(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 786 260**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2014** **PCT/EP2014/068047**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015** **WO15028454**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2014** **E 14777531 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020** **EP 3039041**

(54) Título: **Método para el tratamiento de la enfermedad fibrótica**

(30) Prioridad:

30.08.2013 GB 201315486

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

MARSHALL, DIANE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 786 260 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

Método para el tratamiento de la enfermedad fibrótica

La presente invención se refiere en general a métodos para tratar la enfermedad fibrótica y más específicamente a un anticuerpo anti-CSF1-R para el tratamiento de la enfermedad fibrótica.

El factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), también conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) es una citoquina producida por una variedad de células, incluidas las células endoteliales y los fibroblastos. CSF-1 está compuesto por dos polipéptidos "monómeros", que forman una proteína CSF-1 dimérica activa biológicamente. CSF-1 existe en al menos tres formas maduras debido al empalme de ARN alternativo, el procesamiento proteolítico de precursores de proteínas y las modificaciones post-traduccionales, incluida la glucosilación y la adición de proteoglicano (véase, Cerretti DP et al. 1988, Mol Immunol, 25(8),761; Pixley FJ y Stanley ER, 2004, Trends in Cell Biology, 14(11) 628-38; Douglass, TG et al, 2008, Int Immunopharmacol, 8, 1354-76). Las diversas formas de la proteína CSF-1 incluyen dos moléculas secretadas, una que está glicosilada, y otra que está compuesta por una secuencia amino terminal más larga y con modificación de proteoglicanos. Otra variante es una molécula transmembrana (TM, de sus siglas en inglés) que está glicosilada pero no tiene restos de proteoglicanos. Esta forma de membrana puede eliminarse mediante escisión proteolítica para liberar una molécula activa soluble. Todas las formas se producen como polipéptidos precursores que tienen una secuencia señal de 32 aminoácidos en el amino terminal, una región transmembrana putativa de aproximadamente 23 aminoácidos cerca del extremo carboxilo y una cola corta terminal COOH citoplasmática. Los péptidos precursores se procesan posteriormente mediante escisiones proteolíticas en el amino y carboxilo terminal para producir las formas maduras de CSF-1 con 1-149 restos que son idénticos y que constituyen el dominio de unión al receptor. *In vivo,* los monómeros CSF-1 se glucosilan, y se dimerizan a través de un enlace disulfuro. CSF-1 pertenece a un grupo de agonistas biológicos que promueven la producción de células sanguíneas. Específicamente, actúa como un factor de crecimiento, diferenciación y supervivencia para las células progenitoras de la médula ósea del linaje de fagocitos mononucleares. Además, CSF-1 estimula la supervivencia, la proliferación y la función de los macrófagos a través de un receptor específico en las células que responden.

El receptor CSF-1 (CSF-1R) también se conoce como el producto génico c-fms o CD115. CSF-1R es una glicoproteína TM de tipo 1 de 165 kDa que pertenece a la familia de receptores de tirosina quinasa tipo III. Además de CSF-1, la molécula IL-34 similar estructuralmente pero no relacionada con la secuencia también ha demostrado que es un ligando para CSF-1R (Lin, et al. .2008, Science 320:807-811). La expresión de CSF-1R está restringida principalmente a las células del linaje monocitos-macrófagos, tanto en poblaciones de tejidos circulantes como residentes, incluidos los osteoclastos. Además, se expresa en varias células del sistema reproductor femenino, incluidos los ovocitos, las células deciduales y los trofoblastos (Pollard JW y Stanley ER, 1996 Advances in Developmental Biochesmistry Vol 4, 1996, páginas 153-193 (Pleiotropic Roles for CSF-1 in Development Defined by the Mouse Mutation Osteopetrotic); Arceci RJ, PNAS 1989, 86(22), 8818-8822 (Temporal Expression and Location of CSF-1 and its Receptor in Female Reproductive Tract are consistent with CSF-1-Regulated Placental Development); Arceci, RJ et al, 1992, 151(1), 1-8; Dev Biol; Regenstreif LJ y Rossant J, Dev Biol 1989 Mayo; 133(1):284-94 (Expression of the c-fms-oncogene and the cytokine, CSF-1,during mouse embryogenesis), Pampfer S et al., Biol Reprod 1992, 46(1), 48-57 (Expression of the CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) in the humam uterus and placenta; Jokhi PP et al, Lab Invest 1993, 68(3), 308-320 (Expression of the CSF-1 Receptor (c-fms ptoduct) by the cells at the human uteroplacental interface); Kauma SW et al, J Clin Endocrinol Metab 1991, 73(4), 746-751 (CSF-1 and c-fms expression in human endometrial tissues and placenta during the menstrual cycle and early pregnancyl), Byrne J Cell Biol 1981 91(3 Pt 1) 848-53, Hofstetter W et al, Bone 1995, 17, (2), 145-151; Tanaka S et al, 1993, J Clin Invest, 91:257-63; Weir EC et al, 1993, J Bone Miner Res, 8(12) 1507-18.

La unión del ligando CSF-1 al receptor CSF-1 da como resultado la fosforilación del receptor en uno o más restos de tirosina a través de la acción de su dominio de tirosina quinasa. Esta fosforilación puede detectarse porque los anticuerpos están disponibles y se unen al receptor sólo después de la fosforilación (por ejemplo, el anticuerpo #3083 del Receptor Fosfo-M-CSF (Tyr546) de Cell Signaling Technology).

Los inhibidores de CSF-1 ya son conocidos en la técnica. Patente WO2012082689 y Meurer et al., 2011, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 25:843-858, por ejemplo, proponen inhibidores de moléculas pequeñas de CSF-1 para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades como la fibrosis.

Los anticuerpos para CSF-1R son conocidos en la técnica. Sherr, C.J. et al., Blood 73 (1989) 1786-1793 describe anticuerpos contra CSF-1 R que inhiben la actividad de CSF-1 (Sherr, C.J. et al., Blood 73 (1989) 1786-1793). El documento WO09/026303 define anticuerpos anti-CSF-1R que se unen al CSF-1R humano y modelos tumorales *in vivo* de ratón que emplean un anticuerpo CSF-1R anti-murino. La Patente WO11/123381 describe anticuerpos anti-CSF-1R que internalizan CSF-1R y tienen actividad ADCC. El documento WO11/123381 describe modelos tumorales *in vivo* de ratón que emplean un anticuerpo CSF-1R anti-murino. El documento WO11/140249 describe anticuerpos anti-CSF-1R que bloquean la unión de CSF-1 a CSF-1R que se determinan que son útiles en el tratamiento del cáncer. El documento WO09/112245 describe un anticuerpo IgG1 anti-CSF-1R que inhibe la unión de CSF-1 a CSF-1R y se determina que es útil en el tratamiento del cáncer, la enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis reumatoide. El documento WO11/131407 describe un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la unión de CSF-1 a CSF-1R y se determina

que es útil en el tratamiento de la pérdida ósea y el cáncer. El documento WO11/107553 describe un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la unión de CSF-1 a CSF-1R y se determina que es útil en el tratamiento de la pérdida ósea y el cáncer. El documento WO2013/057281 sugiere anticuerpos anti-c-fms para modular la activación de macrófagos. Lim et al., 2009, Diabetologia, 52:1669-1679, describe que un anticuerpo anti-CSF-1R podría desempeñar un papel en el desarrollo de la nefropatía diabética tipo 2. El documento WO11/070024 describe anticuerpos anti-CSF-1R que se unen al fragmento delD4 de CSF-1R humano.

Los anticuerpos anti-CSF-1R se encuentran actualmente en desarrollo para el tratamiento del cáncer y la artritis reumatoide.

El término "enfermedad fibrótica" se refiere a una respuesta de cicatrización de heridas anormal en la que se forma un exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido. El depósito y la acumulación en exceso de componentes de la matriz extracelular (MEC), como el colágeno y la fibronectina, da como resultado el endurecimiento y la cicatrización de los tejidos que finalmente, pueden conducir a insuficiencia orgánica.

La herida da como resultado una coagulación inmediata y una respuesta de coagulación con el desarrollo de una matriz extracelular provisional (MEC). La agregación y activación plaquetaria inicial ayuda a promover una respuesta inflamatoria caracterizada por la vasodilatación y un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos, permitiendo el reclutamiento al sitio de la herida de una variedad de células inmunes, incluidos neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y linfocitos. Los neutrófilos y los macrófagos desbridan la herida, lo que reduce de este modo el riesgo de infección y, junto con los linfocitos activados, secretan una variedad de factores de crecimiento y citoquinas que sirven para amplificar aún más la respuesta inflamatoria. Moléculas tales como TGFβ, PDGF e IL-13 activan los macrófagos y conducen al reclutamiento, proliferación y activación de fibroblastos en el sitio de la herida. Los fibroblastos o miofibroblastos activados se caracterizan por la expresión de actina α del músculo liso y secretan colágeno y otros componentes de la MEC. Los fibroblastos activados, contraen la red de colágeno, dibujando los bordes de la herida hacia el centro. Las células epiteliales y endoteliales proliferan y migran sobre la matriz temporal para regenerar el tejido dañado que se combina con la resolución de los componentes de la matriz, completando la reparación de la herida.

Sin embargo, la herida o lesión persistente del tejido, o una desregulación de la vía de reparación conduce a una respuesta inapropiada de la herida. Luego se produce un depósito excesivo y un entrecruzamiento del colágeno y la MEC, que da como resultado una formación excesiva y un endurecimiento del tejido cicatricial en lugar de la arquitectura del tejido normal.

Varios enfoques han demostrado que la gravedad de la enfermedad se reduce cuando los macrófagos se agotan en modelos de fibrosis pulmonar en ratones (Zhang-Hoover J et al, Immunology, 2000, 101(4): 501-511; Gibbons MA et al, Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(5)); Murray, LA et al, 2011, Int J Biochem Cell Biol, 43, 154-62). El agotamiento se logró bien mediante la administración de clodronato liposomal o bien mediante el empleo de un ratón transgénico del receptor de la toxina de la difteria CD11c, donde las células de monocitos/macrófagos se eliminaron mediante la inyección de la molécula de toxina de la difteria. Del mismo modo, en un modelo de fibrosis hepática (Duffield JS et al, J Clin Invest, 2005, 115(1): 56-65) y fibrosis renal (Lin SL, et al, 2009, J Immunol, 183, 6733-43), el agotamiento de los macrófagos redujo el daño patológico y el depósito de colágeno. El ratón *op*/*op* tiene una mutación en la secuencia de ADN del ligando CSF-1 que da como resultado la expresión de una proteína truncada no funcional. Estos ratones manifiestan un fenotipo osteopetrótico y son deficientes en macrófagos. Cuando se utiliza en un modelo de bleomicina de fibrosis pulmonar, la gravedad de la enfermedad se reduce considerablemente en comparación con los ratones de tipo salvaje (Baran et al, 2007, Am J Respir Crit Care Med, 176, 78-89).

La complejidad se agrega al papel de los macrófagos, ya que pueden clasificarse en al menos dos fenotipos funcionales, M1 y M2 (Mantovani, A et al, 2004, Trends in Immunol, 25(12), 677-86; Mantovani, A et al, 2007, Eur J Immunol, 37, 14-16; Mosser DM y Edwards JP, 2008, Nat Rev Immunol, 8, 958-) donde los macrófagos M2 poseen características pro-fibróticas (Lupher, ML and Gallatin, WM, 2006, Adv Immunol, 89, 245-88; Prasse A et al, 2006, Am J Resp Crit Care Med, 173, 781-92; Pechkovsky, DV et al, 2010, Clin Immunol, 137 (1), 89-1-1; Gibbons MA et al, 2011, Am J Resp Crit Care Med, 184, 569-81).

Ejemplos de enfermedades fibróticas incluyen la fibrosis pulmonar, tal como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), silicosis, fibrosis quística, fibrosis renal, fibrosis hepática, cirrosis hepática, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloide, infarto de miocardio, esclerosis sistémica y artrofibrosis.

La causa de la enfermedad fibrótica puede depender del órgano o tejido implicado y se desconoce en algunas enfermedades, tales como la fibrosis pulmonar idiopática. La fibrosis hepática y, en última instancia, la cirrosis, son el resultado del daño hepático crónico constante a través de la exposición a una variedad de factores, incluidos factores ambientales y dietéticos o agentes infecciosos. Las infecciones a largo plazo por hepatitis B o C pueden causar fibrosis hepática. El consumo continuado de alcohol o una dieta alta en grasas/azúcar también puede conducir a cirrosis hepática. Del mismo modo, la diabetes puede dañar y cicatrizar los riñones, lo que conduce a la pérdida de la función. En la fibrosis pulmonar familiar, los miembros de la familia tienen una mayor susceptibilidad a la fibrosis, aunque se

desconocen el factor o factores genéticos responsables.

La FPI es una enfermedad crónica, progresiva, de causa desconocida, y es una de las siete neumonías intersticiales idiopáticas (American Thoracic Society/European Respiratory Society Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial, Pneumonias, 2002, Am J Respir Crit Care Med, 165:277-304). Se cree que la lesión repetitiva de las células epiteliales alveolares desempeña un papel clave en la promoción del proceso fibrótico que da como resultado las características histopatológicas típicas de la FPI (Selman M, 2001, Ann Intem Med, 134(2): 136-51; Gross TJ y Hunninghake GW, 2001). Varios factores de riesgo pueden causar la lesión de las células epiteliales, particularmente las toxinas y agentes inhalados. Se ha identificado que fumar es uno de tales posibles factores, mientras que se ha informado que la exposición a polvos de madera, polvos metálicos, sílice u otros polvos minerales, aumenta el riesgo de desarrollar FPI (revisado en Borchers AT et al, 2011 Clinic Rev Allerg Immunol, 40: 117-134); Maher TM, 2012, Clin Chest Med, 33: 69-83). El pronóstico para los pacientes con FPI es malo con un intervalo de supervivencia medio de 2 a 5 años después del diagnóstico (Gribbin J, et al, 2006, Thorax, 61: 980-85; King TE Jr, 2001, Am J Respir Care Med, 1664: 1171-81; Fernández Pérez ER et al, 2010, Chest, 137: 129-37; Lee HL et al, 2005, Chest, 127:2034-41).

El tratamiento de la enfermedad fibrótica incluye generalmente agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores, pero éstos son de poco beneficio para el paciente. La falta de eficacia con estos tratamientos contribuyó a la reconsideración de la FPI y la enfermedad fibrótica en general, como una respuesta anormal de la cicatrización de heridas y no a una afección inflamatoria. La pirfenidona es un fármaco de molécula pequeña que se aprobó para su uso en el tratamiento de la FPI en Japón en 2008 y en Europa en 2011, que funciona probablemente a través de múltiples mecanismos de acción que no se comprenden completamente pero que pueden funcionar en parte a través de una regulación a la baja de TGF-β. Hasta la fecha, no se han aprobado terapias dirigidas para indicaciones fibróticas.

Por lo tanto, actualmente existe una necesidad médica insatisfecha de mejorar el tratamiento de la enfermedad fibrótica. Por ejemplo, para la FPI hay una tasa de supervivencia a 3 años del 50% y una tasa de supervivencia a 5 años de sólo el 20% y se requiere de un trasplante en aproximadamente el 20% de los casos.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo método de tratamiento de la enfermedad fibrótica.

Compendio de la divulgación

Sorprendentemente, hemos podido demostrar que los inhibidores de la actividad de CSF-1R son activos en el tratamiento de la enfermedad fibrótica. Específicamente, hemos podido demostrar que un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la actividad de CSF-1R es activo en modelos animales *in vivo* de fibrosis pulmonar.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un inhibidor de la actividad de CSF-1R, para el tratamiento y/o la profilaxis de la fibrosis pulmonar, en donde el inhibidor es un anticuerpo o fragmento activo funcionalmente del mismo, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se une al CSF-1R.

En la presente solicitud, el término "enfermedad fibrótica" incluye enfermedades que se caracterizan por una respuesta anormal de la cicatrización de heridas en donde se forma un exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido. Enfermedades fibróticas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, la fibrosis pulmonar, tal como fibrosis pulmonar idiopática, silicosis y fibrosis quística; fibrosis renal incluyendo atrofia tubular y fibrosis intersticial, fibrosis hepática y cirrosis hepática, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloide, infarto de miocardio, esclerodermia, esclerosis sistémica y artrofibrosis.

