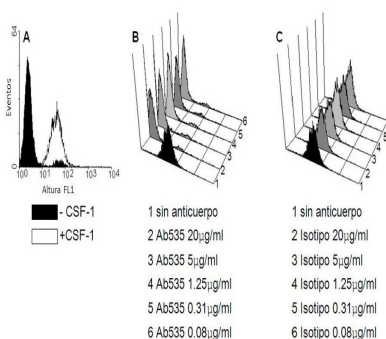


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

Figura 2



1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS			
2	Datos del Solicitante		
Nombre:		UCB BIOPHARMA SPRL	Dirección Electrónica:
			clientes@cavelier.com
Dirección:		60 Allée de la Recherche, B-1070 Brussels, Bélgica	Domicilio/País de constitución:
			BELGICA - BRUSSEL - BRUSELAS
Identificación:			
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT	
Número:		1021106-	
3	Solicitantes		

Apellidos - Nombres o Razón Social		Tipo	Identificación	
1.	UCB BIOPHARMA SPRL	EE	1021106	
4	Datos del Inventor			
Nombre:		Diane MARSHALL	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com
Dirección:		c/o IPD UCB Celltech 208 Bath Road Slough Berkshire SL1 3WE, Reino Unido de la Gran Bretaña	Domicilio/País de constitución:	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA - INGLATERRA - SLOUGH
Identificación:				
☐ CEDULA DE CIUDADANIA		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA		
☐ EMPRESA EXTRANJERA		☐ NIT		
☐ PASAPORTE		☒ No Aplica		
Número:		-		
5	Inventor(es)			
Apellidos - Nombres		Domicilio		
1.	MARSHALL Diane	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA		
6	Datos Inventor(es)			
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	INGLATERRA	SLOUGH	c/o IPD UCB Celltech 208 Bath Road Slough Berkshire SL1 3WE, Reino Unido de la Gran Bretaña
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			

Nombre:	JOSE ANDRES RINCON USCATEGUI		Dirección Electrónica:	cavelier@cavelier.com
Dirección:	CARRERA. 4 No. 72- 35		Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 79780910-				
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/EP2014/068047	Fecha Solicitud:	26/08/2014
Número Publicacion:		WO 2015/028454 A3	Fecha Publicacion:	05/03/2015
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	Codigo del país GB	(31) No. Solicitud 1315486.9	(32) Fecha 30/08/2013
10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:		35	Pago Reivindicaciones:	No
11	Reducción de tasas.			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas				

