 187 9-18.), Burton et al. (*Advances in Immunology*, 1994, 57:191-280) y WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 25 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108. Técnicas para la producción de anticuerpos de cadena única, como los descritos en US 4.946.778 también se puede adaptar para producir anticuerpos de cadena única contra los polipéptidos CSF-1 o CSF-1R. Además, pueden usarse ratones transgénicos u otros organismos, incluidos otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados.

- 30 Los fragmentos de anticuerpos y los métodos para producirlos son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181.

Los ejemplos particulares de fragmentos de anticuerpos para uso en la presente invención son fragmentos Fab' que poseen una región bisagra nativa o modificada. Ya se han descrito varias regiones bisagra modificadas, por ejemplo, en los documentos US 5.677.425, WO9915549 y WO9825971.

- 35 Otros ejemplos de fragmentos de anticuerpos particulares para uso en la presente invención incluyen los descritos en las solicitudes de patente internacional. PCT/GB2004/002810, PCT/GB2004/002870 y PCT/GB2004/002871 (todas presentadas el 1 de julio de 2004). En particular, los fragmentos Fab de anticuerpos modificados descritos en la solicitud de patente internacional PCT/GB2004/002810 son los preferidos.

- 40 Si se desea, un anticuerpo para uso en la presente invención puede conjugarse a una o más moléculas efectoras. El término molécula efectora, como se emplea en la presente memoria, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. ej. ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopia de RMN o REE. En un ejemplo, los anticuerpos anti-CSF-1 o anti CSF-1R pueden conjugarse 45 a una molécula efectora, tal como un agente citotóxico, un radionúclido o un resto de fármaco para modificar una respuesta biológica dada. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un resto de fármaco que puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichos restos pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria, una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno tisular, un agente trombotico o un agente antiangiogénico, p. ej. angiostatina 50 o endostatina, o un modificador de respuesta biológica tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento.

- 55 En otro ejemplo, las moléculas efectoras pueden ser citotoxinas o agentes citotóxicos, incluido cualquier agente que sea perjudicial para (p. ej. destruye) las células. Entre los ejemplos se incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Las moléculas

efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (p. ej. metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (p. ej. mecloretamina, tioepa-clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cis-platino) antraciclinas (p. ej. daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej. dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramycin (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas) y agentes antimetabólicos (p. ej. vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos tales como  $^{111}\text{In}$  y  $^{90}\text{Y}$ ,  $\text{Lu}^{177}$ , Bismuto $^{213}$ , Californio $^{252}$ , Iridio $^{192}$  y tungsteno $^{188}$ /Renio $^{188}$ ; o fármacos tales como alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras a anticuerpos son bien conocidas en la técnica (véase, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª ed., Robinson et al., Eds., 1987, págs. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123.). En un ejemplo, el anticuerpo o fragmento del mismo se fusiona a través de un enlace covalente (p. ej. un enlace peptídico), opcionalmente en el extremo N o en el extremo C, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o una parte de la misma; preferiblemente al menos una parte de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína). Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento del mismo, está unido a la otra proteína en el extremo N del dominio constante del anticuerpo. Se pueden usar procedimientos de ADN recombinante para crear dichas fusiones, por ejemplo, como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP 0392745.

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semivida *in vivo*, y/o disminuir la inmunogenicidad y/o mejorar la administración de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas incluyen polímeros y proteínas tales como albúmina y proteínas de unión a albúmina. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen cualquier polímero sintético o natural sustancialmente soluble en agua, sustancialmente no antigénico, incluyendo polímeros de polialquileno, polialquilenileno o polioxialquilenileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o polisacáridos ramificados o no ramificados, p. ej., un homo- o heteropolisacárido tal como lactosa, amilosa, dextrano o glucógeno. Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi. Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol). Preferiblemente, el polímero es un óxido de polialquilenileno tal como polietilenglicol (PEG).

En un ejemplo, los anticuerpos para uso en la presente invención se unen a restos de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden unirse a través de cualquier grupo funcional de aminoácidos de cadena lateral o de aminoácido terminal disponible ubicado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden aparecer naturalmente en el fragmento de anticuerpo o pueden ser modificados genéticamente en el fragmento usando métodos de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, el documento US 5.219.996. Se pueden usar múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG. Preferiblemente, las moléculas de PEG están unidas covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden usar moléculas efectoras activadas apropiadamente, por ejemplo, derivados selectivos de tiol, tales como maleimidados y derivados de cisteína.

Preferiblemente, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado que está PEGilado, es decir tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente al mismo, p. ej. según el método descrito en el documento EP 0948544 y las solicitudes internacionales de patente PCT/GB2004/002810, PCT/GB2004/002870 y PCT/GB2004/002871 (todas presentadas el 1 de julio de 2004) [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54:531-545]. La cantidad total de PEG unido al fragmento puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de 250 a 100 000 Da, preferiblemente de 5000 a 50 000 Da, más preferiblemente de 10 000 a 40 000 Da y aún más preferiblemente de 20 000 a 40 000 Da. El tamaño del PEG se puede seleccionar, en particular, sobre la base del uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de ubicarse en ciertos tejidos como tumores o extender la semivida circulante (para una revisión, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545).

Preferiblemente, el anticuerpo es un fragmento Fab' modificado y el PEG está unido a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab' modificado con PEG tiene un grupo de maleimida unido covalentemente a un solo grupo tiol en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina puede unirse covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina se le puede unir un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab' puede, por lo tanto, ser aproximadamente 40 000 Da.

En otra realización preferida, un fragmento de anticuerpo para uso en la presente invención es un fragmento Fab PEGilado (es decir, tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente al mismo) como se describe en el número de solicitud internacional PCT/GB2004/002810 (presentada el 1 de julio de 2004). Preferiblemente, el fragmento Fab

PEGilado tiene un PEG unido a cada cisteína entre cadenas. Preferiblemente, cada PEG unido a una cisteína entre cadenas tiene un peso molecular de 20 000 Da y el peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab es 40 000 Da.