El término 'actividad CSF-1R' como se emplea en la presente memoria se refiere al espectro de actividad entendido en la técnica para CSF-1R, en particular la actividad de CSF-1R humano y las isoformas del mismo, por ejemplo 1, 2, 3 o todas las isoformas. Por ejemplo, la unión del ligando al receptor induce la fosforilación de CSF-1R en restos de tirosina específicos (Bourette RP y Rohrschneider LR, 2000, Grown Factors 17: 155-166) y la cascada resultante de eventos de transducción de señales puede mediar la migración celular, la supervivencia, la diferenciación y la proliferación (Suzu S et al, 1997, J Immunol, 159, 1860-7; Yeung Y-G y Stanley ER, 2003, Mol Cell Proteomics, 2, 1143-55; Yu W et al 2008, J Leukoc Biol84(3), 852-63). La expresión en células transfectadas de moléculas receptoras de CSF-1R mutantes que comprenden restos de fenilalanina en lugar de restos de tirosina seleccionados reveló la asociación de restos de tirosina específicos con resultados celulares tales como la supervivencia, la proliferación y la morfología (Yu et al J Leukoc Biol 2008 Sep 84(3): 852-863). Los enfoques proteómicos y las técnicas de inmunotransferencia que emplean anticuerpos anti-fosfotirosina junto con anticuerpos específicos de molécula, han identificado una serie de moléculas intracelulares implicadas en la mediación de estas funciones celulares después de la estimulación del receptor mediante ligando (Yeung Y-G et al, 1998, J Biol Chem. 13, 273(46): 17128-37; Husson H et al, 1997, Oncogene15, 14(19): 2331-8.

En una realización el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

Un inhibidor de la actividad de CSF-1R es un agente que interfiere mediante, por ejemplo, reducción/inhibición o bloqueo de la actividad de CSF-1R, en particular, la actividad de CSF-1R en la enfermedad fibrótica. Se prefieren en

particular los agentes que interfieren con la actividad de CSF-1R en FPI. Los inhibidores pueden inhibir parcial o completamente la actividad de CSF-1R. Los inhibidores de uso incluyen, sin limitación, inhibidores que son capaces de interaccionar con (por ejemplo, unirse o reconocer) el receptor CSF-1 (CSF-1R) o son capaces de inhibir la interacción entre CSF-1R y CSF-1 y/o IL-34. En una realización el inhibidor bloquea la unión de CSF-1 al receptor CSF-1R.

Ejemplos de inhibidores adecuados incluyen un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une al receptor CSF-1 e interfiere con la interacción receptor-ligando CSF-1.

Los inhibidores de la actividad del receptor CSF-1 son conocidos en la técnica como son los métodos para identificar y producir tales inhibidores. Los anticuerpos neutralizantes anti-CSF-1 han sido descritos, por ejemplo, por Weir et al., 1996, J Bone Miner. Res.1 1, 1474-1481 y Haran-Ghera et al, 1997, Blood, 89, 2537-2545, que también describe anticuerpos anti-CSF-1R. También se han descrito antagonistas antisentido de CSF-1 (EP1223980).

En una realización, el inhibidor para emplear en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad fibrótica es un anticuerpo o un fragmento del mismo que inhibe la actividad de CSF-1R. Por consiguiente, se describe el empleo de un anticuerpo o un fragmento del mismo que inhibe la actividad de CSF-1R, para la fabricación de un medicamento para emplear en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad fibrótica. También se describe un método de tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz terapéuticamente de un anticuerpo o un fragmento del mismo que inhibe la actividad de CSF-1R.

Más preferiblemente, un inhibidor para emplear en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad fibrótica es un anticuerpo o un fragmento del mismo que interacciona con (es decir, se une o reconoce) CSF-1R e inhibe la actividad de CSF-1R. En un ejemplo los anticuerpos o fragmentos de los mismos interaccionan selectivamente con CSF-1R. Interaccionar selectivamente con (*p.ej.* reconociendo o uniéndose a) significa que los anticuerpos tienen una mayor afinidad por el polipéptido CSF-1R que por otros polipéptidos. Ejemplos de anticuerpos adecuados son aquellos que inhiben la actividad de CSF-1R uniéndose a CSF-1R de tal manera que evite que sea activo biológicamente.

En una realización el anticuerpo reconoce isoformas de CSF-1R, por ejemplo, CSF-1R humano e isoformas del mismo.

En una realización el anticuerpo anti-CSF-1R o un fragmento del mismo es capaz de bloquear la unión del ligando a CSF-1R. El bloqueo, como se emplea en la presente memoria, se refiere al bloqueo físico, tal como la oclusión del receptor, pero también incluirá el anticuerpo o los fragmentos que se unen a un epítopo que causa, por ejemplo, un cambio conformacional, lo que significa que el ligando natural ya no se une al receptor. Ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo para bloquear CSF-1R se describen en los Ejemplos de la presente memoria, véase el Ejemplo 2. BIAcore es un ejemplo de un ensayo empleado para medir cinéticas de unión, también pueden ser útiles ensayos ELISA o ensayos basados en células que emplean monocitos o células THP-1. CSF-1 e IL-34 son ambos ligandos para CSF-1R y el anticuerpo anti-CSF-1R puede bloquear la unión de CSF-1 o IL-34 a CSF-1R pero bloquea preferiblemente tanto la unión de CSF-1 como de IL-34 a CSF-1R. El anticuerpo anti-CSF-1R tampoco causa preferiblemente la activación de CSF-1R o la internalización de CSF-1R. Ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo para causar la activación de CSF-1R o la internalización de CSF-1R se describen en los Ejemplos, véase el Ejemplo 2 que describe un ensayo que mide la proliferación dependiente de CSF-1.

Por consiguiente, se describe el empleo de un anticuerpo anti-CSF-1R para la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad fibrótica. También se describe un método de tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz terapéuticamente de un anticuerpo anti-CSF-1R.

Los polipéptidos o células CSF-1R que expresan dichos polipéptidos pueden emplearse para producir anticuerpos que reconocen específicamente dichos polipéptidos. Los polipéptidos CSF-1 R pueden ser polipéptidos 'maduros' o fragmentos activos biológicamente o derivados de los mismos.

CSF-1R como se emplea en la presente memoria,, se refiere a la proteína denominada CSF-1R, las isoformas de la misma y sus fragmentos activos biológicamente. En una realización CSF-1R es una proteína humana o una isoforma de la misma.

Generalmente, un anticuerpo empleado en la presente invención se dirigirá al dominio extracelular de CSF-1R.

La Figura 1A muestra la secuencia completa de 972 aminoácidos del CSF1-R humano donde los restos 1-19 son el péptido señal predicho. Preferiblemente, el polipéptido CSF-1R contiene los 20-517 aminoácidos de la secuencia CSF-1R humana que se muestra en la Figura 1A. Los 20-517 aminoácidos representan la región extracelular predicha de la secuencia CSF-1R. La Figura 1B muestra algunas formas alternativas de CSF-1R.

El CSF-1R humano está registrado en la base de datos UniProt según P07333.

Los polipéptidos CSF-1 y CSF-1R 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 una realización la secuencia mostrada en la Figura 1C puede transfectarse en una línea celular adecuada y el polipéptido expresado sobre la superficie celular. El fragmento de aminoácido puede fusionarse con un anclaje GPI para facilitar dicha expresión. Las células se pueden emplear después para inmunizar a los huéspedes.

En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se emplean indistintamente a menos que se especifique de otra manera. Los polipéptidos CSF-1 o CSF-1R pueden ser en algunos casos parte de una proteína más grande, tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada a un marcador de afinidad.

Los anticuerpos generados contra estos polipéptidos pueden obtenerse administrando los polipéptidos o células que expresan los mismos a un animal, preferiblemente un animal no humano, empleando protocolos rutinarios y bien conocidos, 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 monoclonales se pueden preparar 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 células B humanas (Kozbor et al, 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica EBV-hibridoma (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, p77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos para emplear en la invención también pueden generarse usando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales clonando y expresando ADNc de la región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-7848, WO92/02551 y WO2004/051268 y WO2004/106377.

Específico como se emplea en la presente memoria, pretende referirse a un anticuerpo que sólo reconoce el antígeno para el que es específico o un anticuerpo que tiene una afinidad de unión significativamente mayor al antígeno al que es específico en comparación con la unión a antígenos para los que no es específico, por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor afinidad de unión.

Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que se han modificado genéticamente para que los genes de la cadena ligera y pesada 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 mediante 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).

En una realización, el anticuerpo para emplear en la presente invención está humanizado. Como se emplea en la presente memoria, el término "molécula de anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula de anticuerpo en donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDRs (que incluyen, si se desea, una o más CDRs modificadas) de un anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertado en un marco de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano) (véase, *por ejemplo* US 5.585.089; WO91/09967). Para una revisión, véase Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998.

En una realización, en lugar de transferir toda la CDR, sólo uno o más de los restos determinantes de la especificidad de cualquiera de las CDRs descritas anteriormente en la presente memoria se transfieren al marco de anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). En una realización, sólo los restos que determinan la especificidad de una o más de las CDRs descritas anteriormente en la presente memoria se transfieren al marco de anticuerpos humanos. En otra realización, sólo los restos que determinan la especificidad de cada una de las CDRs descritas anteriormente en la presente memoria se transfieren al marco de anticuerpos humanos.

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las regiones marco no necesitan tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los restos inusuales pueden cambiarse a restos que aparecen más frecuentemente para esa clase o tipo de cadena aceptora. Alternativamente, los restos seleccionados en las regiones marco aceptoras pueden cambiarse de modo que correspondan con el resto encontrado en la misma posición en el anticuerpo donante (véase Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Dichos cambios deben mantenerse al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. En El documento WO91/09967 se establece un protocolo para seleccionar restos en las regiones marco del aceptador que pueden necesitar ser cambiadas

Cuando se injertan las CDRs o los restos determinantes de la especificidad, se puede emplear cualquier secuencia marco de región variable aceptora apropiada teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo donante del que se derivan las CDRs, incluidas las regiones marco de ratón, primate y ser humano.

Adecuadamente, el anticuerpo humanizado tiene un dominio variable que comprende regiones marco del aceptador humano, así como una o más de las CDRs. Por tanto, en una realización se proporciona un anticuerpo humanizado que se une al CSF-1R humano en donde el dominio variable comprende regiones marco del receptor humano y CDRs

de donantes no humanos.

Ejemplos de estructuras humanas que se pueden emplear en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al., supra*). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden emplear para la cadena pesada, REI se puede emplear para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden emplear tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente, se pueden emplear secuencias de línea germinal humana; éstas están disponibles en: http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las cadenas pesadas y ligeras aceptoras no necesitan necesariamente derivarse del mismo anticuerpo y pueden, si se desea, comprender cadenas compuestas que tienen regiones marco derivadas de diferentes cadenas.

Los anticuerpos para emplear en la presente invención también pueden generarse utilizando 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; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108. Técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios, tales como los descritos en US 4.946.778 también se puede adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla para polipéptidos CSF-1R. Pueden emplearse también ratones transgénicos, u otros organismos, incluidos otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados.

El anticuerpo empleado en la presente invención puede comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de la misma y puede ser, pero no se limita a, Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F $(ab')_2$, Fv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores (véase por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2 (3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para emplear en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab 'descritos en las solicitudes de patentes internacionales WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multi-valentes pueden comprender múltiples especificidades, por ejemplo, pueden ser biespecíficas o monoespecíficas (véase, por ejemplo, WO 92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 y WO2010/035012).

En una realización, el anticuerpo se proporciona como proteína de fusión de anticuerpo de unión a CSF-1R que comprende una fracción de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento Fab o Fab', y uno o dos anticuerpos de dominio único (dAb) unidos directa o indirectamente al mismo, por ejemplo, como se describe en WO2009/040562, WO2010/035012, WO2011/030107, WO2011/061492 y WO2011/086091.

En una realización, la proteína de fusión comprende dos anticuerpos de dominio, por ejemplo, como un emparejamiento variable pesado (VH) y variable (VL), unidos opcionalmente por un enlace disulfuro.

En una realización, el elemento Fab o Fab' de la proteína de fusión tiene la misma o similar especificidad para el anticuerpo o anticuerpos de dominio único. En una realización, el Fab o Fab' tiene una especificidad diferente para el anticuerpo o anticuerpos de dominio único, es decir, la proteína de fusión es multivalente. En una realización, una proteína de fusión multivalente tiene un sitio de unión a la albúmina, por ejemplo, un par VH/VL proporciona un sitio de unión a la albúmina.

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. Ejemplos particulares de fragmentos de anticuerpos para emplear en la presente invención son fragmentos Fab' que poseen una región bisagra nativa o modificada. Ya se han descrito varias regiones de bisagra modificadas, por ejemplo, en las Patentes US 5.677.425, WO99/15549, y WO98/25971. Otros ejemplos de fragmentos de anticuerpos particulares para emplear en la presente invención incluyen los descritos en solicitudes de patentes internacionales PCT/GB2004/002810, PCT/GB2004/002870 y PCT/GB2004/002871 (todo archivado el 1 de Julio de 2004). Se prefieren en particular los fragmentos Fab de anticuerpos modificados descritos en la solicitud de patente internacional PCT/GB2004/002810.

En una realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

En una realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, kappa o lambda.

El anticuerpo puede ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o una subclase de molécula de inmunoglobulina. En una realización, el anticuerpo para emplear en la presente invención es de clase IgG y puede seleccionarse de cualquiera de las subclases de IgG, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La inducción diferencial de ADCC por

diferentes isotipos de IgG depende de la afinidad de estos restos por los FcyRs. En seres humanos, se sabe que IgG1 e IgG3 inducen funciones efectoras, mientras que IgG2 e IgG4 inducen funciones efectoras débilmente.

En una realización preferida, el anticuerpo para emplear en la presente invención es un anticuerpo IgG2 o IgG4 que induce funciones efectoras débilmente, incluyendo ADCC. Se prefiere particularmente que el anticuerpo para emplear en tratar la enfermedad fibrótica en la presente invención tenga una función efectora limitada ya que el empleo de un anticuerpo con función efectora puede causar un agotamiento mejorado de las células que expresan CSF-1R, incluidos los macrófagos, el cual tiene la posibilidad de incrementar los efectos adversos en el paciente.

El anticuerpo para emplear en la presente invención puede incluir una o más mutaciones para alterar la actividad del anticuerpo. Angal et al (Angal, S., King, D.J., Bodmer, M.W., Turner, A., Lawson, A.D., Roberts, G., Pedley, B. y Adair, J.R. 1993. Una única sustitución de aminoácidos elimina la heterogeneidad del anticuerpo quimérico de ratón/ser humano (IgG4). Mol. Immunol 30:105-108) describe un enfoque de mutagénesis dirigida al sitio para minimizar la formación de la mitad de la molécula de anticuerpos IgG4. En este informe, una única sustitución de aminoácidos dentro de la bisagra central, S241P, dio como resultado una formación de semimoléculas sustancialmente menor. Por consiguiente, en la realización donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, el anticuerpo puede incluir la mutación S241P.

Un experto en la técnica también entenderá que los anticuerpos pueden sufrir una variedad de modificaciones post-traduccionales. El tipo y el alcance de estas modificaciones a menudo dependen de la línea celular huésped utilizada para expresar el anticuerpo, así como las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un resto básico en el carboxilo terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, RJ. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995). Por consiguiente, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo puede estar ausente.

Esta región específica o epítopo del polipéptido CSF-1R humano puede identificarse mediante cualquier método de mapeo de epítopos adecuado conocido en la técnica en combinación con cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Ejemplos de tales métodos incluyen el cribado de péptidos de diferentes longitudes derivados de CSF-1R para la unión al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que puede unirse específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítopo reconocida por el anticuerpo. Los péptidos CSF-1R pueden producirse sintéticamente o por digestión proteolítica del polipéptido CSF-1R. Los péptidos que se unen al anticuerpo pueden identificarse mediante, por ejemplo, análisis de espectrometría de masas. En otro ejemplo, se puede emplear espectroscopía de RMN o cristalografía de rayos X para identificar el epítopo unido por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención puede emplearse, si es necesario, como un inmunógeno para obtener anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítopo.

Las moléculas biológicas, tales como los anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, proporcionando a la molécula una carga neta positiva o negativa. La cantidad de carga global "observada" dependerá de la secuencia de aminoácidos absoluta de la entidad, el entorno local de los grupos cargados en la estructura 3D y de las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoeléctrico (pI) es el pH al que una molécula particular o una superficie accesible al disolvente de la misma no tiene carga eléctrica neta. En un ejemplo, el anticuerpo y los fragmentos CSF-1R pueden diseñarse para que tengan un punto isoeléctrico apropiado. Esto puede conducir a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más robustas, en particular perfiles de solubilidad y/o estabilidad adecuados y/o características de purificación mejoradas.

Así, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo CSF-1R humanizado diseñado para tener un punto isoeléctrico diferente al del anticuerpo identificado originalmente. El anticuerpo puede, por ejemplo, diseñarse mediante el reemplazo de un resto de aminoácido, tal como el reemplazo de un resto de aminoácido ácido por uno o más restos de aminoácido básicos. Alternativamente, se pueden introducir restos de aminoácidos básicos o se pueden eliminar restos de aminoácidos ácidos. Alternativamente, si la molécula tiene un valor de pI inaceptablemente elevado, se pueden introducir restos ácidos para disminuir el pI, según se requiera. Es importante que al manipular el pI se tenga cuidado para retener la actividad deseable del anticuerpo o fragmento. Por tanto, en una realización, el anticuerpo o fragmento modificado tiene la misma o sustancialmente la misma actividad que el anticuerpo o fragmento "no modificado".