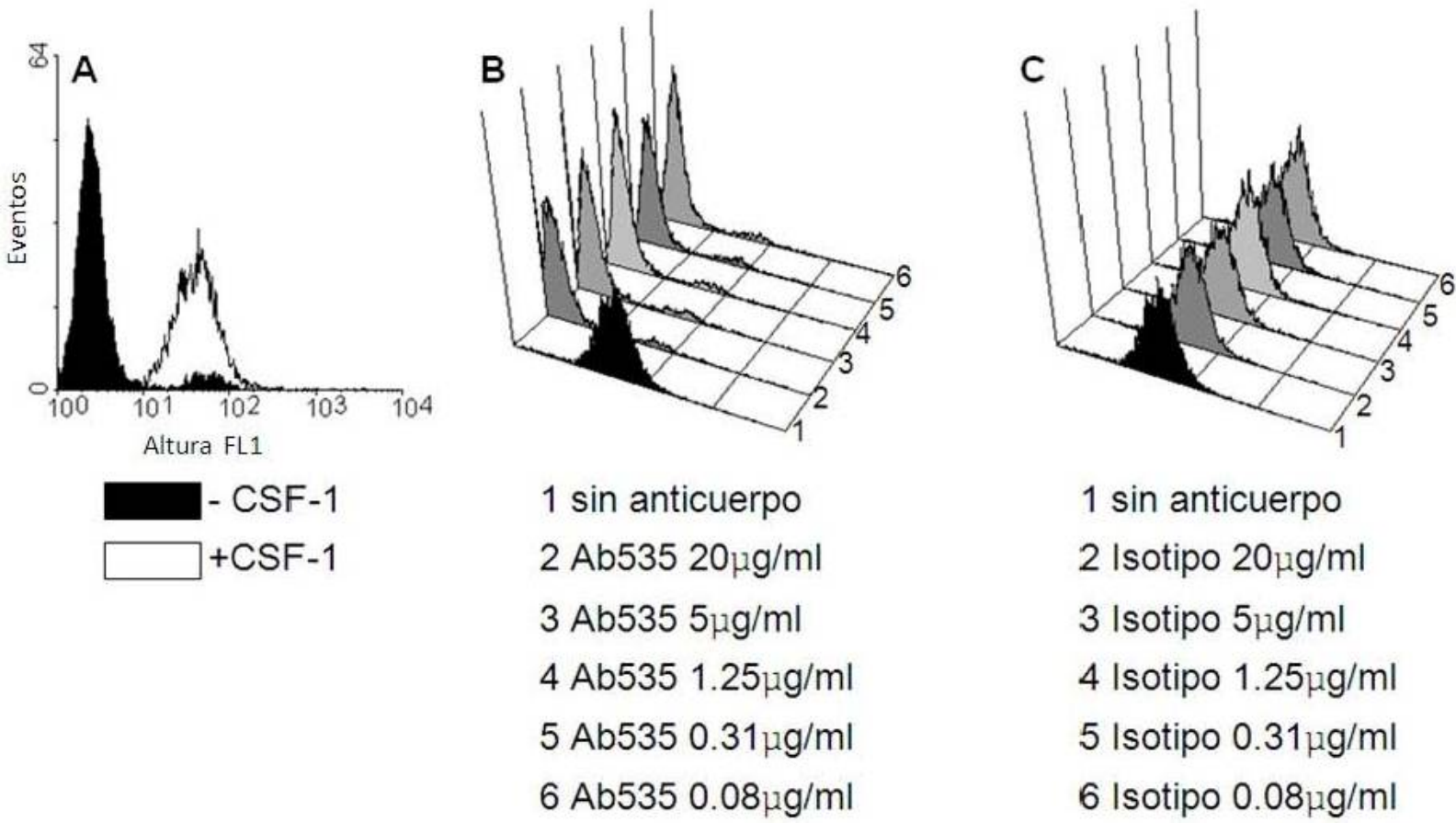
☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12	Documentos Anexos
-----------	--------------------------

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">☒ Reivindicaciones☒ Descripción☒ Dibujos y/o Figuras☒ Resumen☐ Certificado Depósito Material Biológico☐ Uso de Conocimiento tradicional☒ Listado de secuencias☒ Artes finales 12 x 12 cm☒ Poderes, si fuere el caso☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad☐ Otros Anexos |
|--|

Figura 2



MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS

La presente invención hace referencia general a métodos para tratar la fibrosis y, más específicamente, a un anticuerpo anti-CSF1-R para tratamiento de la fibrosis.

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, incluyendo las células endoteliales y los fibroblastos. El CSF-1 está compuesto por dos polipéptidos "monómero", que forman una proteína CSF-1 dimérica biológicamente activa. EL CSF-1 existe en al menos tres formas maduras debido al empalme alternativo de ARN, el procesamiento proteolítico de precursores de proteínas y las modificaciones post-traduccionales, incluyendo la glicosilación y la adición de proteoglicano (Véase Cerretti DP et al. 1988, Mol Immunol, 25(8),761; Pixley FJ and Stanley ER, 2004, Trends in Cell Biology, 14(11) 628-38; Douglass, TG et al, 2008, Int Immunopharmacol, 8, 1354-76). Las varias formas de la proteína CSF-1 incluyen dos moléculas secretadas, una que está glicosilada, y la otra está compuesta por una secuencia amino terminal más larga y modificación de proteoglicanos. Otra variante es una molécula transmembrana (TM) que está glicosilada pero que no tiene restos de proteoglicanos. Esta forma de membrana se puede verter por medio de escisión proteolítica para liberar una molécula soluble activa. Todas las formas se producen como polipéptidos precursores que tienen una secuencia señal de 32 aminoácidos en el extremo amino, una región transmembrana putativa de aproximadamente 23 aminoácidos cerca del extremo carboxilo y una cola citoplásmica corta de COOH-terminal. A continuación, los polipéptidos precursores son procesados mediante escisiones proteolíticas de amino-terminal y carboxilo-terminal para producir las formas maduras del CSF-1, en donde los residuos 1-149 son idénticos y constituyen el dominio de unión al receptor. *In vivo*, los monómeros de CSF-1 son glicosilados y dimerizados a través de enlace de disulfuro. El CSF-1 hace parte de 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 médula ósea del linaje fagocítico mononuclear. Adicionalmente, el CSF-1 estimula la supervivencia, la proliferación y el funcionamiento de los macrófagos a través de un receptor específico en células de respuesta.