Para identificar inhibidores de la actividad de CSF-1, los expertos en la técnica pueden tomar una serie de enfoques diferentes. En un ejemplo, los inhibidores se identifican identificando primero los agentes que interactúan con CSF-1 o CSF-1R y, posteriormente, probando esos agentes para identificar aquellos que inhiben la actividad de CSF-1. En uno de estos ejemplos, el agente es un anticuerpo.

Los agentes que interactúan con CSF-1 o CSF1-R pueden identificarse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, usando un sistema de ensayo libre de células o basado en células donde el polipéptido de CSF-1 o CSF-1R se pone en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad de un agente candidato para interactuar con un polipéptido de CSF-1 o CSF-1R se compara con un rango o control de referencia. Si se desea, este ensayo se puede usar para detectar una pluralidad (p. ej. una biblioteca) de agentes candidatos usando una pluralidad de muestras de polipéptidos de CSF-1 o CSF-1R. En un ejemplo de un ensayo libre de células, una primera y una segunda muestra que comprenden el polipéptido de CSF-1 o CSF-1R nativo o recombinante se ponen en contacto con un agente candidato o un agente de control y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido comparando la diferencia en la interacción entre el agente candidato y el agente de control. Preferiblemente, el polipéptido se inmoviliza primero, por ejemplo, poniendo en contacto el polipéptido con un anticuerpo inmovilizado que lo reconoce y se le une específicamente, o poniendo en contacto una preparación purificada de polipéptido con una superficie diseñada para unirse a proteínas. El polipéptido puede estar parcial o completamente purificado (p. ej. parcial o completamente libre de otros polipéptidos) o ser parte de un lisado celular. Además, el polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprende el polipéptido de CSF-1 o CSF1-R o una parte biológicamente activa del mismo y un dominio tal como glutatiónina-S-transferasa o la región Fc de IgG1. Como alternativa, el polipéptido puede ser biotinilado usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (p. ej. kit de biotilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL). La capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido se puede determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, ELISA, BIAcore™, citometría de flujo o tecnología de ensayo de microvolúmenes fluorescentes (FMAT). En otro ejemplo, cuando se usa un ensayo basado en células, una población de células que expresan CSF-1 o CSF-1R se pone en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad de un agente candidato para interactuar con CSF-1 o CSF-1R se compara con un rango o control de referencia. La célula puede ser de origen eucariota (p. ej. levadura o mamífero) y puede expresar el polipéptido de CSF-1 o CSF-1R de forma endógena o puede modificarse genéticamente para expresar el polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de CSF-1 o CSF-1R o el agente candidato está marcado, por ejemplo, con una marca radioactiva (tal como <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S o <sup>125</sup>I) o una marca fluorescente (tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído o fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre un polipéptido y un agente candidato. También se pueden usar métodos alternativos tales como ELISA, citometría de flujo y FMAT.

Los agentes que inhiben la actividad de CSF-1 pueden identificarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante:

(i) comparación de la actividad de CSF-1 en presencia de un agente candidato con la actividad de dicho polipéptido en ausencia del agente candidato o en presencia de un agente de control; y

(ii) determinando si el agente candidato inhibe la actividad de CSF-1

Dichos ensayos pueden usarse para seleccionar agentes candidatos, en la monitorización clínica o en el desarrollo de fármacos.

Como se describió anteriormente, los agentes pueden someterse a una evaluación previa cuando sea apropiado (por ejemplo, un anticuerpo) para identificar agentes que interactúan con CSF-1 o CSF-1R antes de seleccionar aquellos agentes que se unen por su capacidad para inhibir la actividad de CSF-1.

En un ejemplo, se usa un sistema de ensayo basado en células para identificar agentes capaces de inhibir la actividad de CSF-1. En un ejemplo particular, el ensayo usado para identificar los inhibidores de la actividad de CSF-1 es el ensayo estimulante de colonias estándar *in vitro* de Metcalf, 1970, J. Cell.Physiol.76-89 en el que CSF-1 es capaz de estimular la formación de colonias de macrófagos. Los inhibidores potenciales se añaden al ensayo y la proliferación de macrófagos se mide mediante cualquier método adecuado, tal como incorporación de <sup>3</sup>H timidina o conversión de colorante de formazán. Por lo tanto, la inhibición se mide como una reducción de la proliferación en comparación con los controles.

En otro ejemplo, los inhibidores de CSF-1 pueden regular negativamente la expresión del polipéptido de CSF-1 o CSF-1R, por ejemplo, inhibidores antisentido. Dichos inhibidores pueden identificarse por cualquier método conocido en la técnica. En un ejemplo, dichos inhibidores se identifican en un sistema de ensayo basado en células. Por consiguiente, una población de células que expresan un polipéptido o ácido nucleico de CSF-1 o CSF-R se ponen en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para alterar la expresión del polipéptido o ácido nucleico de CSF-1 o CSF-1R mediante comparación con un rango o control de referencia. En un ejemplo, las

5 poblaciones de células que expresan un polipéptido de CSF-1 o CSF1-R se ponen en contacto con un agente candidato o un agente de control y la capacidad del agente candidato para alterar la expresión de los polipéptidos o ácidos nucleicos de CSF-1 o CSF-1R se determinan comparando la diferencia en el nivel de expresión de los polipéptidos o ácidos nucleicos de CSF-1 o CSF-1R entre las poblaciones de células tratadas y de control. Si se desea, este ensayo se puede usar para seleccionar una pluralidad (por ejemplo, una biblioteca) de agentes candidatos. La célula, puede ser de origen eucariota (p. ej. levadura o mamífero) y puede expresar un polipéptido de CSF-1 o CSF-1R de forma endógena o estar modificada genéticamente para expresar un polipéptido de CSF-1 o CSF-1R. La capacidad de los agentes candidatos para alterar la expresión de dichos polipéptidos o ácidos nucleicos puede determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo y sin limitación, mediante citometría de flujo, radiomarcado, un ensayo de centelleo, inmunoprecipitación, análisis de transferencia de Western, análisis de transferencia Northern o RT-PCR.