Programas tales como ** ExPASY http://www.expasy.ch/tools/pi tool.html, y

http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html, pueden emplearse para predecir el punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento.

Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención puede alterarse empleando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada por CSF-1R. Dichas variantes pueden obtenerse mediante varios protocolos de maduración por afinidad, incluida la mutación de las CDRs (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), intercambio de la cadena (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783,

1992), empleo de cepas mutantes de *E. coli* (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), intercambio aleatorio de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), visualización de fagos (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Crameri et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (*supra*) analiza estos métodos de maduración por afinidad.

Si se desea un anticuerpo para emplear en la presente invención puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. Cabe destacar que la molécula efectora puede comprender una sola molécula efectora o dos o más de tales moléculas unidas para formar un solo grupo que puede unirse a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, esto puede prepararse mediante procedimientos químicos o de ADN recombinante estándar en los que el fragmento de anticuerpo se une bien directamente o mediante un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras a anticuerpos son bien conocidas en la técnica (véase, Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2ª Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123.) Determinados procedimientos químicos incluyen, por ejemplo, los descritos en las Patentes WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO 03/031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, el enlace se puede lograr empleando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en WO 86/01533 y EP0392745.

El término molécula efectora como se emplea en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas activas biológicamente, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, por ejemplo, ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos informadores, tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopía de RMN o ESR.

Ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células (*p.ej.* mortíferos) Ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxurrubicina, daunorrubicina, ,dihidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, 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), ciclofosfamida, busulfán, dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (*p.ej.* daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorrubicina), antibióticos (*p.ej.* dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes antimitóticos (*p.ej.* vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados como ^{111}In y ^{90}Y, Lu^{177}, Bismuto^{213}, Californio^{252}, Iridio^{192}, y Wolframio^{188}/Renio^{188}; o fármacos tales como, pero no limitados a, alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria, una proteína, tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α, interferón β, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, p. ej. angiostatina o endostatina, o, un modificador de la respuesta biológica, tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en el diagnóstico. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales emisores de positrones (para su uso en tomografía por emisión de positrones), e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, en general, la Patente U.S. Nº 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su empleo como diagnóstico. Enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y núclidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I,, ^{131}I,, ^{111}In y ^{99}Tc.

En otro ejemplo la molécula efectora puede aumentar la vida media del anticuerpo i*n vivo,* y/o reducit la

inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunológico. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina, tales como los descritos en El documento WO05/117984.

En una realización una vida media proporcionada por una molécula efectora que es independiente de CSF-1R es ventajosa.

Cuando la molécula efectora es un polímero puede ser, en general, un polímero sintético o natural, por ejemplo, un polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. ej. un homo- o hetero-polisacárido.

Sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxi, metilo o metoxi.

Ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, poli(propilenglicol) poli(alcohol vinílico) o derivados del mismo, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido, tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo.

Polímeros naturales específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

En una realización el polímero es albúmina o un fragmento de la misma, tal como albúmina de suero humano o un fragmento de la misma.

"Derivados", como se emplea en la presente memoria, pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos de tiol, tales como maleimidas, y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento enlazador al polímero. Cabe destacar que el resto de dicho grupo formará en algunos casos parte del producto como el grupo enlazador entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular medio de 500 Da a 50000 Da, por ejemplo, de 5000 a 40000 Da, tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular sobre la base del uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de localizar determinados tejidos, tales como tumores, o extender la vida media en circulación (para una revisión, véase Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Por tanto, por ejemplo, cuando el producto está destinado a salir de la circulación y penetrar en el tejido, por ejemplo, para su empleo en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso emplear un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo, con un peso molecular de alrededor a 5000 Da. Para aplicaciones donde el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso emplear un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo, con un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

Polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.

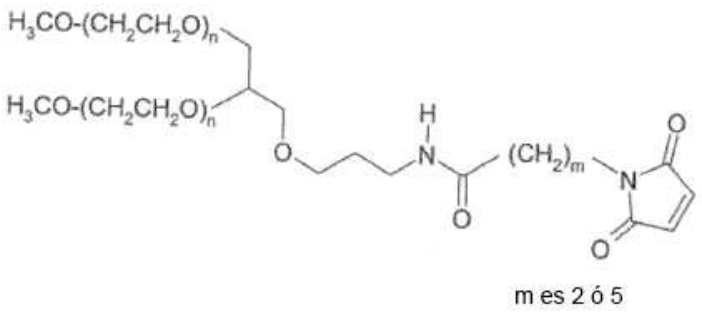
En un ejemplo los anticuerpos para emplear en la presente invención están unidos a restos de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG se pueden unir a través de cualquier cadena lateral de aminoácidos disponible o grupo funcional terminal de aminoácidos ubicado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libres.. Dichos aminoácidos pueden aparecer de manera natural en el fragmento de anticuerpo o pueden modificarse genéticamente en el fragmento empleando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, las Patentes US 5.219.996; US 5.667.425; WO98/25971, WO2008/038024). En un ejemplo la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más restos de cisteína a los que puede unirse la molécula efectora. Se pueden emplear 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 resto de cisteína situado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado se puede unir covalentemente al átomo de azufre de un resto de cisteína situado en el fragmento. El enlace covalente generalmente será un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se emplea un grupo tiol como el punto de unión de moléculas efectoras activadas adecuadamente, por ejemplo, se pueden usar derivados selectivos de tiol, tales como derivados de maleimidas y derivados de cisteína. Se puede emplear un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímero como se describe anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo de tiol, tal como un ácido o éster α-halocarboxílico, p. ej. yodoacetamida, una imida, p. ej. maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Dichos materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente empleando procedimientos químicos convencionales. Determinadas moléculas de PEG incluyen 20K metoxi-PEG-amina (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado, fragmento Fab' o diFab que está PEGilado, *es decir*, tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente al mismo, *p.ej.* según el método divulgado en EP 0948544 o EP1090037 [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]. En un ejemplo PEG está unido a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un resto de lisina se puede unir covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el resto de lisina se puede unir un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por lo tanto, el peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser de aproximadamente 40.000 Da.

Moléculas de PEG particulares incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etil amida de N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) PM 20.000) lisina modificada, también conocida como PEG2MAL40K (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

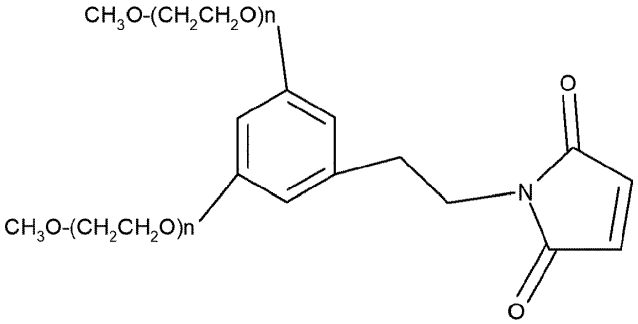
Fuentes alternativas de conectores de PEG incluyen NOF que suministra GL2-400MA3 (en donde m en la estructura a continuación es 5) y GL2-400MA (donde m es 2) y n es aproximadamente 450:



Es decir, cada PEG es de aproximadamente 20.000 Da.

Así, en una realización, el PEG es 2,3-Bis(metilpolioxietilen-oxi)-1-{[3-(6-maleimido-1-oxohexil)amino]propiloxi}hexano (el PEG ramificado de 2 brazos, $-CH_2)_3NHCO(CH_2)_5$-MAL, Pm 40.000 conocido como SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Otras moléculas efectoras de PEG alternativas del siguiente tipo:



En una realización se proporciona un anticuerpo, tal como un anticuerpo de longitud completa, que está PEGilado (por ejemplo, con un PEG descrito en la presente memoria), unido a través de un resto de aminoácido cisteína en o alrededor del aminoácido 226 en la cadena, por ejemplo, un aminoácido 226 de la cadena pesada (por numeración secuencial).

En una realización la presente descripción proporciona una molécula de Fab'PEG que comprende uno o más polímeros de PEG, por ejemplo, 1 ó 2 polímeros tales como un polímero o polímeros de 40 kDa.

Las moléculas Fab-PEG según la presente descripción pueden ser particularmente ventajosas porque tienen una vida media independiente del fragmento Fc.

En una realización se proporciona un scFv conjugado con un polímero, tal como una molécula de PEG, una molécula de almidón o una molécula de albúmina.

En una realización el anticuerpo o fragmento se conjuga con una molécula de almidón, por ejemplo, para aumentar la

vida media. Los métodos de conjugación comienzan con una proteína como se describe en US 8.017.739.

Para identificar anticuerpos que inhiben la actividad de CSF-1R, los expertos en la técnica pueden adoptar una serie de enfoques diferentes. En un ejemplo, los inhibidores se identifican identificando primero los agentes que interactúan con CSF-1R y luego probando esos agentes para identificar aquellos que inhiben la actividad de CSF-1R. Los agentes que interaccionan con CSF1-R pueden identificarse empleando cualquier método adecuado, por ejemplo, empleando un sistema de ensayo sin células o basado en células donde el polipéptido CSF-1R se pone en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interaccionar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad de un agente candidato para interaccionar con un polipéptido CSF-1R se compara con un intervalo o control de referencia. Si se desea, este ensayo puede emplear para seleccionar una pluralidad (por ejemplo, una biblioteca) de agentes candidatos empleando una pluralidad de muestras de polipéptidos CSF-1R. En un ejemplo de un ensayo libre de células, una primera y segunda muestra que comprende el polipéptido CSF-1R nativo o recombinante se pone en contacto con un agente candidato o un agente de control y se determina la capacidad del agente candidato para interaccionar 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 une específicamente, o poniendo en contacto una preparación purificada de polipéptido con una superficie diseñada para unir proteínas. El polipéptido puede estar parcial o completamente purificado (por ejemplo, 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 CSF-1R o una porción activa biológicamente del mismo y un dominio, tal como glutatión-S-transferasa o la región Fc de IgG1. Alternativamente, el polipéptido puede biotinilarse empleando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL). La capacidad del agente candidato para interaccionar 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 microvolumen fluorescente (FMAT). En otro ejemplo donde se emplea un ensayo basado en células se pone en contacto una población de células que expresan CSF-1R con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interaccionar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad de un agente candidato para interaccionar con CSF-1R se compara con un intervalo de referencia o control. La célula, por ejemplo, puede ser de origen eucariota (por ejemplo, levadura o mamífero) y puede expresar el polipéptido CSF-1R de forma endógena o estar modificada genéticamente para expresar el polipéptido. En algunos casos, el polipéptido CSF-1R o el agente candidato se marca, por ejemplo, con un marcador radioactivo (tal como P, S o I) o un marcador fluorescente (tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o -ftaldehído o fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre un polipéptido y un agente candidato. También se pueden emplear métodos alternativos como ELISA, citometría de flujo y FMAT. Los agentes que inhiben la actividad de CSF-1R pueden identificarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo: (i) comparando la actividad de CSF-1R 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) determinar si el agente candidato inhibe la actividad de CSF-1R. Dichos ensayos pueden emplearse para seleccionar agentes candidatos, en monitorización clínica o en el desarrollo de fármacos. Como se describe anteriormente, los agentes pueden seleccionarse previamente cuando sea apropiado (por ejemplo, un anticuerpo) para identificar agentes que interaccionan con CSF-1R antes de seleccionar aquellos agentes que se unen por su capacidad para inhibir la actividad de CSF-1R. En un ejemplo se emplea un sistema de ensayo basado en células para identificar agentes capaces de inhibir la actividad de CSF-1R.

En un ejemplo particular el ensayo empleado para identificar inhibidores de la actividad CSF-1R es el ensayo de estimulación 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 agregan al ensayo y la proliferación de macrófagos se mide mediante cualquier método adecuado, tal como la incorporación de timidina H^3 o la conversión de colorante formazán. Por lo tanto, la inhibición se mide como una reducción en la proliferación en comparación con los controles.

Los agentes que inhiben la actividad de CSF-1R pueden identificarse o probarse adicionalmente, por ejemplo, para determinar cantidades eficaces terapéuticamente en uno o más modelos animales. Ejemplos de animales adecuados incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, monos, cobayas, perros y gatos.

En otro ejemplo, la inhibición de la actividad de CSF-1R se puede determinar controlando una mejoría o mejora en los síntomas de la enfermedad, y/o un retraso en el inicio o una progresión lenta de la enfermedad. Por ejemplo, pero sin limitación, en el caso de FPI, esto podría manifestarse como una reducción en la disminución de la función pulmonar medida mediante la capacidad vital forzada, una reducción en el deterioro de la capacidad de difusión medida por DLCO, o una reducción en la disminución de la distancia caminada durante seis minutos. La inhibición de la actividad de CSF-1R en pacientes con FPI también puede determinarse mediante el monitoreo de eventos clínicos tales como exacerbaciones, definidas como un rápido deterioro de la actividad de la enfermedad en ausencia de otras causas. En el caso de la fibrosis hepática, se puede emplear la prueba de fibrosis hepática mejorada (ELF) para controlar la enfermedad midiendo cuantitativamente la cantidad de ácido hialurónico, pro-péptido amino-terminal de pro-colágeno tipo III (PIIINP) e inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 (TIMP1) en suero y combinándolos a través del empleo de un algoritmo para producir una puntuación ELF única, cuya magnitud indica la gravedad de la enfermedad. Con respecto a la esclerosis sistémica, los efectos de la inhibición de CSF-1R podrían manifestarse como una progresión reducida de la puntuación de Rodnan modificada y/o la escala de gravedad de Medsger, o a nivel de los órganos individuales,

por ejemplo, el retraso de la enfermedad pulmonar intersticial asociada a la esclerodermia. El efecto de la inhibición de CSF-1R en el transcurso de la fibrosis renal que incluye, pero no se limita a, la enfermedad renal crónica y la fibrosis de injerto posterior al trasplante, podría manifestarse como una reducción en el deterioro o mejora de la tasa de filtración glomerular (TFG) y/o proteinuria.

Por lo tanto, en una realización que emplea un inhibidor de CSF-1R puede proporcionar una reducción en uno o más de los siguientes en la disminución de la función pulmonar medida por la capacidad vital forzada o una reducción en la disminución de la distancia recorrida en la prueba de la caminata de seis minutos en Pacientes con FPI. La prueba de fibrosis hepática mejorada (ELF) se puede emplear para controlar la fibrosis hepática midiendo cuantitativamente la cantidad de ácido hialurónico, pro-péptido amino-terminal de pro-colágeno tipo III (PIIINP) e inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 (TIMP1) en suero y combinándolos mediante el empleo de un algoritmo para producir una puntuación ELF única, cuya magnitud indica la gravedad de la enfermedad.