El receptor de CSF-1 (CSF-1R) también se conoce como el producto del gen *c-fms* o CD115. El CSF-1R es una glicoproteína TM de 165kDa tipo 1 que hace parte de la familia receptor de tirosina quinasa tipo III. Adicionalmente al CSF-1, la molécula IL-34,

estructuralmente similar pero que no está relacionada, también ha demostrado ser un ligando para CSF-1R (Lin, *et al.* 2008, Science 320:807-811). La expresión del CSF-1R se limita principalmente a células del linaje de monocitos-macrófagos, ambos de los cuales constituyen poblaciones de tejido residentes y en circulación, incluyendo los osteoclastos. Adicionalmente,

5 se expresa en un número de células del sistema reproductivo femenino, incluyendo los oocitos, las células deciduales y los trofoblastos (Pollard JW and Stanley ER, 1996 Advances in Developmental Biochemistry 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 (la Expresión Temporal y la Localización del CSF-1 y su receptor en el tracto

10 reproductor femenino son coherentes con el desarrollo placentario regulado por CSF-1); Arceci, RJ et al, 1992, 151 (1), 1-8; Dev Biol; Regenstreif LJ and Rossant J, Dev Biol 1989 May; 133(1): 284-94 (Expresión del oncogén c-fms y de la citoquina, CSF-1 durante la embriogénesis del ratón), Pampfer S et al, Biol Reprod 1992, 46(1), 48-57 (Expresión del receptor de CSF-1 (producto del protooncogén c-fms) en el útero y placenta humanos; Jokhi PP et al, Lab Invest

15 1993, 68(3), 308-320 (Expresión del receptor de CSF-1 (producto del c-fms) mediante células en la interfaz de útero-placenta en humanos); Kauma SW et al, J Clin Endocrinol Metab 1991, 73(4), 746-751 (la expresión de CSF-1 y c-fms en tejido endometrial humano y placenta durante el ciclo menstrual y principios de embarazo), 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;

20 Weir EC et al, 1993, J Bone Miner Res, 8(12) 1507-18.

La unión del ligando CSF-1 al receptor de CSF-1 resulta en la fosforilación del receptor en uno o más residuos de tirosina mediante la acción de su dominio de tirosina quinasa. Esta fosforilación se puede detectar porque hay anticuerpos disponibles que se unen al receptor sólo después de la fosforilación (por ejemplo, el anticuerpo fosfo-M-CSF receptor (Tyr546) #3083 de

25 la Tecnología de Señalización Celular).

Los anticuerpos para CSF-1R son conocidos en el arte. Sherr, C.J. et al., Blood 73 (1989) 1786-1793 describen anticuerpos contra CSF-1 R que inhiben la actividad del CSF-1 (Sherr, C.J. et al., Blood 73 (1989) 1786-1793). WO09/026303 revela anticuerpos anti-CSF-1R que se unen al CSF-1R humano y modelos de tumores de ratón *in vivo* que utilizan un anticuerpo CSF-1R