10 Los agentes que inhiben la actividad de CSF-1 pueden identificarse o probarse adicionalmente, para determinar las cantidades terapéuticamente eficaces en uno o más modelos animales. Los ejemplos de animales adecuados incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, monos, cobayas, perros y gatos. Preferiblemente, el animal usado representa un modelo de EII.

15 En un ejemplo en el que el agente inhibe la expresión de CSF-1 o CSF-1R, se administra a un primer y segundo grupo de mamíferos un agente candidato o un agente de control y la capacidad del agente candidato para inhibir la expresión del polipéptido o ácido nucleico de CSF-1 o CSF-1R se determina comparando la diferencia en el nivel de expresión entre el primer y segundo grupo de mamíferos. Cuando se desee, los niveles de expresión de los polipéptidos o ácido nucleico de CSF-1 o CSF-1R en el primer y segundo grupo de mamíferos se pueden comparar con el nivel de polipéptido o ácido nucleico de CSF-1 o CSF-1R en un grupo de control de mamíferos. El agente candidato o un agente de control pueden administrarse por medios conocidos en la técnica (p. ej. por vía oral, rectal o parenteral tal como, intraperitoneal o intravenosa). Los cambios en la expresión de un polipéptido o ácido nucleico pueden evaluarse mediante los métodos descritos anteriormente.

20 En otro ejemplo, la inhibición de la actividad de CSF-1 se puede determinar monitorizando una mejoría o mejora en los síntomas de la enfermedad, un inicio retrasado o una progresión lenta de la enfermedad, por ejemplo, pero sin limitación, una reducción en la pérdida de peso o diarrea. Las técnicas conocidas por los médicos familiarizados con la EII se pueden usar para determinar si un agente candidato ha alterado uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

25 En la técnica se conocen varios modelos diferentes de EII. Estos incluyen colitis inducida por DSS en ratones o ratas, colitis inducida por TNBS en ratones o ratas, transferencia de células CD45RBhi en ratones SCID o RAG1-/-, ratones IL-10-/-, ratones IL2-/-, ratas transgénicas HLA-B27, enteritis inducida por indometacina en ratas y titis de cabeza blanca (Véase Elson et al., *Gastroenterology*, 1995; 109, 1344-1367; Mizoguchi et al., *Inflammatory Bowel Disease*, 2003; 9 (4), 246-259). En general, los diferentes modelos tienden a mostrar signos de colitis, tales como pérdida de peso y diarrea con o sin presencia de sangre. Los intestinos generalmente mostrarán un infiltrado inflamatorio y la extensión de esto y el sitio exacto de la enfermedad pueden variar entre los modelos. Por lo tanto, los síntomas que se miden durante el tratamiento variarán entre los modelos, pero típicamente incluirán medir la pérdida de peso o la presencia de diarrea y también pueden incluir la búsqueda de mejoras histológicas, tales como la reducción del infiltrado inflamatorio o el daño reducido a las criptas.

30 Como se discute en la presente memoria, los inhibidores de la actividad de CSF-1 pueden usarse en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa. Para dicho uso, los agentes se administrarán generalmente en forma de una composición farmacéutica.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la actividad de CSF-1 y un diluyente, excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 El término "tratamiento" incluye terapia terapéutica o profiláctica. Cuando se hace referencia en la presente memoria a un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección usando un inhibidor particular o una combinación de inhibidores, debe entenderse que dicha referencia pretende incluir el uso de ese inhibidor o combinación de inhibidores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.

40 La composición generalmente se suministrará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado de administración a un paciente).

45 Los inhibidores de uso en la invención se administran preferiblemente a un sujeto por vía oral o intrarrectal, pero también pueden administrarse por una variedad de otras vías tales como transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa e intramuscular. La vía más adecuada para la administración en cualquier caso dependerá del inhibidor particular, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto.

50 Los inhibidores de uso en la invención pueden administrarse en combinación, p. ej. de forma simultánea, secuencial o por separado, con uno o más compuestos terapéuticamente activos, que pueden ser terapias anti-EII o terapias

contra el cáncer.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis. Dicha unidad puede contener de 750 mg/kg a 0,1 mg/kg dependiendo de la afección que se esté tratando, la vía de administración y la edad, el peso y la condición del sujeto.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso en la invención pueden asumir una amplia variedad de formas dependiendo, p. ej. de la vía de administración.

Las composiciones para administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las preparaciones orales líquidas pueden estar en forma de suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Las preparaciones líquidas orales pueden contener agentes de suspensión como se conoce en la técnica.

En el caso de preparaciones sólidas orales tales como polvos, cápsulas y comprimidos, se pueden incluir vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma de unidad de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso generalmente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Además de las formas de dosificación comunes expuestas anteriormente, los agentes activos de la invención también pueden administrarse por medios y/o dispositivos de administración de liberación controlada. Los comprimidos y cápsulas pueden comprender vehículos o excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para la formación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; disgregantes, por ejemplo almidón de patata; o agentes humectantes aceptables tales como lauril sulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas estándar acuosas o no acuosas según métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, cada una de las cuales contiene una cantidad predeterminada del agente activo, como un polvo o gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Dichas composiciones pueden prepararse por cualquiera de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen la etapa de asociar el agente activo con el vehículo, que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando de manera uniforme e íntima el agente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si es necesario, conformando el producto en la presentación deseada. Por ejemplo, un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden prepararse como soluciones o suspensiones de los agentes activos de la invención en agua adecuadamente mezclada con un agente tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones de inyección estériles acuosas o no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la composición sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las soluciones para inyección, dispersiones y suspensiones extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. En una realización preferida, una composición farmacéutica de la invención se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin agujas, tal como los dispositivos descritos en los documentos US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: el documento US 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; el documento US 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; el documento US 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicamentos para administrar medicamentos a una velocidad de infusión precisa; el documento US 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; el documento US 4.439.196, que describe un sistema de administración osmótica de fármacos que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y el documento US 4.475.196, que describe un sistema de administración osmótica de fármacos. Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, apósitos impregnados, pulverizaciones, aerosoles