Las técnicas conocidas por los médicos familiarizados con la enfermedad fibrótica se pueden utilizar para determinar si un agente candidato ha alterado uno o más síntomas asociados con la enfermedad. Se conocen varios modelos diferentes de enfermedad fibrótica en la técnica. Estos incluyen fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, revisada en Moore BB y Hogaboam CM, 2008, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 294, L152-60; Scotton CJ y Chambers RC, 2010 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 299, L439-41, modelo de ratón deficiente en adenosina desaminasa de fibrosis inducida por adenosina (Chunn JL et al, 2005, J Immunol 175: 1937-46; Sun C_X et al, 2006, J Clin Invest, 116, 2173-82), fibrosis pulmonar inducida por radiación, (Sharplin J y Franko AJ, 1989, Radiation Research 119, 1-14; Sharplin J y Franko AJ, 1989, Radiation Research 119, 15-31; Johnston CJ et al, 1998, Exp Lung Res, 24, 321-37; Haston CK y Travis EL, 1997, Cancer Res 57, 5286-91; Katoh H et al, 2010, J Radiat Res, 51, 325-332), fibrosis pulmonar inducida por FITC (Roberts SN et al, 1995, J Pathol, 176, 309-18; Christensen, P et al, 1999, Am J Pathol, 155, 1773-79), fibrosis inducida por sílice en el ratón (Davis GS, et al, 1998, J Environ Pathol Toxicol Oncol 17, 81-97; Lakatos HF et al, 2006, Exp Lung Res 32, 181-99), el modelo de tetracloruro de carbono (CCl4) de fibrosis hepática (Iredale JP et al, 1998, J Clin Invest, 102, 538-49), el modelo de ligadura del conducto biliar de la fibrosis hepática (Stahelin BJ et al, 1999, Virchows Arch, 434, 333-39; Issa R et al, 2001, Gut, 48, 548-57), la UUO (obstrucción ureteral unilateral) de la fibrosis renal (Klahr S y Pukerson ML, 1994, Am J Kidney Dis, 23, 219-23; Satoh M et al, 2001, J Am Soc Nephrol, 12, 317-25), el modelo inducido por adriamicina de la enfermedad renal crónica (Tamaki, K et al, 1994, Kidney Int, 45, 525-36; Wang Y et al, 2000, Kidney Int, 58, 1797-1804 y revisado por Lee VW y Harris DC, 2011, Nephrology, 16, 30-38), el modelo de reducción 5/6 de la enfermedad renal crónica (Griffin A et al, 1994, J Am Soc Nephrol, 4, 2023-31; el modelo de esclerosis sistémica inducida por ácido hipocloroso (Servettaz, A et al, 2009, J Immunol, 182(9), 5855-64), y modelos alternativos de esclerosis sistémica, tales como la fibrosis cutánea inducida por bleomicina, el modelo de ratón de piel firme, en el que los ratones son heterocigotos para una mutación en el gen de fibrilina-1 y el modelo de enfermedad de injerto esclerodérmico frente al huésped donde los ratones desarrollan fibrosis pulmonar y cutánea , revisado en Yamamoto, T, 2010, J Dermatol, 37, 26-41. En general los diferentes modelos animales exhiben una excesiva producción y depósito de matriz extracelular que incluye colágeno en el órgano o tejido afectado, que es la característica de la fibrosis. Otras mediciones de la enfermedad fibrótica variarán entre modelos, ya que en los modelos específicos se afectan órganos diferentes. La elevación de los niveles de proteína y creatinina en la urea se puede medir en modelos de fibrosis renal, mientras que en los modelos de fibrosis pulmonar a menudo se usa una puntuación histopatológica del grado y la gravedad de la fibrosis, por ejemplo, la puntuación Ashcroft modificada (Hubner RH et al, 2008, Biotechniques 44: 507-17).

Las técnicas de monitoreo para la fibrosis incluyen pruebas de función pulmonar para la fibrosis pulmonar, la prueba ELF para enfermedad hepática/fibrosis, el FibroTest (análisis sanguíneo de marcadores de fibrosis) para enfermedad hepática y elastografía transitoria (Fibroscan®), que es una tecnología de imagen que proporciona una medida de rigidez hepática, útil para detectar y evaluar la fibrosis hepática. Se puede realizar también el análisis de muestras de tejido de una biopsia

Como se discute en la presente memoria, los inhibidores de la actividad de CSF-1R pueden emplearse en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad fibrótica. Para tal 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-1R y un diluyente, excipiente y/o vehículo aceptable farmacéuticamente. El término "tratamiento" incluye tanto terapia terapéutica como profiláctica. Cuando en la presente memoria se hace referencia 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 enfermedades fibróticas. La composición generalmente se suministrará como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un vehículo aceptable farmacéuticamente. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado de administración a un paciente). Los inhibidores de uso en la invención se administran preferiblemente a un sujeto por vía oral o intrarrectal, pero también se pueden administrar mediante una variedad de otras vías tales como la transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa e intramuscular. La vía más adecuada para la administración dependerá en cualquier caso del inhibidor particular, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto.

Los inhibidores de uso pueden administrarse en combinación, p. ej., de forma simultánea, secuencial o por separado, con uno o más compuestos activos terapéuticamente, que pueden ser, por ejemplo, una terapia anti-fibrótica tal como

Pirfenidona o terapias anticancerosas.

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, por ejemplo, pero sin limitación, de 1000 mg/kg a 0,01 mg/kg, por ejemplo, de 750 mg/kg a 0,1 mg/kg, tal como 100 mg/kg a 1 mg/kg, dependiendo de la afección a tratar, la vía de administración y la edad, peso y condición del sujeto.

Los vehículos aceptables farmacéuticamente para emplear en la invención pueden tomar 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 líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, disoluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para la reconstitución 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, pueden incluirse vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes, y similares. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean generalmente vehículos farmacéuticos sólidos.

Además de las formas de dosificación comunes establecidas anteriormente, los agentes activos de la invención también pueden administrarse por medios de liberación controlada y/o dispositivos de administración. Los comprimidos y las cápsulas pueden comprender vehículos o excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; rellenadores, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para comprimidos, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; disgregantes por ejemplo, almidón de patata; o agentes humectantes aceptables, tales como laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas acuosas o no acuosas estándar según métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades separadas, 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 disolución o 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 mediante 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 uniforme e íntimamente el agente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos divididos finamente o ambos, y luego, si es necesario, moldeando el producto en la presentación deseada. Por ejemplo, un comprimido se puede preparar por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden prepararse como disoluciones o suspensiones de los agentes activos de la invención en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir del crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones de inyección estériles acuosas o no acuosas que pueden contener anti-oxidantes, 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 puede incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las disoluciones de inyección extemporáneas, dispersiones y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición farmacéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: US 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar la medicación a una velocidad controlada; US 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; US 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicamentos para administrar la medicación a una velocidad de infusión precisa; US 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro continuo de fármacos; US 4,439,196, que describe un sistema de suministro de fármacos osmóticos que tiene compartimentos multi-cámara; y US 4.475.196, que divulga un sistema de administración de fármacos osmóticos. Muchos otros de dichos implantes, sistemas de administración, y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, disoluciones, pastas, geles, apósitos impregnados, pulverizadores, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos, y similares. Estas composiciones pueden prepararse mediante métodos convencionales que contienen el agente activo. Por lo tanto, también pueden comprender vehículos y aditivos convencionales compatibles, tal como conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, emolientes en cremas o ungüentos y etanol o alcohol oleico para lociones. Tales vehículos pueden estar presentes desde aproximadamente 1 por ciento hasta aproximadamente 98 por ciento de la composición. Más habitualmente formarán hasta aproximadamente el 80 por ciento de la composición. Sólo a modo de ilustración, se prepara una crema o

pomada mezclando cantidades suficientes de material hidrofílico y agua, que contienen de aproximadamente 5-10 por ciento en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o pomada que tiene la consistencia deseada. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches separados destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Por ejemplo, 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 bien con una base de pomada parafínica o bien con una base miscible en agua. Alternativamente, 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, y colutorios. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en el ojo incluyen gotas oculares en donde el agente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. También incluyen pomadas o cremas tópicas como los anteriores. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal en donde el vehículo es un sólido se presentan más preferiblemente como supositorios de dosis unitarias. Vehículos adecuados incluyen manteca de cacao u otro glicérido o materiales comúnmente utilizados en la técnica, y los supositorios pueden formarse convenientemente mediante la mezcla de la combinación con el vehículo o vehículos ablandados o fundidos seguido de moldes de enfriamiento y conformación. También se pueden administrar como enemas.

La dosificación a administrar de un inhibidor de la actividad de CSF-1R variará según el inhibidor particular, el tipo de enfermedad fibrótica, 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 se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica. Para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad fibrótica en seres humanos y animales, las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos pueden administrarse a pacientes (p. ej., sujetos humanos) a dosis eficaces terapéutica o profilácticamente (p. ej., dosis que dan como resultado la inhibición de la enfermedad fibrótica y/o el alivio de los síntomas de la enfermedad fibrótica) empleando cualquier vía de administración adecuada, tal como la inyección y otras vías de administración conocidas en la técnica para productos clínicos, tales como productos clínicos basados en anticuerpos. Las composiciones pueden contener al menos 0,05 por ciento en peso, por ejemplo, 0,5 a 50 por ciento en peso, tal como 1 a 10 por ciento en peso, o más, en peso, del inhibidor de la invención, dependiendo del método de administración. Un experto en la materia reconocerá que la cantidad y el espaciamiento óptimos de las dosis individuales de un inhibidor de la invención se determinarán por la naturaleza y el alcance de la afección a tratar, la forma, la vía y el sitio de administración, y la edad y el estado del sujeto particular que se está tratando, y que un médico determinará en finalmente las dosis apropiadas a emplear. Esta dosis puede repetirse tantas veces como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosis puede alterarse o reducirse, de acuerdo con la práctica clínica normal.

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y de ningún modo deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras

Figura 1A muestra la secuencia de aminoácidos para CSF-1R humano

Figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos para ciertas variantes de CSF-1R

Figura 1C muestra una secuencia de aminoácidos de CSF-1R adecuada para la expresión en superficies celulares

Figura 2 muestra datos de citometría de flujo que confirman que el CSF-1 unido al receptor en células M-NFS-60 se detectaba por este método

Figura 3 muestra que Ab535, bien inmovilizado en la superficie del pocillo del cultivo de tejido o bien libre en disolución, no respaldó la proliferación de células M-NFS-60 en ausencia de CSF-1 a las concentraciones utilizadas

Figura 4a muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 reduce la cantidad de colágeno líquido LBA en comparación con el tratamiento con el control de isotipo.

Figura 4b muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 reduce la puntuación de Ashcroft de las muestras en comparación con el tratamiento con el control de isotipo, demostrando que los ratones tratados con Ab535 habían mejorado la patología fibrótica.

Figura 4c muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 reduce la cantidad de albúmina en el líquido LBA en comparación con el tratamiento con el control de isotipo, lo que demuestra, por tanto, que se mejoró la integridad de la barrera pulmonar de los ratones tratados con Ab535.

Figura 4d muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 reduce el número de macrófagos en el líquido LBA.

Figura 5 muestra imágenes representativas del análisis histopatológico de pulmones de control salino, bleomicina más control de isotipo y bleomicina más animales tratados con Ab535. Los animales tratados con Ab535 tenían una fibrosis pulmonar muy reducida en comparación con el control de isotipo, animales tratados con bleomicina.

Figura 6a muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida, con Ab535, reduce la concentración de colágeno BALF en comparación con el tratamiento con el control de isotipo.

Figura 6b muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida, con Ab535, reduce la puntuación de Ashcroft de las muestras en comparación con el tratamiento con el control de isotipo, demostrando que los ratones tratados con Ab535 habían mejorado la patología fibrótica.

Figura 6c muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida, con Ab535, reduce la cantidad de albúmina en el LBA en comparación con el tratamiento con el control de isotipo, demostrando que se mejoró la integridad de la barrera pulmonar de los ratones tratados con Ab535.

Figura 6d muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida, con Ab535, reduce el número de macrófagos en el líquido LBA.

Figura 7 muestra imágenes representativas del análisis histopatológico del tejido pulmonar de ratones genosuprimidos para ADA y ratones de tipo salvaje tratados con Ab535 o un anticuerpo de control de isotipo (IgG1 de ratón). Las secciones de tejido pulmonar se tiñeron con tricrómico de Masson. El tratamiento de ratones genosuprimidos para ADA con Ab535 redujo considerablemente la cantidad de tejido fibrótico y depósito de colágeno.

Ejemplo 1 Aislamiento de un anticuerpo CSF-1R de anti-ratón

2 conejos recibieron 5 inmunizaciones con células que expresan transitoriamente los restos 1-512 de CSF-1R de ratón (Uniprot Entry p09581). La respuesta de anticuerpos se controló en un ELISA usando placas Nunc Maxisorp recubiertas con 2 µg/ml de ratón CSF-1R- Fc de conejo. Se observaron títulos de suero a dilución 1:100.000 con ambos conejos. La unión de los sueros a las células M-NFS-60 (Metcalf et al., 1970) también se determinó mediante FACS. La media de FL1 se trazó frente a la dilución de anticuerpos. Se observó la unión a una dilución de 1:10.000.

Usando la línea celular M-NFS-60 dependiente de CSF-1 (Metcalf et al., 1970), se demostró que los sueros de ambos conejos podrían bloquear la supervivencia celular dependiente de CSF-1 a una dilución de 1:100 (datos no mostrados).

Se sembraron cien placas de 96 pocillos con 1000-5000 PBMCs de conejo por pocillo y se cultivaron durante 1 semana a 37ºC en presencia de células de timoma de ratón EL4-B5 y medio acondicionado de células T de conejo (TSN). Después en un ensayo FMAT se evaluaron los sobrenadantes que contienen anticuerpos empleando células M-NFS-60 y conjugado específico de Fc Cy5 anti-conejo. Se identificaron 678 ligantes CSF-1R. De estos, aproximadamente el 3% bloqueó la proliferación de M-NFS-60 dependiente de CSF-1 en un ensayo celular. Los aglutinantes también se evaluaron en un ELISA empleando placas recubiertas con 2 mg/ml de Fc de conejo CSF-1R y la unión se reveló con un conjugado anti-conejo F(ab')2-HRP. Los aglutinantes se evaluaron también en un ensayo de bloqueo en fase sólida basado en ELISA. Para este ensayo, las placas Nunc Maxisorp de 384 pocillos se recubrieron con 0,5 mg/ml de Fc de conejo-CSF-1R y posteriormente se bloquearon en PBS/Tween-20 al 0,1%/PEG20000 al 1%. Las placas se lavaron antes de que se añadiera el sobrenadante de cultivo a las placas y se incubaron durante>1 hora a temperatura ambiente. Luego se añadió CSF-1 al sobrenadante a una concentración final de 10 ng/ml y se incubó durante 1 hora más a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y luego se incubaron con 0,5 mg/ml de anticuerpo biotinilado de cabra anti-ratón CSF-1 (R&D systems). La unión de CSF-1 al receptor se reveló empleando estreptavidina-HRP. Para la progresión se seleccionaron ocho pocillos. Todos demostraron unión a células y proteínas y se bloquearon en el ensayo M-NFS-60 y en el ELISA.

Para identificar las células B específicas de antígeno de un pocillo positivo se empleó un método basado en fluorescencia. Las células B secretoras de inmunoglobulina de un pocillo positivo se mezclaron con perlas de estreptavidina recubiertas con Fc de conejo-CSF-1R de ratón biotinilado y un conjugado FITC específico de fragmento F(ab')2 anti-conejo F(ab')2 de cabra (Jackson ImmunoResearch). Después de la incubación a 37ºC durante 1 hora, el anticuerpo secretado por las células B específicas de antígeno se capturó en perlas en la proximidad de esa célula B. La presencia del conjugado FITC dio como resultado el marcado de perlas recubiertas con anticuerpos y la formación de focos fluorescentes alrededor de las células B específicas de antígeno. Estas células B individuales, identificadas empleando un microscopio fluorescente, se recogieron después con un micromanipulador y se depositaron en un tubo de PCR. Los genes de la región variable del anticuerpo se recuperaron a partir de células individuales mediante transcripción inversa (RT)-PCR. Las regiones V de conejo se expresaron luego como anticuerpos quiméricos IgG4 humanos o Fabs en un sistema de expresión transitoria CHO. 4 de 8 pocillos produjeron anticuerpos anti-CSF-1R recombinantes. La actividad de neutralización con los anticuerpos recombinantes se confirmó después en el ensayo M-NFS-60. BIAcore también se realizó utilizando las moléculas Fab para determinar la afinidad por Fc de conejo CSF-

1R (Tabla 1). En base a la actividad de neutralización y la afinidad, Ab535 se seleccionó como el reactivo CSF-1R anti-ratón. Este anticuerpo fue posteriormente murinizado, expresado en un sistema de mamífero como IgG1 murino de longitud completa y purificado.

Método BIAcore

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para unirse a CSF-1R en un ensayo BIAcore mediante la medición de las cinéticas de unión a una proteína de fusión CSF-1R/Fc recombinante purificada.

El formato del ensayo fue la captura de los anticuerpos anti-CSF-1R mediante el IgG anti-humano inmovilizado, $F(ab')_2$, seguido de una titulación de hCSF-1R/Fc sobre la superficie capturada. Se realizó un BIA (Análisis de interacción biamolecular, de sus siglas en inglés) utilizando un BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Todos los experimentos se realizaron a 25ºC Affinipure $F(ab')_2$ fragmento de cabra anti-IgG humana, ,se inmovilizó un fragmento específico $F(ab')_2$ (Jackson ImmunoResearch) en un chip sensor CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) mediante química de acoplamiento de amina a un nivel de ~6000 unidades de respuesta (UR). Se empleó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Surfactante P20 al 0,005%, GE Healthcare Bio-Sciences AB) como tampón de migración con una velocidad de flujo de 10 ml/min. Se realizó una inyección de un anticuerpo anti-CSF-1R para proporcionar un nivel de captura de aproximadamente 100 UR en la IgG antihumana inmovilizada,$F(ab)_2$.

El CSF-1R/Fc humano recombinante se tituló (R&D Systems), duplicando la dilución, de 2,5 nM a 78 pM sobre el anticuerpo anti-CSF-1R capturado a una velocidad de flujo de 30 ml/ min durante 3 minutos seguido de una fase de disociación de 8 minutos. Estos sensorgramas se emplearon para generar la tasa de asociación. La superficie se regeneró a una velocidad de flujo de 10 ml/min mediante dos inyecciones secuenciales de 10 ml de HCl 40 mM seguido de una inyección de 5 ml de NaOH 10 mM. Las curvas de unión sustraídas de fondo con doble referencia se analizaron empleando el programa informático BIAevaluation (versión 4.1) siguiendo los procedimientos estándar. Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del algoritmo de ajuste.