30 anti-murino. WO11/123381 revela anticuerpos anti-CSF-1R que internalizan el CSF-1R y tienen actividad ADCC. WO11/123381 revela modelos de tumores de ratón *in vivo* que utilizan un

anticuerpo CSF-1R anti-murina. WO11/140249 revela anticuerpos anti-CSF-1R que bloquean la unión de CSF-1 a CSF-1R, sobre los que se afirma que son útiles en el tratamiento del cáncer. WO09/112245 revela un anticuerpo anti-CSF-1R IgG1 que inhibe la unión del CSF-1 al CSF1R y del que se dice es útil en el tratamiento del cáncer, la enfermedad inflamatoria intestinal y la
5 artritis reumatoide; WO11/131407 revela un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la unión del CSF-1 al CSF1-R y del que se dice es útil en el tratamiento de la pérdida de masa ósea y del cáncer; WO11/107553 revela un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la unión del CSF-1 al CSF1-R y del que se dice es útil en el tratamiento de la pérdida de masa ósea y del cáncer; WO11/070024 revela anticuerpos anti-CSF-1R que se unen al fragmento de CSF-1R humano
10 delD4.

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

El término 'enfermedad fibrótica' hace referencia a una respuesta de curación de una herida aberrante en la que se forma exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido. La
15 deposición y acumulación de componentes de matriz extracelular (MEC) en exceso tales como el colágeno y la fibronectina resultan en el endurecimiento y la cicatrización de los tejidos que finalmente pueden conducir a una falla de los órganos.

Las heridas resultan en una coagulación inmediata y en la respuesta de coagulación con el desarrollo de una matriz extracelular (MCE) provisional. La agregación de las plaquetas inicial y
20 la activación ayudan a promover una respuesta inflamatoria caracterizada por la vasodilatación y un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos, lo que permite el reclutamiento de una variedad de células inmunes, incluyendo neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y linfocitos en el sitio de la herida. Los neutrófilos y los macrófagos debridan la herida, reduciendo así el riesgo de infección y junto con los linfocitos activados secretan una variedad de factores de crecimiento y
25 citoquinas que sirven para amplificar aún más la respuesta inflamatoria. Las moléculas como TGF β , PDGF y IL-13 activan los macrófagos y conducen al reclutamiento, la proliferación y la activación de fibroblastos en el sitio de la herida. Los fibroblastos o miofibroblastos activados se caracterizan por la expresión de una actina de músculo liso, por secretar colágeno y otros componentes de MCE. Los fibroblastos activados contraen la red de colágeno, atrayendo los
30 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 está acoplado con la resolución de los componentes de la matriz, para completar la reparación de la herida.

Sin embargo, una agresión o lesión persistente del tejido, o una desregulación de la vía de reparación conduce a una respuesta inapropiada de la herida. Luego ocurre el exceso de deposición y el hiper entrecruzamiento del colágeno y luego ocurre la MEC, lo que resulta en una formación excesiva y en el endurecimiento del tejido cicatrizal en lugar de la arquitectura del tejido normal.

Algunos enfoques han demostrado que la gravedad de la enfermedad disminuye cuando los macrófagos se agotan en modelos de fibrosis pulmonar en ratón (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 ya sea mediante la administración de clodronato liposómico o el uso de un ratón transgénico receptor de la toxina de la difteria-CD11c, en donde las células de monocitos/macrófagos fueron extirpadas mediante la inyección de la molécula de toxina de la difteria. De forma similar, 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 la deposición de colágeno. El ratón *op/op* tiene una mutación en la secuencia de ADN del ligando del CSF-1 que resulta en la expresión de una proteína truncada, no funcional. Estos ratones manifiestan un fenotipo osteopetrótico y son deficientes en macrófagos. Cuando se utilizan en una bleomicina modelo de fibrosis pulmonar, la gravedad de la enfermedad se reduce considerablemente en comparación con ratones de salvajes (Baran et al, 2007, Am J Respir Crit Care Med, 176, 78-89).

El rol de los macrófagos se hace más complejo, ya que se puede clasificar 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 and Edwards JP, 2008, Nat Rev Immunol, 8, 958-) en 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).