o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos para espolvorear. Estas composiciones pueden prepararse mediante métodos convencionales que contienen el agente activo. Por lo tanto, también pueden comprender vehículos y aditivos convencionales compatibles, tales como conservantes, disolventes para ayudar a la penetración de medicamentos, emolientes en cremas o pomadas y etanol o alcohol oleílico para lociones. Dichos vehículos pueden estar presentes desde el 1 % hasta el 98 % de la composición. Más habitualmente formarán hasta el 80 % de la composición. Solo a modo de ilustración, se prepara una crema o pomada mezclando cantidades suficientes de material hidrófilo y agua, que contiene del 5 al 10 % en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o pomada que tenga la consistencia deseada.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. El agente activo puede administrarse desde el parche mediante iontoforesis.

Para aplicaciones en tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las composiciones se aplican, preferiblemente, como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el agente activo puede emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, el agente activo puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, pastillas y enjuagues bucales.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en el ojo incluyen gotas oftálmicas en las que el agente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. También incluyen cremas o pomadas tópicas como anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal en donde el vehículo es un sólido se presentan, de la forma más preferible, como supositorios de dosis unitaria. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao u otro glicérido o materiales comúnmente usados en la técnica, y los supositorios pueden formarse convenientemente mediante la mezcla de la combinación con el o los vehículos ablandados o fundidos, seguido de enfriar y moldear los moldes. También se pueden administrar como enemas.

La dosis que se administrará de un inhibidor de la actividad de CSF-1 variará según el inhibidor particular, el tipo de EII, el sujeto y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto, y la vía de administración seleccionada; la dosis apropiada puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. Para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa en seres humanos y animales, se pueden administrar a los pacientes composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos (p. ej. sujetos humanos) en dosis terapéutica o profilácticamente eficaces (p. ej. dosis que resultan en la inhibición de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa y/o el alivio de los síntomas de la enfermedad de Crohn o de la colitis ulcerosa), usando cualquier vía de administración adecuada, tal como inyección y otras vías de administración conocidas en la técnica para productos clínicos, tales como productos clínicos basados en anticuerpos.

Las composiciones pueden contener del 0,1 % en peso, preferiblemente del 10-60 %, o más, en peso, del inhibidor de la invención, dependiendo del método de administración.

Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad y el espaciado óptimos de las dosis individuales de un inhibidor de la invención se determinarán por la naturaleza y el alcance de la afección que se trata, la forma, la vía y el sitio de administración, y la edad y el estado del sujeto en particular que está siendo tratado, y que un médico determinará en última instancia las dosis apropiadas que se usarán. Esta dosis puede repetirse tan a menudo como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o la frecuencia de la dosis se pueden alterar o reducir, de acuerdo con la práctica clínica normal.

En otro ejemplo, cuando el inhibidor es un ácido nucleico, este puede administrarse mediante terapia génica (véase, por ejemplo, Hoshida, T. et al., 2002, *Pancreas*, 25:111-121; Ikuno, Y. 2002, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002 43:2406-2411; Bollard, C., 2002, *Blood* 99:3179-3187; Lee E., 2001, *Mol. Med.* 7:773-782). La terapia génica se refiere a la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En un ejemplo, este es el ácido nucleico de CSF-1 o CSF-1R o partes de los mismos. Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica se puede usar de acuerdo con la presente invención.

La administración del ácido nucleico terapéutico a un paciente puede ser terapia génica directa *in vivo* (es decir, el paciente está expuesto directamente al ácido nucleico o al vector que contiene ácido nucleico) o terapia génica indirecta *ex vivo* (es decir, las células se transforman primero con el ácido nucleico *in vitro* y después se trasplantan en el paciente).

Por ejemplo para la terapia génica *in vivo*, un vector de expresión que contiene el ácido nucleico de CSF-1 o CSF-1R puede administrarse de tal manera que se convierta en intracelular, es decir, por infección usando un retroviral defectuoso o atenuado u otros vectores virales como se describe, por ejemplo, en el documento US 4.980.286 o por Robbins et al., 1998, *Pharmacol. Ther.* 80:35-47.