Los resultados para Ab535 se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Anticuerpo ref:	Factor de asociación ka ($M^{-1}s^{-1}$)	Factor de disociación kd (s^{-1})	Constante de afinidad K_D
Ab535	8,05 ± 0,01 e 6	1,21 + 0,15 e -5	1,50 pM

Ejemplo 2 Análisis *in vitro* de Ab535

Ab535 bloquea la unión de CSF-1 murina al receptor CSF-1 positivo de líneas celulares *in vitro*

Se investigó la capacidad del Ab535 unido al receptor para evitar que CSF-1 se una al CSF-1R. Se empleó una línea celular murina positiva al CSF-1R, M-NFS-60, en un ensayo en el que las células se incubaron previamente con Ab535 o un anticuerpo de control antes de la exposición a CSF-1. El CSF-1 unido al receptor se detectó luego usando un anticuerpo marcado con fluorescencia y citometría de flujo. Se interpretó que una disminución dependiente de Ab535 en la intensidad de fluorescencia celular indicaba una capacidad de Ab535 unido a receptor para evitar la unión de CSF-1 a CSF-1R.

Las células M-NFS-60 (LGC Promochem, Teddington, Reino Unido) se mantuvieron en suspensión en medio basal RPMI (Invitrogen) enriquecido con suero de ternera fetal (PAA) al 10%, Hepes (Invitrogen, concentración final 10 mM), Piruvato de Sodio (Invitrogen, concentración final 1 mM) Glucosa (Sigma-Aldrich, concentración final de 4,5 g/l), Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, concentración final del 1,5%), beta-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, concentración final de 0,05 mM), CSF-1 murino recombinante (Preprotech, concentración final de 3,3 ng/ml).

Las células M-NFS-60 se prepararon en tampón de flujo (PBS (Invitrogen) enriquecido con BSA al 0,2% (Sigma-Aldrich), azida de sodio al 0,09% (Sigma-Aldrich)) a una concentración de 1x10E6 células/ml. Se prepararon diluciones en serie de Ab535 o un anticuerpo de control de isotipo IgG1 murino en tampón de flujo y se añadieron a alícuotas de células de 100 ml para alcanzar concentraciones finales de 20, 5, 1,25, 0,32, 0,08 mg/ml en un volumen de 200 ml y se incubaron en hielo durante. 1 hora. Posteriormente, las células se lavaron dos veces en tampón de flujo, se incubaron con 0,5 mg/ml de CSF-1 murino recombinante durante 30 minutos en hielo y se lavaron dos veces en tampón de flujo. Para detectar el CSF-1 unido al receptor, las células se incubaron con un anticuerpo CSF-1 anti-murino biotinilado (R&D Systems, 5 mg/ml) durante 30 minutos en hielo, se lavaron dos veces en tampón de flujo y se unieron al anticuerpo marcado mediante incubación con Alexafluor 488-estraptavidina conjugada (Invitrogen, dilución 1:200) en hielo durante 15 minutos antes de una etapa de lavado final y de resuspensión de las células en 500 ml de tampón de flujo. Se evaluó la fluorescencia de las células mediante citometría de flujo empleando un citómetro de flujo FACSCaliber (Becton Dickinson) y los datos se analizaron empleando el programa informático WinMDI.

El análisis de los datos de citometría de flujo confirmó que CSF-1 unido al receptor en células M-NFS-60 era detectable

por este método (Figura 2a). La incubación de las células con Ab535 a cualquiera de las concentraciones utilizadas, antes de la adición de CSF-1 evitó la unión de CSF-1 a CSF-1R (Figura 2b). La incubación de células con un anticuerpo de control de isotipo en cualquiera de las concentraciones utilizadas no tuvo efecto sobre la unión y la detección de CSF-1 (Figura 2c).

La unión de Ab535 a CSF-1R no sustituye a CSF-1 en la proliferación y supervivencia de una línea celular dependiente de CSF-1 *in vitro*

Se investigó la capacidad de Ab535 para sustituir CSF-1 en el apoyo a la supervivencia y proliferación de células dependientes de CSF-1 empleando células M-NFS-60 en un ensayo de proliferación celular que incluyó exponer células a Ab535 libre en disolución e inmovilizado en plástico.

Para evaluar la capacidad del Ab535 inmovilizado para soportar células dependientes de CSF-1, los pocillos de una placa de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos se recubrieron previamente con Ab535 o un anticuerpo de control de isotipo irrelevante durante 24 horas antes de iniciar el ensayo de proliferación celular mediante la adición de 50 ml por pocillo de una disolución que contiene 10 mg/ml o 1 mg/ml de anticuerpo en PBS e incubación a 4ºC. Los pocillos se aspiraron y el anticuerpo no unido se eliminó lavando cada pocillo dos veces con 100 ml de PBS.

Las células M-NFS-60 proliferantes, mantenidas como se describie anteriormente, se sembraron en placas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo en 50 ml de medio de crecimiento sin CSF-1. A los pocillos apropiados se añadió un medio de crecimiento adicional de 50 µl, enriquecido bien con CSF-1 murino recombinante, Ab535 o sin enriquecer. Las placas se incubaron durante 72 horas y se determinó el número de células empleando un kit CellTiter Glo según las instrucciones del fabricante (Promega) para generar una lectura luminiscente medible proporcional a los niveles de ATP y, por lo tanto, al número de células, para cada una de las condiciones ensayadas. Todas las condiciones se realizaron por triplicado.

El análisis de los datos confirmó que M-NFS-60 depende de CSF-1 para la proliferación, como lo refleja el número de células significativamente mayor en los pocillos enriquecidos con CSF-1 en comparación con los que se mantienen en un medio de crecimiento sin CSF-1. Además, Ab535, bien inmovilizado en la superficie del pocillo de cultivo tisular,, o bien libre en disolución, no ayudó a la proliferación de células M-NFS-60 en ausencia de CSF-1 a las concentraciones empleadas (Figura 3).

Ejemplo 3. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1R en un modelo de fibrosis pulmonar *in vivo* inducido por Bleomicina

La bleomicina es un antibiótico que se aisló por primera vez de *Streptomyces verticillatus* y se ha utilizado como quimioterapéutico para varios tipos de cáncer. El modelo de bleomicina de la fibrosis pulmonar es un modelo bien establecido y se empleó esencialmente como se describe en Madtes, DK et al, 1999, Am J Respir Cell Mol Biol, 20, 924-34. El protocolo detallado se puede encontrar en la siguiente referencia Morschl, E., Molina, JG, Volmer, J., Mohsenin, A., Pero, R. S., Hong, J. S., Kheradmand, F., Lee, J. J. y Blackburn, M. R. (2008), la señalización del receptor de adenosina A3 influye en la inflamación pulmonar y en la fibrosis. A.m. J. Respir. Cell Mol. Biol.39: 697-705.

Todos los ratones utilizados fueron ratones hembra C57Blk6 de tipo salvaje (20 g) comprados en Harlan Labs. Se usó una instilación intratraqueal (IT) en la que se anestesió a los ratones con avertina y se realizó una traqueotomía para instilar una dosis de 3,5 unidades de bleomicina en 50 ml de disolución salina o sólo 50 ml de disolución salina como control. El tratamiento conduce de esta manera a una fase inflamatoria que alcanza su punto máximo el día 7 después de la exposición a la bleomicina y a una fase fibrótica que es máxima el día 21 después de la exposición. El efecto del anticuerpo Ab535 se investigó cuando el anticuerpo se dosificó sólo en la fase fibrótica del modelo y se administró por vía subcutánea a 30 mg/kg, tres veces por semana del día 9 al 21. Los animales se sacrificaron el día 21 y las lecturas incluyeron análisis histopatológicos de los pulmones, celularidad del líquido LBA (lavado broncoalveolar) y la medición de colágeno soluble en el fluido de LBA. El análisis histopatológico se realizó para evaluar el daño pulmonar utilizando un sistema de puntuación Ashcroft modificado para determinar la gravedad de la fibrosis pulmonar (Hubner RH et al, 2008, Biotechniques 44:507-17). Los pulmones extirpados se inflaron con formalina al 10% a una presión de 25 cm y se procesaron a través de una serie de alcoholes y xileno, embebidos en parafina y secciones de tejido desparafinizadas antes del procesamiento y tinción con Tricrómico de Masson.

Se evaluó la cantidad de colágeno soluble en fluido LBA utilizando un kit de ensayo Sircol disponible en el mercado siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se determinó el efecto sobre la población de macrófagos en el fluido de LBA usando preparaciones de citospina. Se centrifugaron alícuotas de células LBA sobre el portaobjetos de microscopio, se tiñeron con Diff-Quick y se contaron los macrófagos.

Se descubrió que el tratamiento terapéutico con el anticuerpo anti-CSF-1R, Ab535, con la dosificación iniciada en el día 9 dio como resultado una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina muy reducida. Tanto la gravedad como la extensión de la fibrosis se redujeron significativamente. Los ratones tratados habían reducido la producción de colágeno, mejoraron la patología fibrótica y mejoraron la protección de la barrera pulmonar.

Figura 4a muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 reduce la cantidad de

colágeno en el fluido LBA en comparación con el tratamiento con el control de isotipo.

Figura 4b muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 reduce la puntuación de Ashcroft de las muestras en comparación con el tratamiento con el control de isotipo demostrando que los ratones tratados con Ab535 mejoraron la patología fibrótica.

Figura 4c muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 reduce la cantidad de albúmina en el fluido LBA en comparación con el tratamiento con el control de isotipo demostrando que mejoró la permeabilidad vascular y la integridad de la barrera pulmonar de los ratones tratados con Ab535.

Figura 4d muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 reduce el número de macrófagos en el fluido LBA.

Figura 5 muestra imágenes representativas del análisis histopatológico de pulmones de animales tratados a partir del control salino, bleomicina más control de isotipo y bleomicina más Ab 535. Los animales tratados con Ab 535 tenían una fibrosis pulmonar muy reducida en comparación con el control de isotipo, en animales tratados con bleomicina.

Ejemplo 4. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1R en un modelo de fibrosis pulmonar de ratón deficiente en adenosina desaminasa

La adenosina es un potente nucleósido de señalización, cuyos niveles aumentan cuando las células sufren estrés o están dañadas y se produce una amplia variedad de respuestas cuando la adenosina se involucra con sus receptores acoplados a proteínas G específicas. La adenosina desaminasa (ADA) es una enzima del catabolismo de la purina que convierte la adenosina en inosina. Se han generado ratones inmunosuprimidos a ADA y se ha demostrado que aumentan los niveles de adenosina en el suero, así como en tejidos tales como el riñón, el hígado y el pulmón (Blackburn, MR et al, 1998, J Biol Chem, 273(9): 5093-5100). Estos ratones exhiben características de enfermedad pulmonar crónica, tal como destrucción alveolar, inflamación de las vías respiratorias y producción excesiva de moco, que se asocian con niveles elevados de adenosina en el pulmón (Blackburn MR et al, 2000, J Exp Med, 192: 159-70). Los efectos son tales que los ratones mueren a las tres semanas de edad debido a dificultad respiratoria. La administración de ADA exógena empleando un régimen de dosis baja reduce los niveles de adenosina y prolonga la esperanza de vida de estos ratones permitiendo que se desarrolle un modelo de fibrosis pulmonar (Chunn JL et al, 2005, J Immunol 175: 1937-46, Pedrosa M et al, 2011, PLoS One, 6(7): e22667). En este modelo, la elevación crónica de los niveles de adenosina se asocia con un aumento de los mediadores pro-fibróticos, incluido el TGFβ-1 en los pulmones, un aumento del depósito de colágeno en el tejido pulmonar y una mayor patología fibrótica pulmonar. Para investigar el efecto de las moléculas con potencial anti-fibrótico, los ratones con deficiencia de ADA se mantienen con un régimen de ADA exógeno a dosis bajas durante varias semanas, después se suspende el tratamiento con ADA y se administra el posible agente anti-fibrótico.

El efecto del anticuerpo anti-CSF-1R Ab535 se investigó en el modelo de ratón inmunosuprimido a ADA de fibrosis pulmonar. En este modelo, los ratones con deficiencia enzimática se mantuvieron con terapia de enzima ADA desde el día 1 hasta el día 21 después del nacimiento. Se preparó un conjugado ADA-polietilenglicol (PEG) (Young HW et al, 2004, J Immunol 173: 1380-89) e inyecciones intramusculares administradas en los días posnatales 1, 5, 9, 13 y 17 (0,625, 1,25, 2,5, 2,5 y 2,5 unidades respectivamente), seguidas de 5 unidades inyectadas intraperitonealmente el día 21. No se administró más enzima después del día 21. Se dosificó Ab535 por vía subcutánea a 30 mg/kg, en un volumen de 100 ml tres veces/semana desde el día 25 (después del parto) hasta que los animales se sacrificaron el día 42.

Los animales se sacrificaron en el día 42 y las lecturas incluyeron análisis histopatológicos de los pulmones, celularidad del fluido LBA y cuantificación de colágeno soluble en fluido LBA. El análisis histopatológico se realizó para evaluar el daño pulmonar utilizando un sistema de puntuación Ashcroft modificado para determinar la gravedad de la fibrosis pulmonar (Hubner et al, 2008, Biotechniques 44:507-17) Los pulmones extirpados se inflaron con formalina al 10% a una presión de 25 cm y se procesaron a través de una serie de alcoholes y xileno, embebidos en parafina y secciones de tejido desparafinizadas antes del procesado y tinción con tricrómico de Masson.

La cantidad de colágeno soluble en el fluido LBA también se evaluó utilizando un kit de ensayo Sircol disponible comercialmente siguiendo las instrucciones del fabricante.

El efecto sobre la población de macrófagos en el fluido LBA se determinó usando preparaciones de citospina. Se centrifugaron alícuotas de células LBA sobre un portaobjetos de microscopio, se tiñeron con Diff-Quick y se contaron los macrófagos.

Se descubrió que el tratamiento terapéutico con el anticuerpo anti-CSF-1R Ab535 reduce significativamente la fibrosis pulmonar en ratones con deficiencia de ADA. Los ratones tratados habían reducido la producción de colágeno, mejoraron la patología fibrótica y mejoraron la función y protección de la barrera pulmonar.

Figura 6a muestra que el tratamiento de ratones con deficiencia de ADA con fibrosis pulmonar inducida con Ab535 reduce la concentración de colágeno del fluido LBA en comparación con el tratamiento con el control de isotipo.

Figura 6b muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida con Ab535 reduce la puntuación de Ashcroft de las muestras en comparación con el tratamiento con el control de isotipo que demuestra que los ratones tratados con Ab535 habían mejorado la patología fibrótica.

Figura 6c muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida con Ab535 reduce la concentración de albúmina en el fluido LBA en comparación con el tratamiento con el control de isotipo demostrando que mejoraron la permeabilidad vascular y la integridad de la barrera pulmonar de los ratones tratados con Ab535.

Figura 6d muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida, con Ab535, reduce el número de macrófagos en el fluido LBA.

Figura 7 muestra imágenes representativas del análisis histopatológico del tejido pulmonar de ratones inmunosuprimidos para ADA y ratones de tipo salvaje tratados bien con Ab535 o bien con un anticuerpo de control de isotipo (IgG1 de ratón). Las secciones de tejido pulmonar se tiñeron con tricrómico de Masson. El tratamiento de ratones inmunosuprimidos para ADA con Ab535 reduce en gran medida la cantidad de tejido fibrótico y el depósito de colágeno.

Por consiguiente, se ha demostrado en dos modelos de fibrosis pulmonar en ratones que el tratamiento con un anticuerpo anti-CSF-1R puede tratar eficazmente la enfermedad fibrótica.