Algunos ejemplos de enfermedades fibróticas incluyen la fibrosis pulmonar, como por ejemplo la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la silicosis, la fibrosis quística, la fibrosis renal, la

fibrosis hepática, la cirrosis hepática, la colangitis esclerosante primaria, la cirrosis biliar primaria, la fibrosis endomiocárdica, la fibrosis mediastínica, la mielofibrosis, la fibrosis retroperitoneal, la fibrosis masiva progresiva, la fibrosis nefrogénica sistémica, la enfermedad de Crohn, queloide, el infarto de miocardio, la esclerosis sistémica y la artrofibrosis.

5 Las causas de la enfermedad fibrótica pueden depender del órgano o tejido involucrado y no se conocen en algunas enfermedades, como la fibrosis pulmonar idiopática. La fibrosis hepática y, finalmente, la cirrosis, resulta del daño hepático crónico sostenido a través de la exposición a una variedad de factores, incluyendo factores ambientales y dietarios o agentes infecciosos. Las infecciones a largo plazo por hepatitis B o C pueden causar fibrosis hepática. El
10 sobreconsumo sostenido de alcohol o una dieta alta en grasas/azúcares también puede causar cirrosis hepática. Del mismo modo, la diabetes puede dañar los riñones y dejar cicatrices que conduzcan a la pérdida de función. En la fibrosis pulmonar familiar, los miembros de una familia son más susceptibles a la fibrosis, aunque el o los factores genéticos responsables se desconocen.

15 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 las lesiones repetitivas a las células del epitelio alveolar desempeñan un papel clave en la promoción del proceso fibrótico que resulta en las
20 características histopatológicas típicas de la FPI (Selman M, 2001, Ann Intern Med, 134(2): 136-51; Gross TJ and Hunninghake GW, 2001). Un número de factores de riesgo pueden causar la lesión de las células epiteliales, en particular por inhalación de toxinas y agentes. El fumar se ha identificado como uno de dichos factores probables, mientras que se ha reportado que la exposición al polvo de madera, polvo de metal, sílice u otros polvos minerales aumentan el
25 riesgo de desarrollar IPF (revisado en Borchers AT et al, 2011 Clin Rev Allerg Immunol, 40: 117-134); Maher TM, 2012, Clin Chest Med, 33: 69-83). La prognosis de pacientes con FPI es pobre, con un rango de supervivencia promedio de 2-5 años después del diagnóstico (Gribbin J, et al, 2006, Thorax, 61: 980-85; King TE Jr, 2001, Am J Respir Care Med, 166: 1171-81; Fernández Pérez ER et al, 2010, Chest, 137: 129-37; Lee HL et al, 2005, Chest, 127:2034-41).

30 El tratamiento de las enfermedades fibróticas usualmente incluye agentes antiinflamatorios e inmunosupresores, pero estos son poco beneficiosos 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 a la cicatrización de la herida y no una condición inflamatoria. La pirfenidona es un fármaco de molécula pequeña que fue aprobado para su uso en el tratamiento de la FPI en Japón en el 2008 y en Europa en el 2011, que probablemente funcione a través de múltiples mecanismos de acción que no se entienden del todo pero que pueden funcionar parcialmente por medio de una baja regulación de TGF- β . A la fecha, ninguna terapia ha sido aprobada para indicaciones fibróticas.

Por consiguiente, actualmente existe una necesidad médica no satisfecha de mejorar el tratamiento de la enfermedad fibrótica. Por ejemplo, para la FPI hay una tasa del 50% de supervivencia a 3 años y una tasa de solo 20% a 5 años, y en aproximadamente 20% de los casos se requiere trasplante.

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

Resumen de la invención

Sorprendentemente, hemos podido demostrar que los inhibidores de la actividad del 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 del CSF-1R está activo en modelos *in vivo* de fibrosis pulmonar en animales.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un inhibidor de la actividad del CSF-1R, para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica. La invención también proporciona el uso de un inhibidor de la actividad del CSF-1R para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica. La invención también proporciona un método para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la actividad del CSF-1R.