- Los diversos vectores retrovirales que se conocen en la técnica son tales como los descritos en Miller et al. (1993, Meth. Enzymol. 217:581-599) que se han modificado para eliminar aquellas secuencias retrovirales que no son necesarias para el empaquetamiento del genoma viral y su posterior integración en el ADN de la célula huésped. También se pueden usar vectores adenovirales que son ventajosos debido a su capacidad para infectar células que no se dividen y dichos vectores adenovirales de alta capacidad se describen en Kochanek (1999, Human Gene Therapy, 10: 2451-2459). Los vectores virales quiméricos que pueden usarse son los descritos por Reynolds et al. (1999, Molecular Medicine Today, 1:25-31). Los vectores híbridos también se pueden usar y se describen por Jacoby et al. (1997, Gene Therapy, 4:1282-1283).
- También puede usarse en terapia génica inyección directa de ADN desnudo o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p. ej. Gene Gun®; Biolistic, Dupont) o mediante recubrimiento con lípidos. Pueden usarse receptores de la superficie celular/compuestos transfectantes o mediante encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas o administrando el ácido nucleico en un enlace a un péptido que se sabe que entra en el núcleo o administrándolo en enlace a un ligando predispuesto a la endocitosis mediada por receptores (Véase Wu & Wu, 1987, J. Biol. Chem., 262:4429-4432) para dirigir a tipos de células que expresan específicamente los receptores de interés.
- En terapia génica *ex vivo*, un gen se transfiere a las células *in vitro* usando cultivo de tejidos y las células se suministran al paciente mediante diversos métodos, tales como inyección subcutánea, aplicación de las células en un injerto de piel e inyección intravenosa de células sanguíneas recombinantes, tales como células madre o progenitoras hematopoyéticas.
- Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico de CSF-1 o CSF-1R para los fines de la terapia génica incluyen células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos y células sanguíneas. Las células sanguíneas que pueden usarse incluyen linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos, células hematopoyéticas o células progenitoras.
- En un aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención comprende un ácido nucleico de CSF-1 o CSF-1R, siendo dicho ácido nucleico parte de un vector de expresión que expresa un polipéptido de CSF1 o CSF-1R o una proteína quimérica del mismo en un huésped adecuado. En particular, dicho ácido nucleico tiene un promotor unido operativamente a la región codificante del polipéptido, siendo dicho promotor inducible o constitutivo (y, opcionalmente, específico de tejido).
- La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos.
- Figura 1. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1 sobre el peso corporal de ratones después de la adición de DSS (1 %) en agua potable. Análisis estadístico mediante ANOVA con la prueba posterior de Bonferroni:  $^{***}P < 0,01$ ,  $^{***}P < 0,001$  anticuerpo de control (101.4) frente a animales normales.  $^{\#}P < 0,05$ ,  $^{##}P < 0,01$ ,  $^{###}P < 0,001$  101.4 frente a anti CSF-1.
- Figura 2. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1 sobre la longitud del colon de ratones después de la adición de DSS (1 %) en agua potable durante 8 días. Análisis estadístico por ANOVA con la prueba posterior de Bonferroni.
- Figura 3a. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1 sobre la puntuación de gravedad de la enfermedad colónica de ratones después de la adición de DSS (1 %) en agua potable. Puntuación de la enfermedad: 1 = heces blandas/diarrea; 2 = signos de sangre en el intestino/heces; 4 = sangrado profuso del ano.  $^{**}P < 0,01$  analizado por Mann Whitney.
- Figura 3b. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1 sobre la puntuación de gravedad de la enfermedad clínica de ratones después de la adición de DSS (1 %) en agua potable. Enfermedad calificada como puntuación de enfermedad intestinal más puntuación de pérdida de peso: puntuación de enfermedad intestinal: 1 = heces blandas/diarrea; 2 = signos de sangre en el intestino/heces; 4 = sangrado profuso del ano. Puntuación de pérdida de peso: 1 = 5-10 %; 2 = 10-15 %; 4 = 15-25% de pérdida de peso.  $^{**}P < 0,01$ ;  $^{***}P < 0,01$  analizado por Mann Whitney.
- Figura 4a. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1 sobre células GR1 alto+ CD45+/mm en población de lámina propia de colon de ratones en el día 8 después del DSS (1 %). Análisis estadístico por ANOVA con la prueba posterior de Bonferroni.
- Figura 4b. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1 sobre células CD3+ CD45+ células/mm en población de lámina propia de colon de ratones en el día 8, después del DSS (1 %). Análisis estadístico por ANOVA con la prueba posterior de Bonferroni.
- Figura 5. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1 sobre el recuento de células CD3+ de colonos de ratones en el día 8 después del DSS (1 %). Análisis estadístico por ANOVA con la prueba posterior de Bonferroni.
- Figura 6. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1 sobre el recuento de células F4/80+ de colonos de ratones en el día 8, después del DSS (1 %). Análisis estadístico por ANOVA con la prueba posterior de Bonferroni.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Aislamiento de un anticuerpo anti-CSF-1

Los conejos se inmunizaron con CSF-1 de ratón y usando un ensayo de placa hemolítica con glóbulos rojos de oveja biotinilados recubiertos con CSF-1 murino mediante estreptavidina, se aislaron 15 genes de anticuerpos usando los métodos descritos por Babcook et al., 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93, 7843-7848 y en el documento WO92/02551. Los genes de anticuerpos se expresaron en células CHO y los anticuerpos recombinantes se examinaron por su capacidad para neutralizar CSF-1 murino en un ensayo de proliferación de células M-NFS-60 (Metcalf, J.Cell.Physiol (1970) 76-89). M-NFS-60 es una línea celular de macrófagos de ratón que depende de CSF-1 para el crecimiento. Se seleccionó un anticuerpo que neutralizaba la actividad de CSF-1, mCSF1033 y una IgG quimérica (Ab33) producida usando las regiones variables de conejo del anticuerpo mCSF1033 y regiones constantes de ratón. El residuo de cisteína libre en la región variable de conejo fue alquilado usando yodoacetamida (Pierce). Este anticuerpo quimérico se usó para ensayos en modelos en ratón *in vivo* de la EII.

### Ejemplo 2. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1 sobre los síntomas de colitis aguda inducida por DSS

El modelo de dextrano sulfato de sodio (DSS) usado fue esencialmente como se describe en Cooper et al., 1993, Laboratory Investigation, 69, 238-249. Dos grupos de 10 ratones Balb/c macho se pesaron y se les inyectó por vía subcutánea Ab33 (véase el Ejemplo 1) o un anticuerpo de control 101.4 (anticuerpo de ratón anti-TNF $\alpha$  humano) a 10 mg/kg. El agua potable normal se reemplazó luego con DSS al 1 % en agua corriente 24 horas después de la primera inyección de anticuerpo. Las inyecciones posteriores de anticuerpos en la misma concentración se administraron una vez a la semana. Un tercer grupo de 10 ratones Balb/c macho no recibió tratamiento y continuó recibiendo agua potable normal.

Los animales se pesaron todos los días y se observaron signos de enfermedad (deposiciones sueltas, sangrado). El volumen de DSS al 1 % o el agua consumida también se midió en peso. Al final del experimento, se extirparon los colones y se midió la longitud.