Lista de secuencias

<110> UCB Biopharma SPRL

<120> MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES FIBRÓTICAS

<130> G0180-PCT

<150>GB1315486.9
<151> 2013-08-30

<160> 5

<170> versión PatentIn 3.5

<210> 1
<211> 972
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia CSF-1R humana

<400> 1

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His
1 5 10 15

Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val
20 25 30

Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val
35 40 45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly
50 55 60

Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala
85 90 95

Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala
100 105 110

Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu
115 120 125

Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg
130 135 140

Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His
145 150 155 160

Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln
165 170 175

Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg
180 185 190

Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val
195 200 205

Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys
210 215 220

Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn
225 230 235 240

Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg
245 250 255

Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His
260 265 270

Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser
275 280 285

Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser
290 295 300

Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn
305 310 315 320

Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp
325 330 335

Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala
340 345 350

Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu
355 360 365

Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg
370 375 380

Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr
385 390 395 400

Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr

405 410 415

Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu
420 425 430

Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln
435 440 445

Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His
450 455 460

Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn
465 470 475 480

Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp
485 490 495

Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
500 505 510

Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu
515 520 525

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro
530 535 540

Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser
545 550 555 560

Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu
565 570 575

Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala
580 585 590

Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp
595 600 605

Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala
610 615 620

Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu
625 630 635 640

Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly
645 650 655

Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu
660 665 670

Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser
675 680 685

Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu
690 695 700

Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val
705 710 715 720

Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser
725 730 735

Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu
740 745 750

Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe
755 760 765

Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val
770 775 780

Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
785 790 795 800

Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg
805 810 815

Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr
820 825 830

Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile
835 840 845

Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys
850 855 860

Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe
865 870 875 880

Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu
885 890 895

Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu
900 905 910

Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser
915 920 925

Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu
930 935 940

Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala
945 950 955 960

Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Tyr Gln Phe Cys
965 970

<210> 2
<211> 277
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos para CSF-1R

<400> 2

Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
20 25 30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
35 40 45

Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
50 55 60

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
100 105 110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
180 185 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
260 265 270

Phe Phe Arg Val Val
275

<210> 3
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos para CSF-1R (ENSP00000421174 49 aminoácidos)

<400> 3

Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr Ile
1 5 10 15

His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala Leu
20 25 30

Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val Gln
35 40 45

Lys

<210> 4
<211> 493
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos para CSF-1R (SNP V32G, A245S, H247P, V279M, posición subrayada)

<400> 4

```
Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val Lys Pro Gly
1               5                   10                  15

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
            20                  25                  30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
        35                  40                  45

Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
    50                  55                  60

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
                85                  90                  95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
            100                 105                 110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
        115                 120                 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
    130                 135                 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
145                 150                 155                 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
                165                 170                 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
            180                 185                 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
        195                 200                 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
```

210 215 220

Leu Ala Ile His Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
260 265 270

Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln
275 280 285

Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn Leu Lys Val
290 295 300

Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp Thr Tyr Leu
305 310 315 320

Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala Asn Ala Thr
325 330 335

Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu Pro Arg Leu
340 345 350

Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg Asn Pro Gly
355 360 365

Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Pro Glu
370 375 380

Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys
385 390 395 400

Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser
405 410 415

Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln Val Trp Asp
420 425 430

Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His Lys Val Thr
435 440 445

Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr
450 455 460

Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile
465 470 475 480

Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
485 490

<210> 5
<211> 512

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Forma CSF-1R adecuada para la expresión en una superficie celular

<400> 5

```
Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His
1               5                   10                  15

Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val
            20                  25                  30

Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val
        35                  40                  45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly
    50                  55                  60

Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly
65                  70                  75                  80

Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala
                85                  90                  95

Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala
            100                 105                 110

Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu
        115                 120                 125

Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg
    130                 135                 140

Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His
145                 150                 155                 160

Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln
                165                 170                 175

Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg
```

180 185 190

Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val
195 200 205

Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys
210 215 220

Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn
225 230 235 240

Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg
245 250 255

Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His
260 265 270

Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser
275 280 285

Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser
290 295 300

Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn
305 310 315 320

Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp
325 330 335

Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala
340 345 350

Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu
355 360 365

Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg
370 375 380

Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr
385 390 395 400

Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr
405 410 415

Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu
420 425 430

Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln
435 440 445

Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His
450 455 460

Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn
465 470 475 480

Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp
485 490 495

Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
500 505 510

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la actividad del receptor del factor 1 estimulante de colonias (CSF-1R) para emplear en el tratamiento y/o profilaxis de la fibrosis pulmonar, en donde el inhibidor es un anticuerpo o fragmento activo funcionalmente del mismo y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se une al CSF-1R.

2. El inhibidor de la actividad CSF-1R para el uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico.

3. El inhibidor de la actividad de CSF-1R para el uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el fragmento de anticuerpo es un Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv o un fragmento de unión a epítopo del mismo.

4. El inhibidor de la actividad de CSF-1R para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se conjuga con una o más moléculas efectoras.

5. El inhibidor de la actividad de CSF-1R para el uso según cualquier reivindicación precedente, en donde la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

6. El inhibidor de la actividad de CSF-1R para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el inhibidor de la actividad de CSF-1R se administra en combinación con uno o más de otros compuestos activos terapéuticamente.

7. El inhibidor de la actividad de CSF-1R para el uso según la reivindicación 6 en el que el otro compuesto activo terapéuticamente es otro agente terapéutico anti-fibrótico.

Figura 1A

Secuencia CSF-1R Humana: SEQ ID NO: 1

```
        10         20         30         40         50         60
MGPGVLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNGSVEW DGPPSPHWTL
        70         80         90        100        110        120
YSDGSSSILS TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY VKDPARPWNV LAQEVVVFED
       130        140        150        160        170        180
QDALLPCLLT DPVLEAGVSL VRVRGRPLMR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL
       190        200        210        220        230        240
MGGRKVMSIS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDVFLQHN
       250        260        270        280        290        300
NTKLAIPQQS DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA SNVQGKHSTS MFFRVVESAY
       310        320        330        340        350        360
LNLSSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSDHQPEPK LANATTKDTY
       370        380        390        400        410        420
RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWTF INGSGTLLCA
       430        440        450        460        470        480
ASGYPQPNVT WLQCSGHTDR CDEAQVLQVW DDPYPEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN
       490        500        510        520        530        540
QTYECRAHNS VGSGSWAFIP ISAGAHTHPP DEFLFTPVVV ACMSIMALLL LLLLLLYKY
       550        560        570        580        590        600
KQKPKYQVRW KIIESYEGNS YTFIDPTQLP YNEKWEFPRN NLQFGKTLGA GAFGKVVEAT
       610        620        630        640        650        660
AFGLGKEDAV LKVAVKMLKS TAHADEKEAL MSELKIMSHL GQHENIVNLL GACTHGGPVL
       670        680        690        700        710        720
VITEYCCYGD LLNFLRRKAE AMLGPSLSPG QDPEGGVDYK NIHLEKKYVR RDSGFSSQGV
       730        740        750        760        770        780
DTYVEMRPVS TSSNDSFSEQ DLDKEDGRPL ELRDLLHFSS QVAQGMAFLA SKNCIHRDVA
       790        800        810        820        830        840
ARNVLLTNGH VAKIGDFGLA RDIMNDSNYI VKGNARLPVK WMAPESIFDC VYTVQSDVWS
       850        860        870        880        890        900
YGILLWEIFS LGLNPYPGIL VNSKFYKLVK DGYQMAQPAF APKNIYSIMQ ACWALEPTHR
       910        920        930        940        950        960
PTFQQICSFL QEQAQEDRRE RDYTNLPSSS RSGGSGSSSS ELEEESSSEH LTCCEQGDIA
       970
QPLLQPNNYQ FC
```

Figura 1B

Secuencia de aminoácidos para CSF-1R SEQ ID NO:2

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYR
CTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRP
LMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSISIRLKVQKVIPGPPALTLVPAE
LVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDVFLQHNNTKLAIPQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
YSCVASNVQGKHSTSMFFRVV

Secuencia de aminoácidos para CSF-1R (ENSP0000421174 49 aminoácidos) SEQ ID NO:3

MRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSISIRLKVQK

Secuencia de aminoácidos para CSF-1R SEQ ID NO: 4 (SNP V32G, A245S, H247P, V279M, posición subrayada)

IPVIEPSVPELV**V**KPGATVTLRCVGNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYR
CTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRP
LMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSISIRLKVQKVIPGPPALTLVPAE
LVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDVFLQHNNTKL**A**I**H**QQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
YSC**V**ASNVQGKHSTSMFFRVVESAYLNLSSEQNLIQEVTVGEGLNLKVMVEAYPGLQGFNWTYL
GPFSDHQPEPKLANATTKDTYRHTFTLSLPRLKPSEAGRYSFLARNPGGWRALTFELTLRYPPE
VSVIWTFINGSGTLLCAASGYPQPNVTWLQCSGHTDRCDEAQVLQVWDDPYPEVLSQEPFHKVT
VQSLLTVETLEHNQTYECRAHNSVGSGSWAFIPISAGAHTHPPDE

Figura 1C

Foma CSF-1R adecaudo para la expresión sobre una superficie celular SEQ ID NO:5

MGPGVLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNGSVEW DGPPSPHWTL YSDGSSSILS
TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY VKDPARPWNV LAQEVVVFED QDALLPCLLT DPVLEAGVSL
VRVRGRPLMR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL MGGRKVMSIS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA
ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDVFLQHN NTKLAIPQQS DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA
SNVQGKHSTS MFFRVVESAY LNLSSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSDHQPEPK
LANATTKDTY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWTF INGSGTLLCA
ASGYPQPNVT WLQCSGHTDR CDEAQVLQVW DDPYPEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN QTYECRAHNS
VGSGSWAFIP ISAGAHTHPP DE

Figura 2

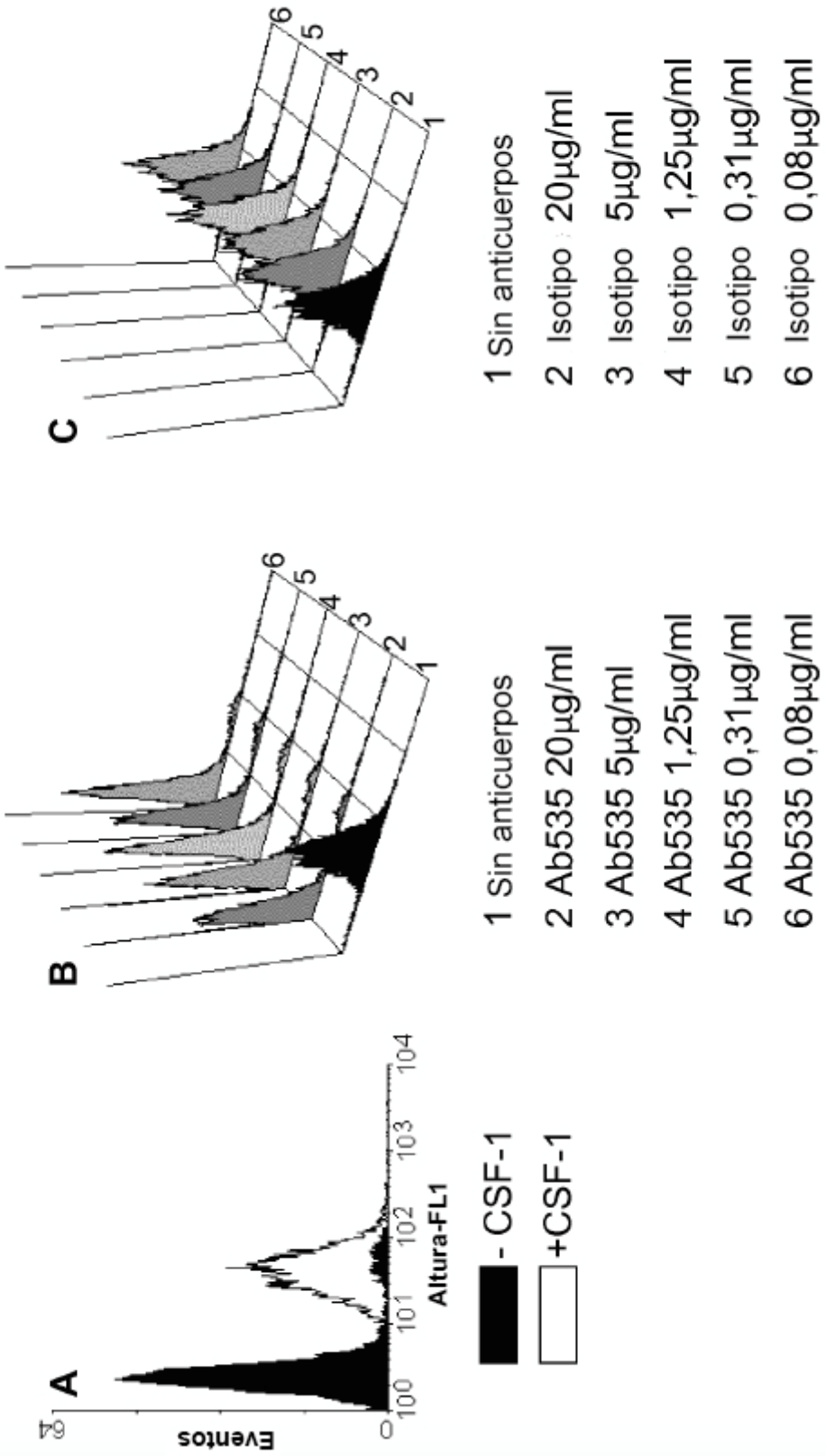

A
B
C
Eventos
64
0
100
101
102
103
104
Altura-FL1
- CSF-1
+CSF-1
1 Sin anticuerpos
2 Ab535 20µg/ml
3 Ab535 5µg/ml
4 Ab535 1,25µg/ml
5 Ab535 0,31µg/ml
6 Ab535 0,08µg/ml
1 Sin anticuerpos
2 Isotipo 20µg/ml
3 Isotipo 5µg/ml
4 Isotipo 1,25µg/ml
5 Isotipo 0,31µg/ml
6 Isotipo 0,08µg/ml

FIGURA 3

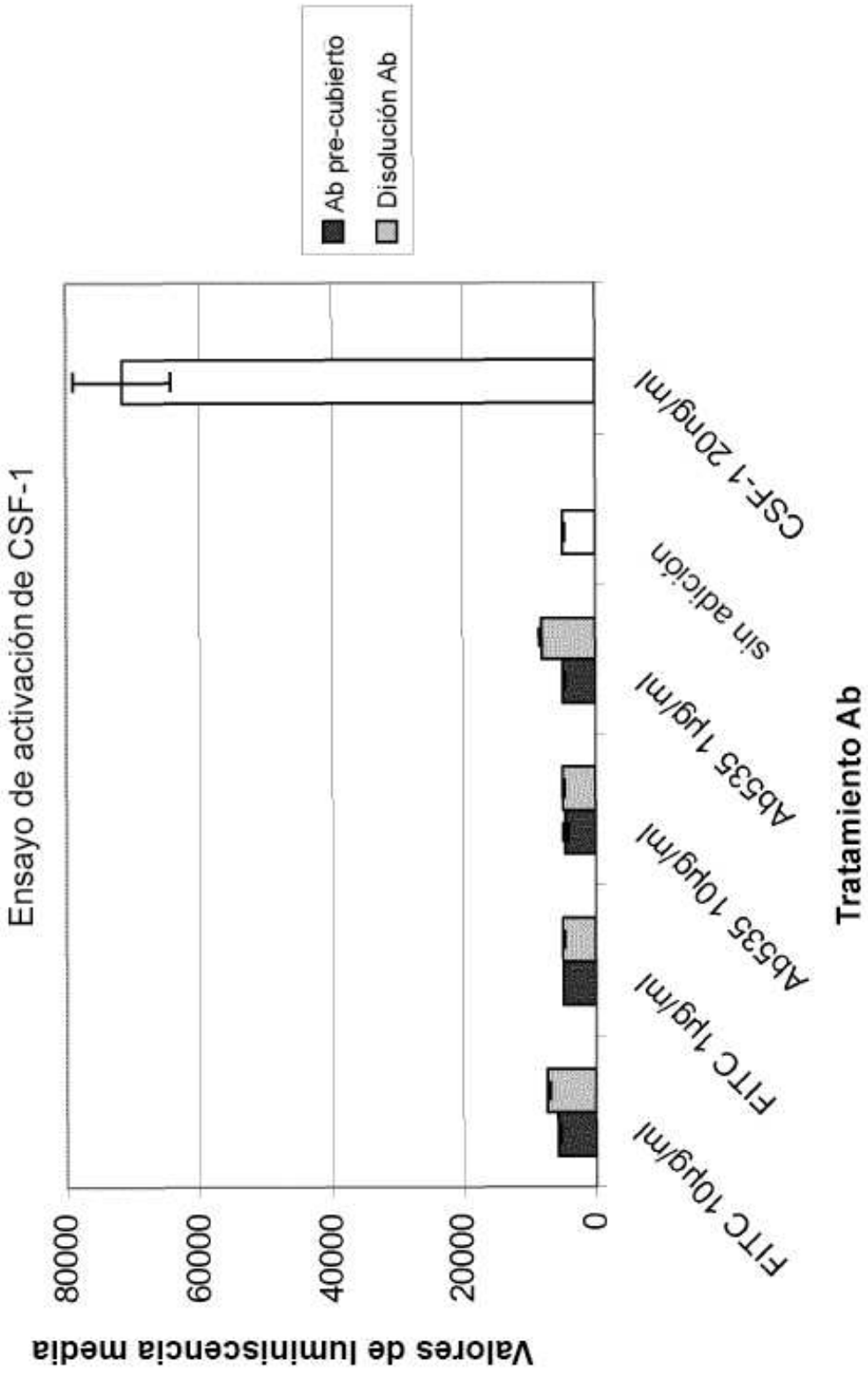

Ensayo de activación de CSF-1
Ab pre-cubierto
Disolución Ab
Valores de luminiscencia media
80000
60000
40000
20000
0
FITC 10µg/ml
FITC 1µg/ml
Ab535 10µg/ml
Ab535 1µg/ml
sin adición
CSF-1 20ng/ml
Tratamiento Ab