En la presente solicitud, el término “enfermedad fibrótica” incluye enfermedades que se caracterizan por una respuesta anormal a la cicatrización de una herida, en donde se forma tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido. Las enfermedades fibróticas ilustrativas incluyen mas no se limitan a la fibrosis pulmonar, como la fibrosis pulmonar idiopática, la silicosis y fibrosis quística; la fibrosis renal, que incluye la atrofia tubular y la fibrosis intersticial, la fibrosis hepática y la cirrosis hepática, la colangitis esclerosante primaria, la cirrosis biliar primaria, la

fibrosis endomiocárdica, la fibrosis mediastínica, la mielofibrosis, la fibrosis retroperitoneal, la fibrosis masiva progresiva, la fibrosis sistémica nefrogénica, la enfermedad de Crohn, queloide, el infarto de miocardio, la esclerodermia, la esclerosis sistémica y la artrofibrosis.

El término ‘actividad del CSF-1R’ utilizado en la presente hace referencia al espectro de actividad conocido en el arte para el CSF-1R, particularmente la actividad de CSF-1R humano y sus isoformas, por ejemplo 1, 2, 3 o todas las isoformas. Por ejemplo, la unión del ligando al receptor induce la fosforilación del CSF-1R en residuos de tirosina específicos (Bourette RP and Rohrschneider LR, 2000, *Growth Factors* 17: 155-166) y la cascada de acontecimientos de transducción de señales resultantes pueden mediar la migración de células, la supervivencia, la diferenciación y la proliferación (Suzu S et al, 1997, *J Immunol*, 159, 1860-7; Yeung Y-G and Stanley ER, 2003, *Mol Cell Proteomics*, 2, 1143-55; Yu W et al 2008, *J Leukoc Biol* 84(3), 852-63). La expresión en las células transfectadas de moléculas de receptores de CSF1-R mutante que comprenden residuos de fenilalanina en lugar de los residuos de tirosina seleccionados revelaron la asociación de residuos 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 usan anticuerpos anti-fosfotirosina junto con anticuerpos específicos de moléculas han identificado un número de las moléculas intracelulares implicadas en la mediación de estas funciones de la célula después de la estimulación de los ligandos del receptor (Yeung Y-G *et al*, 1998, *J Biol Chem.* 13, 273(46): 17128-37; Husson H *et al*, 1997, *Oncogene* 15, 14(19): 2331-8.

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

Un inhibidor de la actividad del CSF-1R de acuerdo con la presente invención es un agente que interfiere, por ejemplo reduciendo/inhibiendo o bloqueando la actividad del CSF-1R, particularmente la actividad del CSF-1R en la enfermedad fibrótica. De manera particular se prefieren los agentes que interfieren con la actividad del CSF-1R en FPI. Los inhibidores de acuerdo con la presente invención pueden inhibir, parcial o completamente, la actividad del CSF-1R. Los inhibidores usados en la presente invención incluyen mas no se limitan a inhibidores capaces de interactuar con (p. Ej. uniéndose a o reconociendo) IL-34, CSF-1 o el receptor de CSF-1 (CSF-1R) o una molécula de ácido nucleico que codifica IL-34, CSF-1 o CSF-1R, o que son capaces de inhibir la expresión del IL-34, CSF-1 o CSF-1 R o son capaces de inhibir la interacción entre CSF-1R and CSF-1 y/o IL-34. Dichos inhibidores pueden ser, mas no se limitan

a anticuerpos, ácidos nucleicos (p. Ej. ADN, ARN, ARN antisentido y ARNip), carbohidratos, lípidos, proteínas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y otros fármacos. En una realización, el inhibidor bloquea la unión del CSF-1 al receptor del CSF-1R.

Ejemplos de inhibidores adecuados incluyen, mas no se limitan a un fragmento funcional
 5 sintético del receptor del CSF-1 que se une al CSF-1 e interfiere con la unión al receptor del CSF-1 nativo, un fragmento funcional sintético del CSF-1 que se une al receptor del CSF-1 e interfiere con la unión al receptor del CSF-1 nativo, un fragmento funcional sintético de IL-34 que se une al receptor del CSF-1 e interfiere con el receptor del CSF-1 nativo, un anticuerpo que se une al CSF-1 o IL-34 al receptor del CSF-1 e interfiere con la interacción receptor del CSF-1
 10 y el ligando, una molécula de ácido nucleico antisentido que se hibrida específicamente al ARNm que codifica el CSF-1, IL-34 o el receptor del CSF-1 o una molécula pequeña u otro fármaco que inhibe la actividad del IL-34, CSF-1 o CSF-1R.