Se recogió una sección de 1 cm del extremo distal para la evaluación de la infiltración de neutrófilos y linfocitos T mediante análisis FACS después de la digestión con colagenasa 100 U/ml para liberar leucocitos de lámina propia del tejido. Los neutrófilos se definieron como las células que expresan CD45 y los niveles altos de GR1 y los linfocitos T como los que expresan CD45 y CD3. Estas células se identificaron mediante tinción con anticuerpos CyChrome anti-CD45 y Ficoeritrina anti-GR1 o anticuerpos CyChrome anti-CD45 y FITC anti-CD3 respectivamente.

La siguiente sección de 2 cm se recogió para el análisis histológico y se incluyó en parafina. Para el análisis inmunohistoquímico, se cortaron secciones de 4  $\mu$ m de las muestras incluidas en parafina, se montaron en portaobjetos de Superfrost Plus Gold, se desparafinaron en Histoclear y se rehidrataron. Antes del procedimiento inmunohistoquímico (un método de estreptavidina-biotina-peroxidasa de rábano picante) se aplicó la recuperación de antígenos mediada por calor con 0,01 mol/l de tampón citrato pH 6 (DakoCytomation) durante 25 minutos a 99 °C. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó por incubación en un 0,6 % vol/vol de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto durante 30 minutos. Para bloquear cualquier actividad endógena de unión a avidina, las secciones se trataron con solución de bloqueo de Avidina D durante 15 minutos, se enjuagaron brevemente con tampón y luego se incubaron durante 15 minutos con la solución de bloqueo de biotina (Vector Laboratories). Las secciones de tejido se bloquearon con un 20 % de suero de burro normal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) en TBS durante 20 minutos a temperatura ambiente para reducir las señales de fondo causadas por las interacciones de IgG Fc por el reactivo de burro de segunda etapa biotinilado. El anticuerpo primario fue un CD3 policlonal de cabra anti-ratón (Autogen Bioclear) diluido a 1:800 en solución salina tamponada Tris 0,05 M, pH 7,6 (TBS). Las secciones se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo de burro anti-cabra biotinilado (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluido a 1:500 en TBS. Los portaobjetos se incubaron posteriormente con complejo de estreptavidina-biotina-peroxidasa de rábano picante (DakoCytomation) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se desarrolló con tetraclorhidrato de 3, 3'-diaminobencidina. Entre etapas, los portaobjetos se enjuagaron durante 5 minutos en TBS dos veces. Todas las secciones se sometieron a una contratinción ligera durante 20 segundos con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron. Los portaobjetos de control se incubaron con TBS en lugar de anticuerpo primario. Los valores de CD3 se determinaron por un observador con enmascaramiento por medio de una retícula ocular y se evaluaron a partir de áreas a lo largo de la lámina propia del colon. El número de células CD3 positivas dentro de cada área seleccionada se contó con un aumento de 400 (10/animal). El área de la rejilla en x400 corresponde a 0,059 mm<sup>2</sup> de tejido. El método inmunohistoquímico para el análisis de células con tinción positiva de F4/80 se realizó de la misma manera que para el análisis de CD3, en este caso las secciones de tejido se bloquearon con un 20 % de suero de conejo normal (DakoCytomation) en TBS durante 20 minutos a temperatura ambiente para reducir las señales de fondo causadas por las interacciones de IgG Fc por el reactivo de conejo biotinilado de segunda etapa. El anticuerpo primario fue un anticuerpo monoclonal de rata anti-F4/80 de ratón (Serotec) diluido a 1:100 en solución salina tamponada Tris 0,05 M, pH 7,6 (TBS). Las secciones se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo de conejo anti-rata biotinilado (DakoCytomation) diluido a 1:200 en TBS. El método fue el mismo que para el análisis de células positivas para CD3.

La figura 1 muestra el siguiente análisis estadístico por ANOVA con la prueba posterior de Bonferroni de que no hubo diferencias significativas entre los ratones tratados con anti-CSF-1 y los ratones de control normales, lo que indica que el anticuerpo anti-CSF-1 había prevenido la pérdida de peso que normalmente ocurre en la colitis inducida por DSS (véase el anticuerpo de control 101.4). La figura 2 muestra que el anti-CSF-1 también tuvo un efecto significativo sobre la longitud del colon. La longitud del colon se reduce significativamente en ratones con colitis inducida por DSS y se cree que esto refleja la extensión de la inflamación del colon. Se observó una protección contra el acortamiento de colon en ratones tratados con anticuerpo anti-CSF-1 que tenían una longitud de colon significativamente mayor que aquellos tratados con el anticuerpo de control negativo 101.4. Las figuras 3a y 3b muestran que el anticuerpo anti-CSF-1 también redujo la puntuación de gravedad de la enfermedad colónica (signos de enfermedad tales como diarrea y hemorragia rectal) y la puntuación general de la enfermedad clínica (una combinación de enfermedad colónica y pérdida de peso). El análisis de FACS del tejido colónico se muestra en las figuras 4a y 4b. Se descubrió que el número de neutrófilos (células GR1+ CD45+) y linfocitos T (CD3+ CD45+) que se infiltraban en el colon aumentaba significativamente en ratones con colitis inducida por DSS y tratados con el anticuerpo de control negativo 101.4, mientras que los ratones tratados con anti-CSF-1 no tuvieron un número significativamente mayor de neutrófilos o linfocitos T en comparación con los ratones de control normales. La capacidad del anticuerpo anti-CSF-1 para prevenir el aumento en el número de linfocitos T CD3+ infiltrantes en la lámina propia del colon en la colitis por DSS se confirmó mediante inmunohistoquímica, como se muestra en la figura 5.

La figura 6 muestra que el anticuerpo anti-CSF-1 también inhibió la infiltración de macrófagos en la lámina propia del colon, como se observa por la disminución significativa en las células de tinción positiva de F4/80 en comparación con los ratones con colitis por DSS tratados con anticuerpo de control 101.4.

**REIVINDICACIONES**

1. El uso de un inhibidor de la actividad de CSF-1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa en donde el inhibidor es un anticuerpo o fragmento funcionalmente activo del mismo que se une a CSF-1R.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el fragmento de anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv o un fragmento de unión a epítipo del mismo.
- 10 4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está conjugado a una o más moléculas efectoras.