Figura 4a

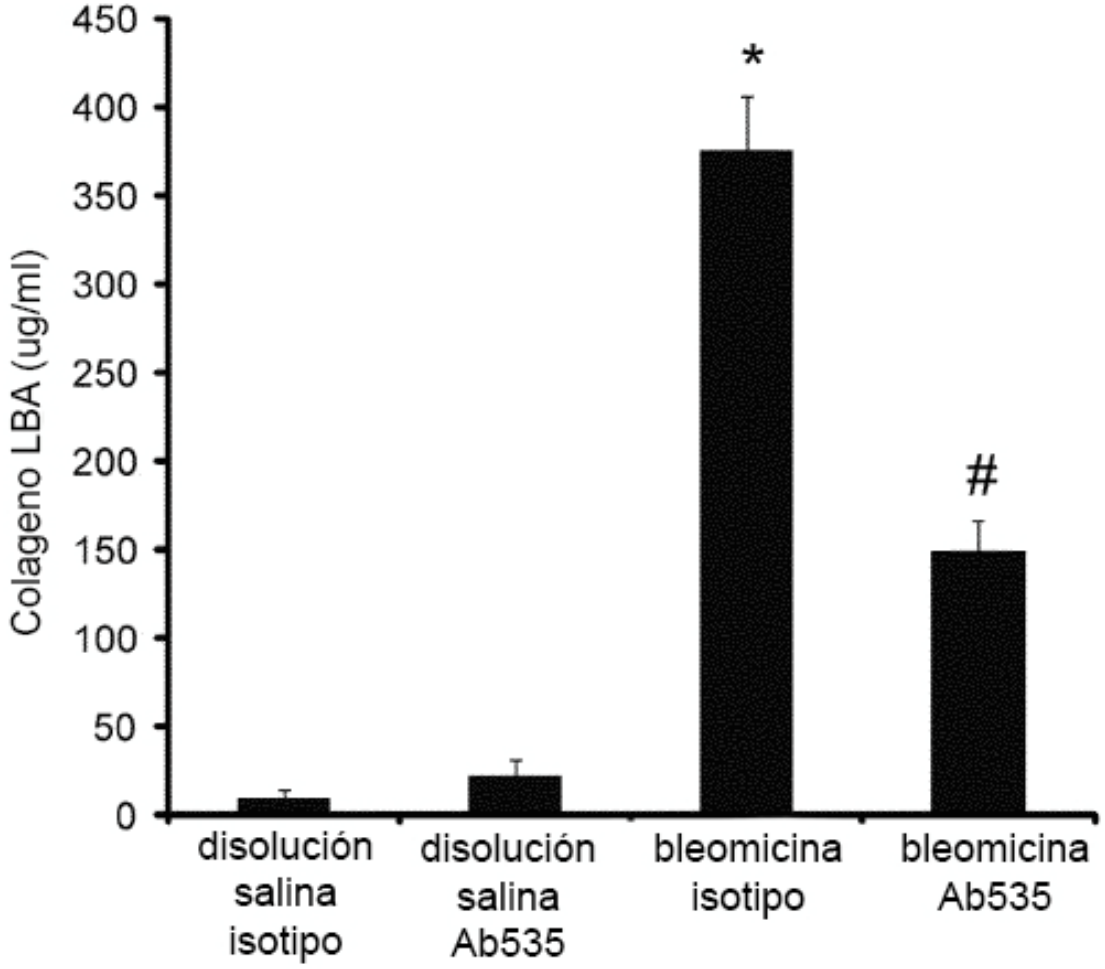

450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Colageno LBA (ug/ml)
*
#
disolución salina isotipo
disolución salina Ab535
bleomicina isotipo
bleomicina Ab535

Figura 4b

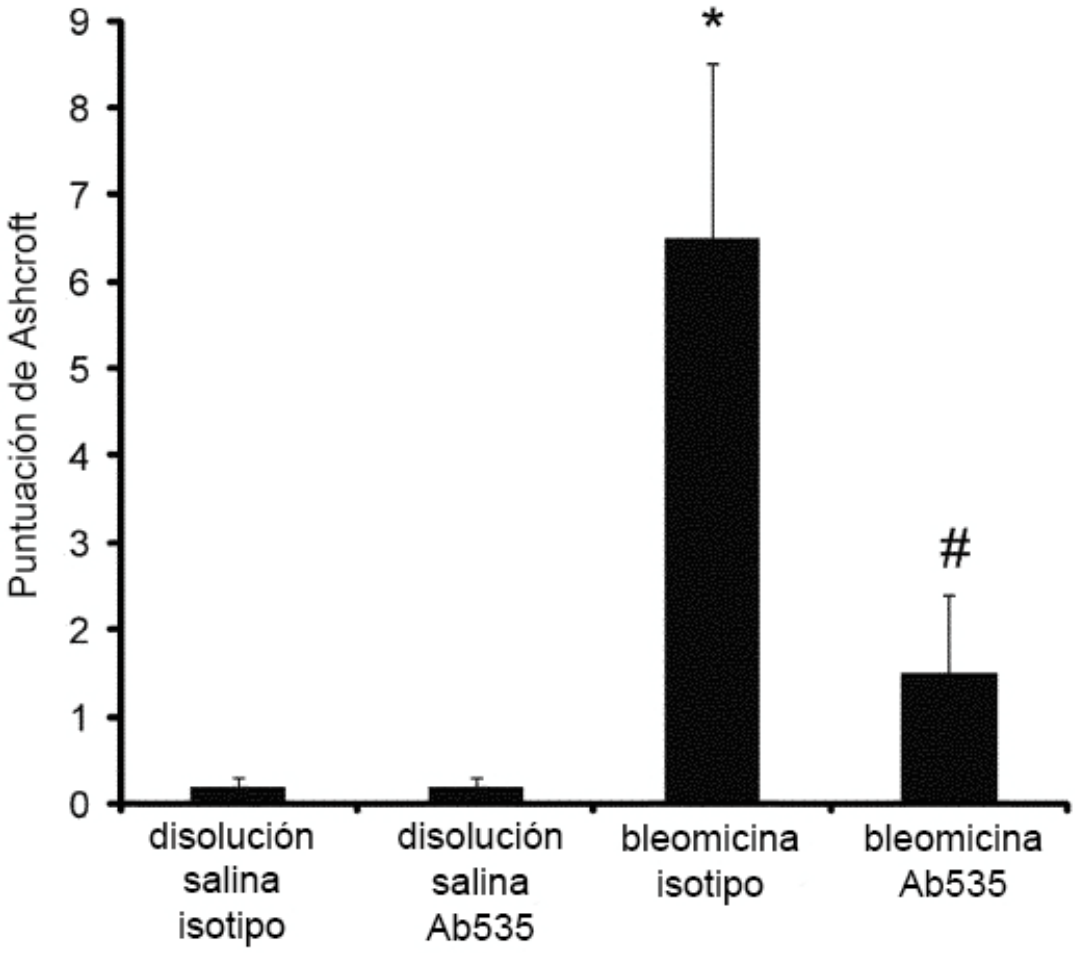

Puntuación de Ashcroft
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
#
disolución salina isotipo
disolución salina Ab535
bleomicina isotipo
bleomicina Ab535

Figura 4c

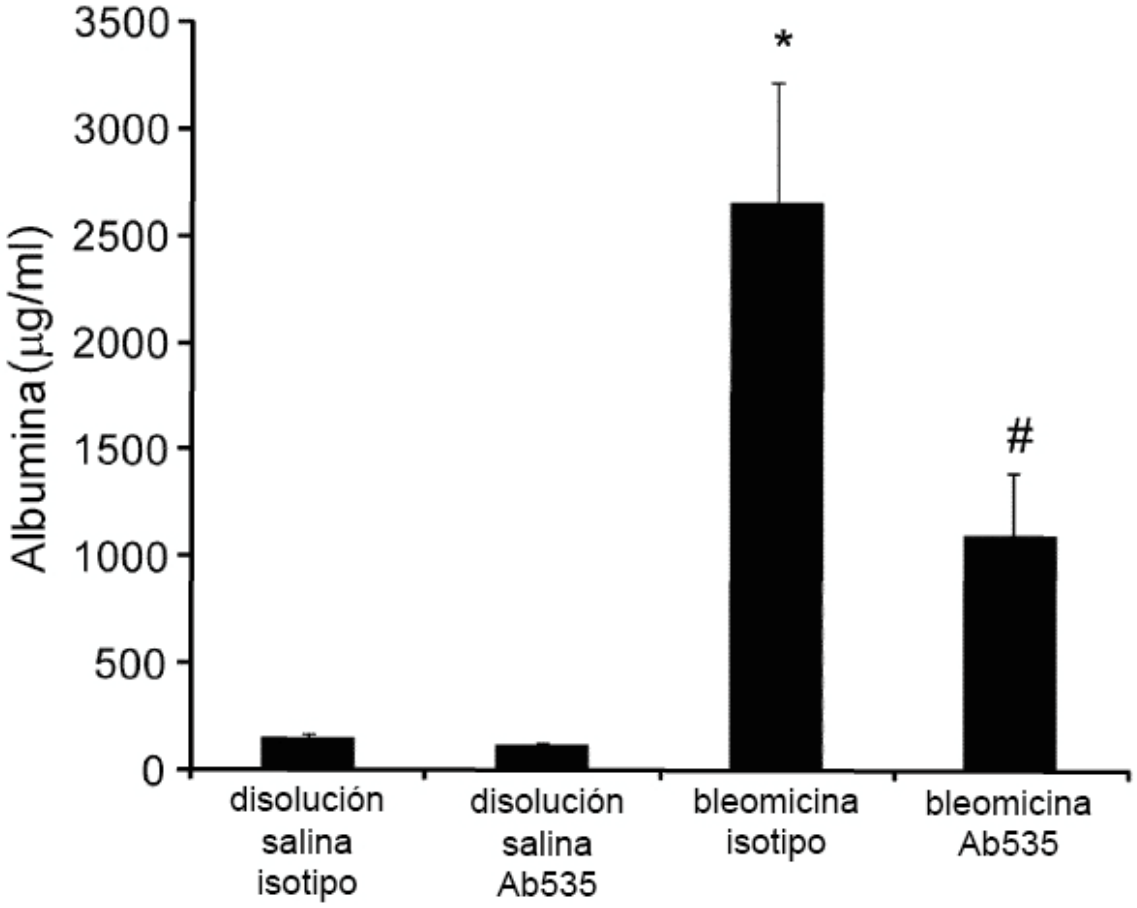

3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Albumina (µg/ml)
*
#
disolución salina isotipo
disolución salina Ab535
bleomicina isotipo
bleomicina Ab535

Figura 4d

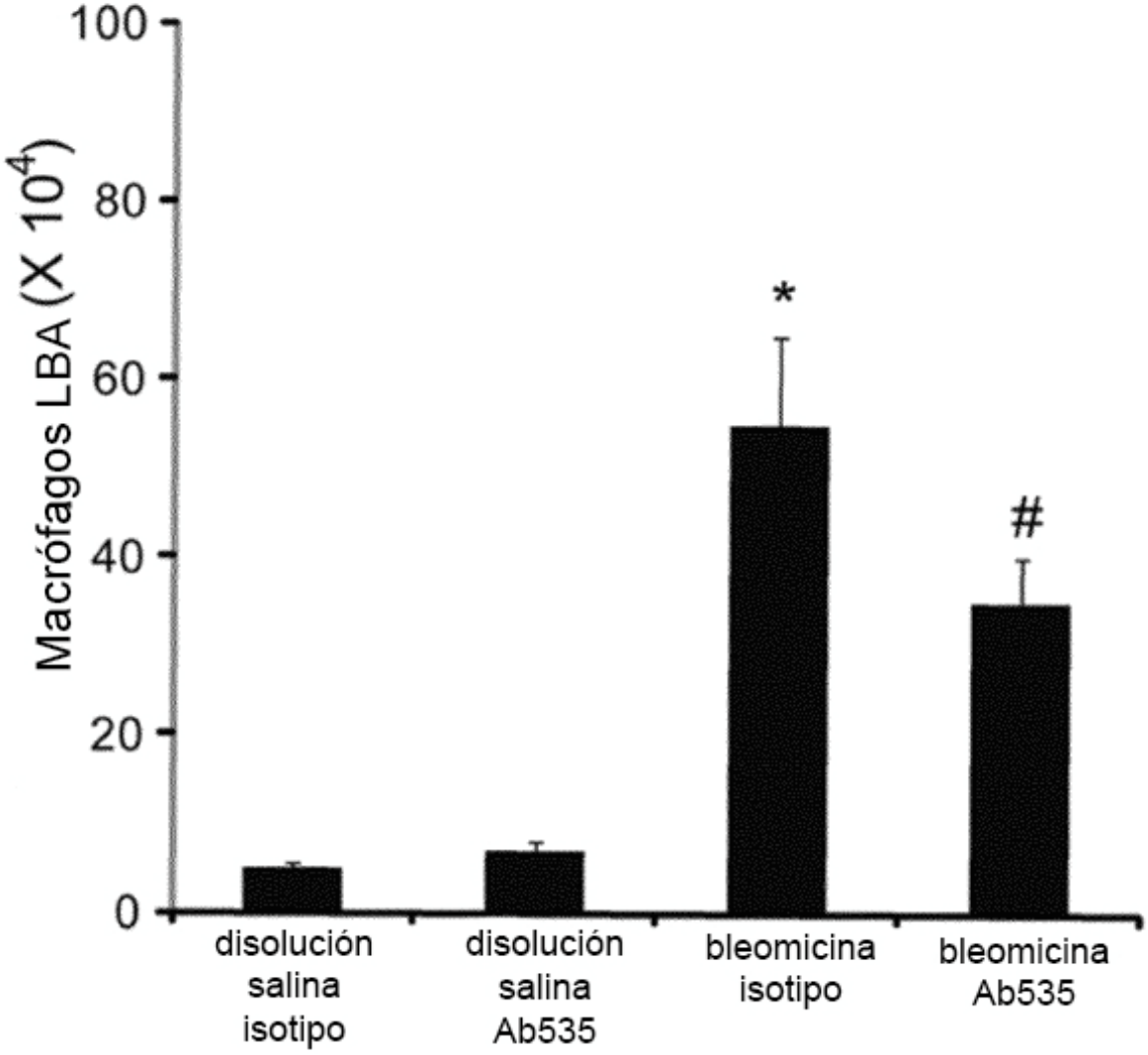

100
80
60
40
20
0
Macrófagos LBA (X 10^4)
*
#
disolución salina isotipo
disolución salina Ab535
bleomicina isotipo
bleomicina Ab535