Los inhibidores de la actividad del receptor del CSF-1 se conocen en el arte como métodos para identificar y producir dichos inhibidores. Los anticuerpos anti-CSF-1
 15 neutralizadores han sido descritos, por ejemplo, por Weir *et al.*, 1996, J Bone Miner. Res. 11, 1474-1481 y Haran-Ghera *et al.*, 1997, Blood, 89, 2537-2545, quien también describe anticuerpos anti-CSF-1R. También se han descrito antagonistas antisentido de CSF-1 (EP1223980).

Los agentes que pueden ser inhibidores adecuados pueden ser seleccionados de una gran variedad de agentes candidatos. Ejemplos de agentes candidatos incluyen mas no se limitan a
 20 ácidos nucleicos (p. Ej. ADN y ARN), carbohidratos, lípidos, proteínas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y otros fármacos. Los agentes se pueden obtener usando cualquiera de las varias técnicas en los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en el arte, incluyendo: bibliotecas biológicas; librerías de fase sólida paralela o en fase de solución espacialmente direccionables; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución; el
 25 método de biblioteca de “una perla un compuesto (one-bead one-compound)” y métodos de librería sintética que usan selección por cromatografía de afinidad. El método de librería biológica es adecuado para bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro métodos son aplicables a las librerías de compuestos de péptidos, oligómeros, no péptidos o moléculas pequeñas (Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12:145; U.S. 5,738,996; y U.S. 5,807,683).

30 Ejemplos de métodos adecuados con base en la presente descripción para la síntesis de librerías moleculares se pueden encontrar en el arte, como por ejemplo en: DeWitt *et al.*, 1993,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909; Erb et al, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422; Zuckermann *et al*, 1994, J. Med. Chem. 37:2678; Cho et al, 1993, Science 261:1303; Carrell et al, 1994, Angew. Chem. hit. Ed. Engl. 33:2059; Carell et al, 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; y Gallop et al, 1994, J. Med. Chem. 37:1233.

5 Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse, por ejemplo, en solución (p. Ej. Houghten, 1992, Bio/Techniques 13:412-421), o en perlas (Lam, 1991, Nature 354:82-84), pastillas (Fodor, 1993, Nature 364:555-556), bacterias (US 5,223,409), esporas (US 5,571,698; 5,403,484; y 5,223,409), plásmidos (Cull *et al*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865- 1869) o fagos (Scott and Smith, 1990, Science 249:386-390; Devlin, 1990, Science 249:404-406; 10 Cwirla *et al*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378; y Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222:301-310).

En un ejemplo, el inhibidor para uso en la presente invención puede ser un ácido nucleico. Particularmente, las moléculas de ácido nucleico CSF-1, IL-34 o CSF-1R pueden ser usadas como moléculas antisentido para alterar la expresión de sus respectivos polipéptidos por 15 unión a ácidos nucleicos complementarios. Los ácidos nucleicos CSF-1, IL-34 o CSF-1R se pueden obtener usando técnicas de clonación convencionales a partir de, por ejemplo, ADN genómico o ADNc o se pueden sintetizar usando técnicas bien conocidas y disponibles en el mercado. Los ácidos nucleicos CSF-1, IL-34 o CSF-1R pueden contener una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos, en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico 20 CSF-1, IL-34 o CSF- 1 R. Las técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica se pueden usar para introducir mutaciones, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por PCR. Un ácido nucleico antisentido de acuerdo con la presente invención incluye un ácido nucleico CSF-1, IL-34 o CSF-1 R capaz de hibridarse en virtud de alguna complementariedad de secuencia a una porción de un ARN (preferiblemente ARNm) que 25 codifica el polipéptido respectivo. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una región codificadora y/o no codificadora de una ARNm que codifica dicho polipéptido. Más preferiblemente, los ácidos nucleicos antisentido resultan en la inhibición de la expresión del polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R. De esta manera, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica que comprende administrar 30 una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la actividad del CSF-1R en donde el inhibidor comprende al menos ocho nucleótidos (por ejemplo 15 a 22 nucleótidos, como por

ejemplo 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos) que son antisentido para un gen o ADNc que codifica un polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R. La invención también proporciona el uso de ácidos nucleicos que comprenden al menos ocho nucleótidos (por ejemplo 15 a 22 nucleótidos, como por ejemplo 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos) que son antisentido para un gen o