Figura 1

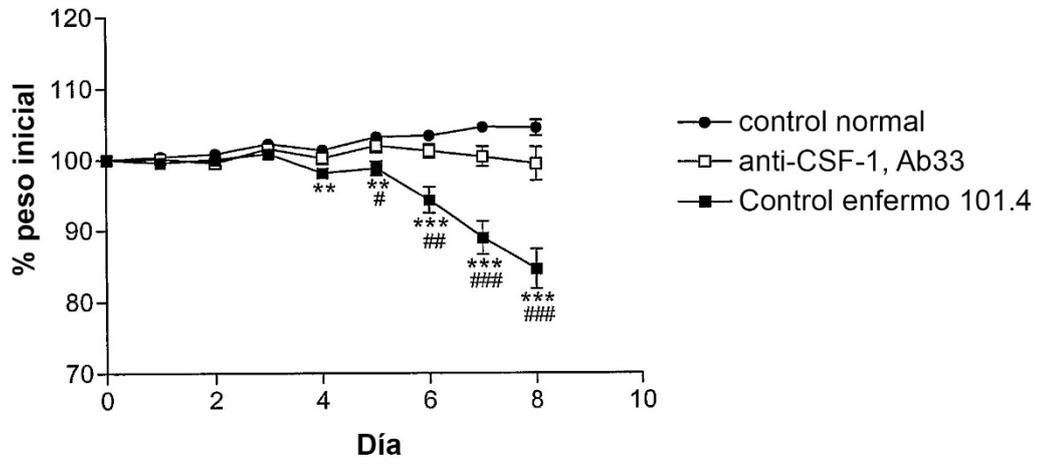


Figura 2

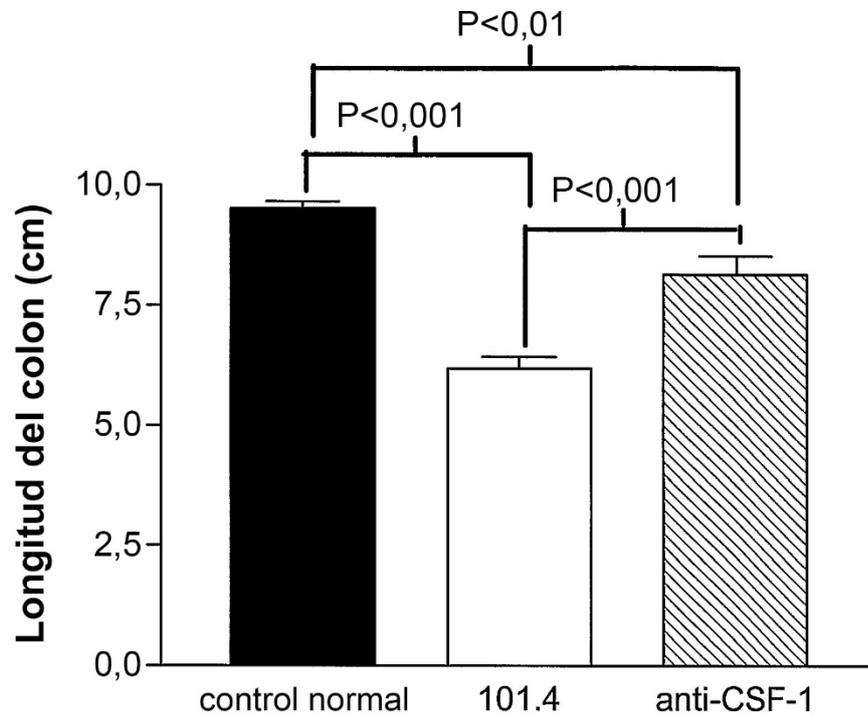


Figura 3a

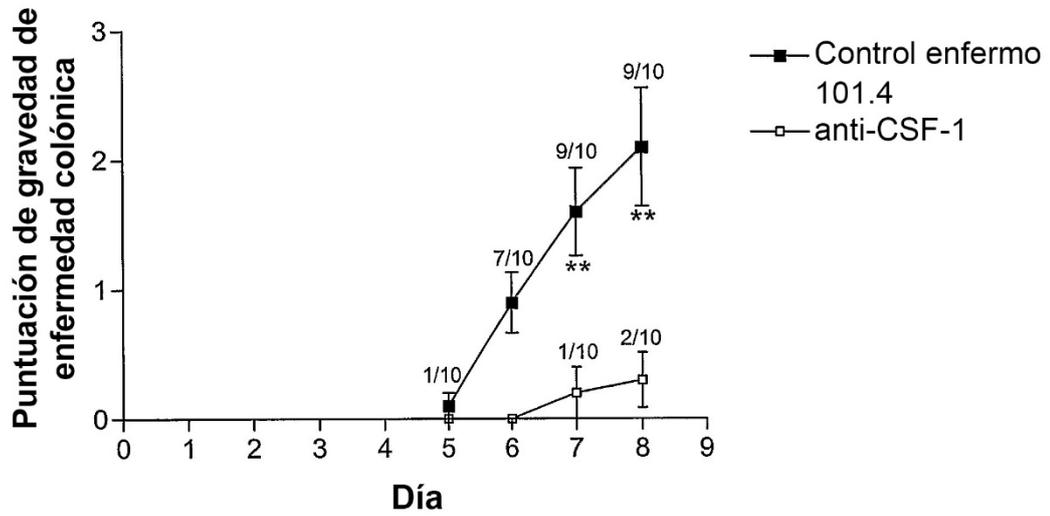


Figura 3b