Figura 5

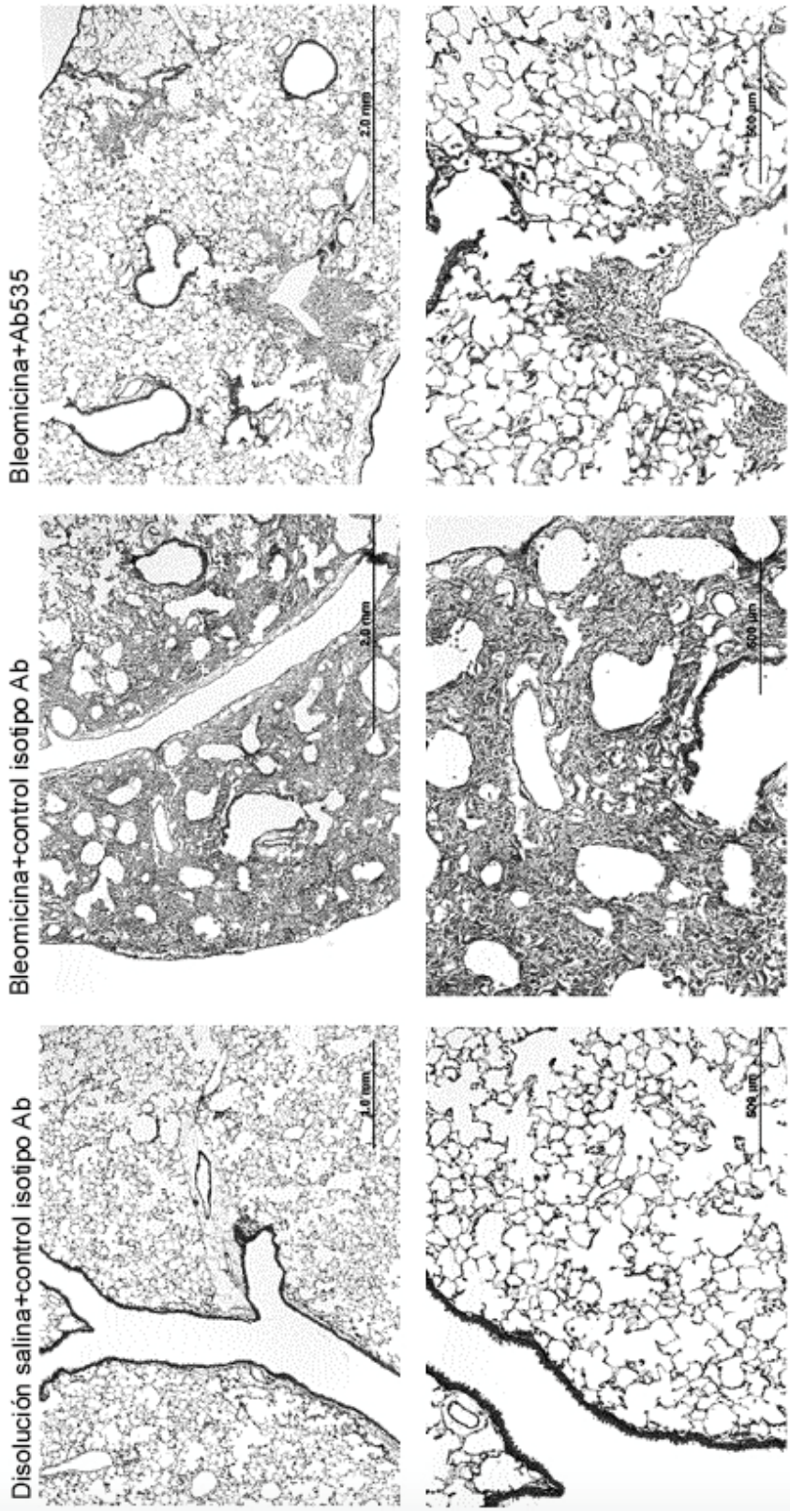

Disolución salina+control isotipo Ab
Bleomicina+control isotipo Ab
Bleomicina+Ab535
1,0 mm
2,0 mm
2,0 mm
500 µm
500 µm
500 µm

Figura 6a

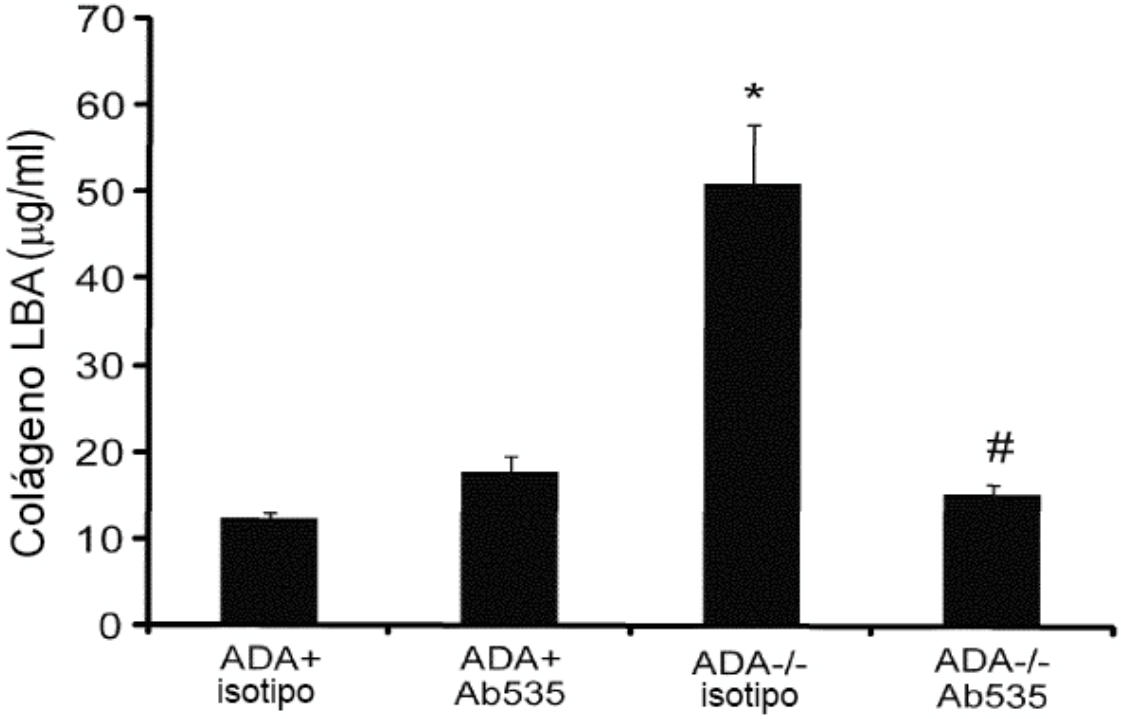

70
60
50
40
30
20
10
0
Colágeno LBA (µg/ml)
*
#
ADA+
isotipo
ADA+
Ab535
ADA-/-
isotipo
ADA-/-
Ab535

Figura 6b

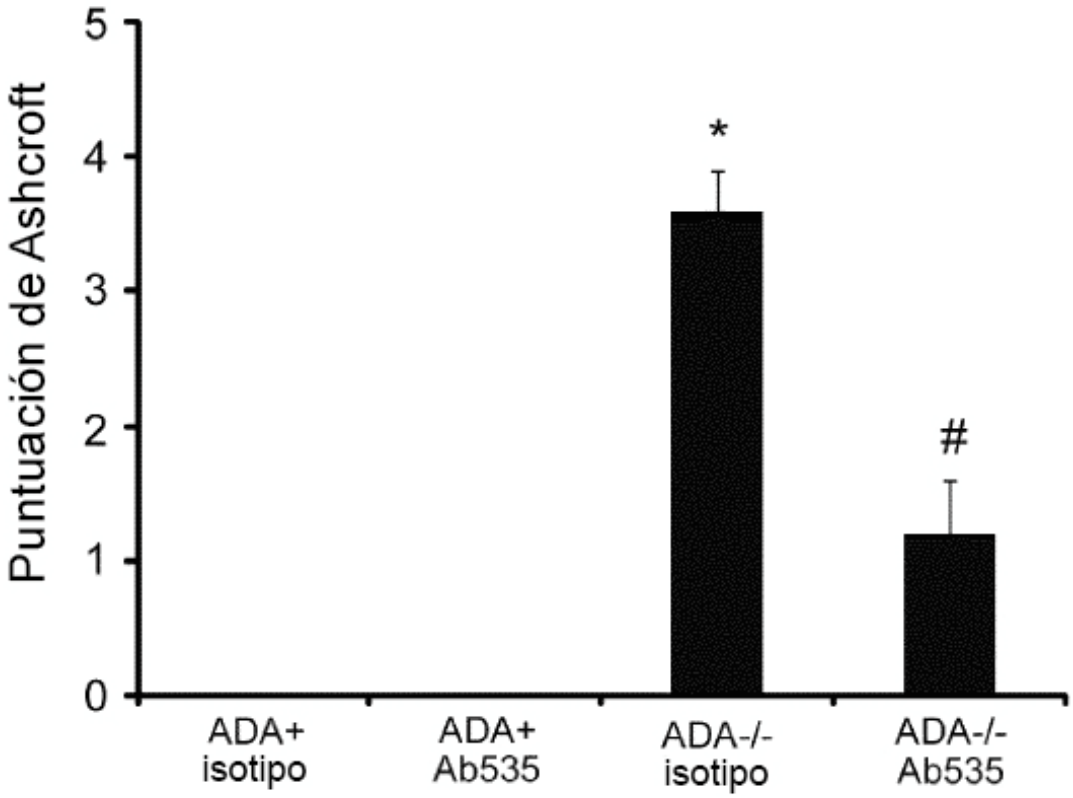

Puntuación de Ashcroft
5
4
3
2
1
0
*
#
ADA+ isotipo
ADA+ Ab535
ADA-/- isotipo
ADA-/- Ab535

Figura 6c

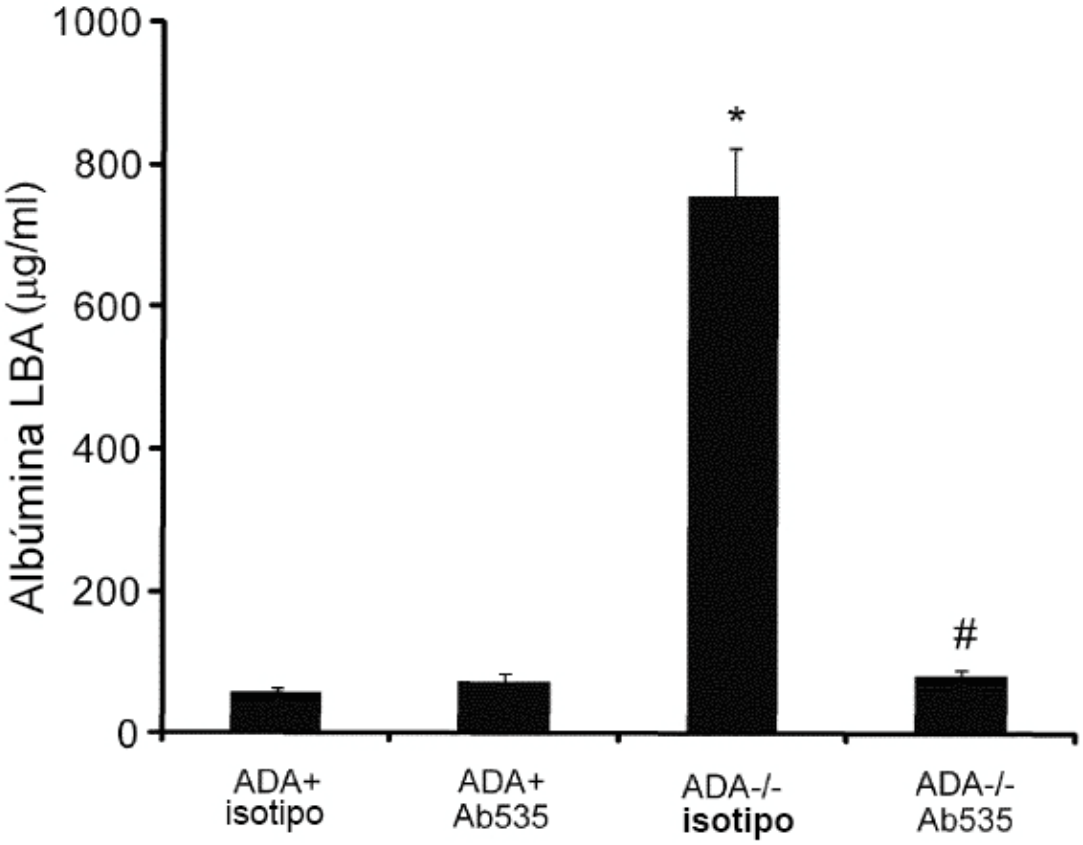
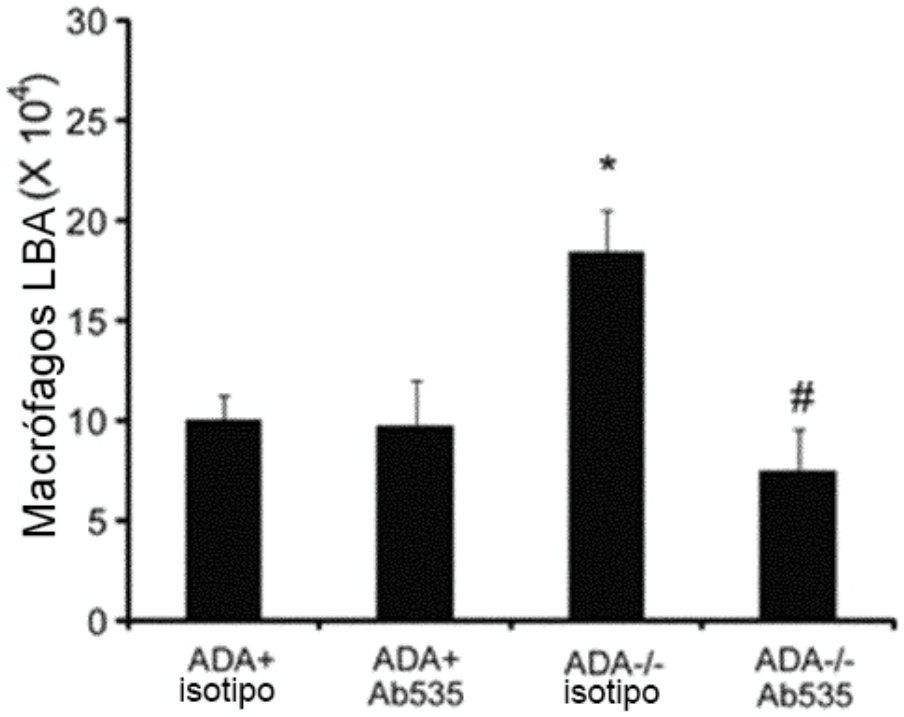

1000
800
600
400
200
0
Albúmina LBA (µg/ml)
*
#
ADA+
isotipo
ADA+
Ab535
ADA-/-
isotipo
ADA-/-
Ab535

Figura 6d:



* indica una diferencia significativa de ADA+ (tipo salvaje); # indica una diferencia significativa de ADA-/- en ratones tratados con anticuerpo control de isotipo ($p \leq 0,05$).

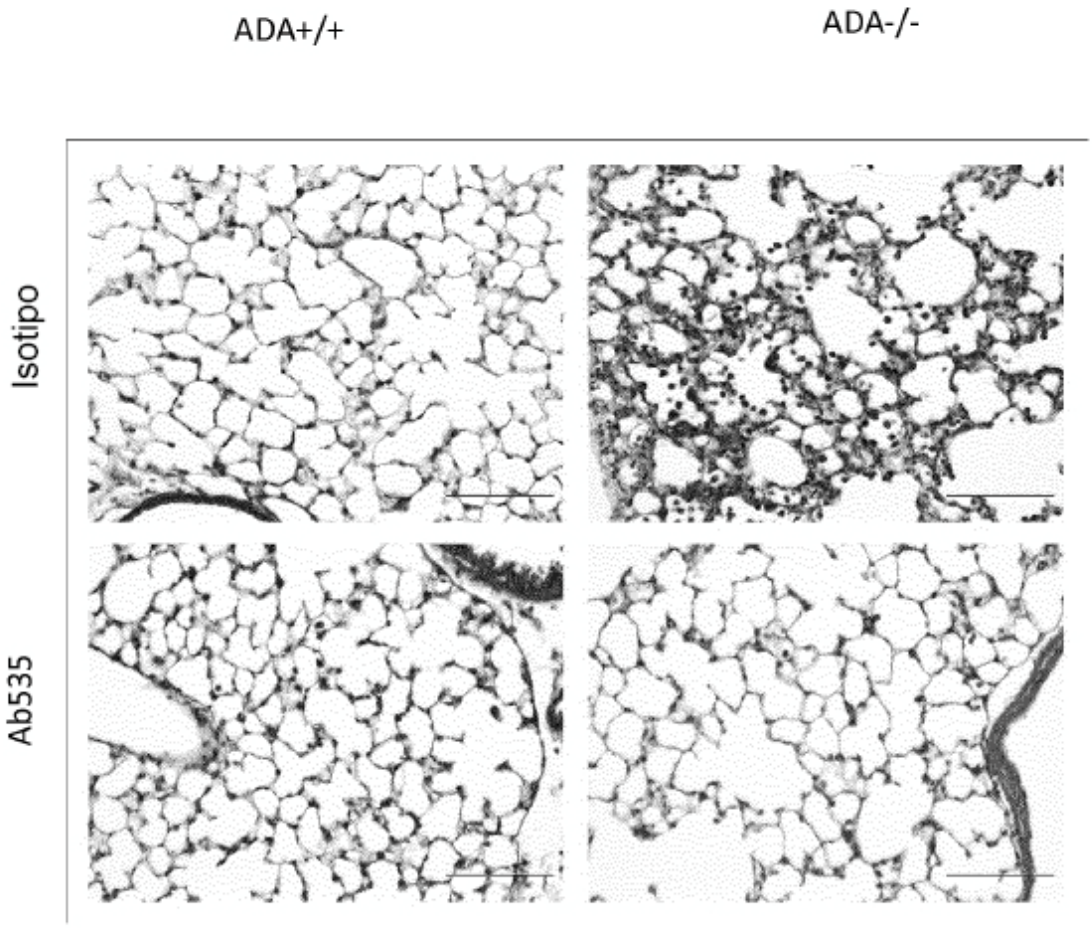



Figura 7