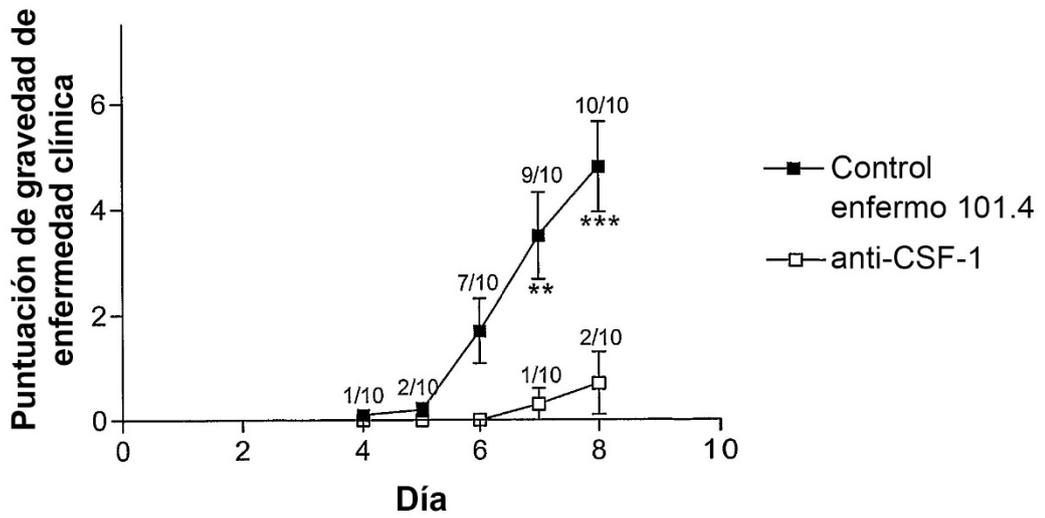


Figura 4a

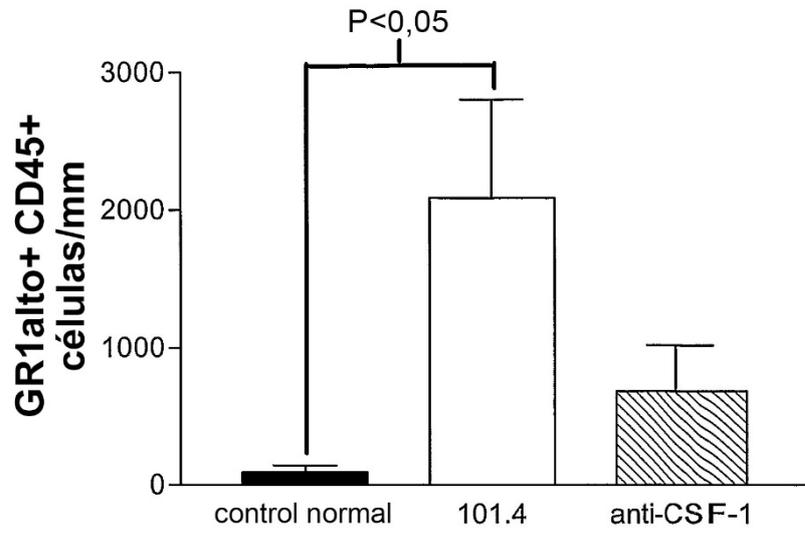


Figura 4b

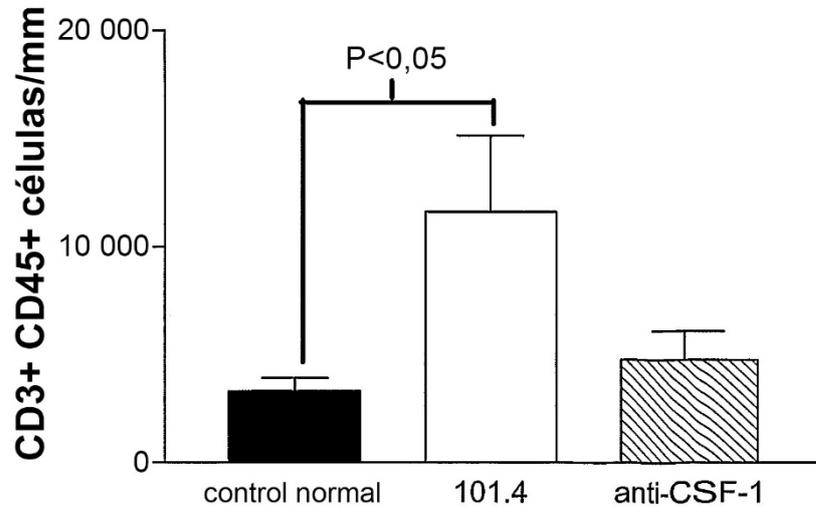


Figura 5

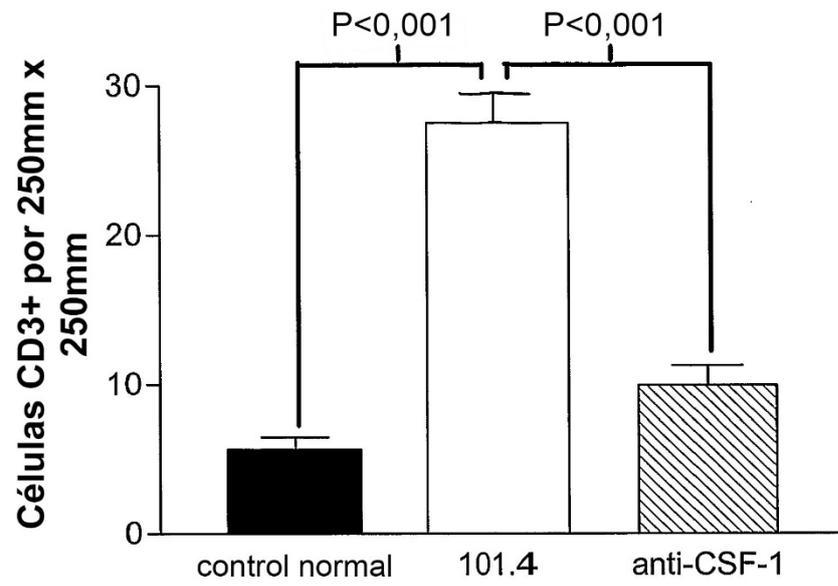


Figura 6