5 ADNc que codifica un polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica.

En una realización, el inhibidor para el uso en el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica es un anticuerpo que inhibe la actividad del CSF-1R. Por consiguiente, se proporciona el uso de un anticuerpo que inhibe la actividad del CSF-1R para la fabricación de un

10 medicamento para el uso en el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica. También se proporciona un método de tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que inhibe la actividad de CSF-1R.

En una realización, el inhibidor para uso en el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad

15 fibrótica es un anticuerpo que interactúa con (es decir, se une a o reconoce) el CSF-1 o IL-34.

En un ejemplo los anticuerpos interactúan selectivamente con el CSF-1 o IL-34. Interactuar selectivamente con (*p. Ej.* reconocer o unirse a) significa que los anticuerpos tienen una mayor afinidad por los polipéptidos CSF-1 o IL-34 que por otros polipéptidos. Ejemplos de anticuerpos adecuados son los que inhiben la actividad del CSF-1 o IL-34 al unirse al CSF-1 o IL-34 de tal

20 manera que impiden que sea biológicamente activo, por ejemplo mediante la prevención de la unión de CSF-1 o IL-34 a su receptor. Por consiguiente, por medio de la presente invención se proporciona el uso de un anticuerpo anti-CSF-1 o un anticuerpo anti-IL-34 para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica.

Más preferiblemente, un inhibidor para uso en el tratamiento y/o profilaxis de la

25 enfermedad fibrótica es un anticuerpo que interactúa con (es decir, se une a o reconoce) el CSF-1R e inhibe la actividad del CSF-1R. En un ejemplo, los anticuerpos interactúan selectivamente con el CSF-1R. Interactuar selectivamente con (*p. Ej.* reconocer o unirse a) significa que los anticuerpos tienen una mayor afinidad por el polipéptido CSF-1R que por los otros polipéptidos. Los ejemplos de los anticuerpos adecuados son los que inhiben la actividad del CSF-1R al unirse

30 al CSF-1R de tal manera que le impida ser biológicamente activo.

En una realización, el anticuerpo reconoce las isoformas del CSF-14, por ejemplo CSF-1R humano y sus isoformas.

En una realización, el anticuerpo anti-CSF-1R es capaz de bloquear la unión del ligando al CSF-1R. El bloqueo, tal y como se usa aquí, se refiere a bloquear físicamente, como por ejemplo ocluir el receptor, pero también incluye cuando el anticuerpo o los fragmentos se unen a un epítipo que provoca, por ejemplo, un cambio conformacional, lo cual significa que el ligando natural al receptor ya no se une. Los ejemplos presentes en este documento describen ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo de bloquear el CSF-1R, véase el Ejemplo 2. BIAcore es un ejemplo de un ensayo usado para medir la cinética de unión, los ensayos ELISA o los ensayos basados en células que utilizan monocitos o las células THP-1 también pueden resultar útiles. El CSF-1 y el IL-34 son ligandos para el CSF-1R y el anticuerpo anti-CSF-1R puede bloquear la unión del CSF-1 o IL-34 al CSF-1R pero preferiblemente bloquea la unión tanto del CSF-1 como del IL-34 al CSF-1R. El anticuerpo anti-CSF-1R preferiblemente tampoco causa la activación del CSF-1R o la internalización del CSF-1R. Los ensayos adecuados para determinar la habilidad de un anticuerpo de causar la activación del CSF-1R o la internalización CSF-1R se describen en los Ejemplos, véase Ejemplo 2, que describe un ensayo que mide la proliferación dependiente del CSF-1.

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

Los polipéptidos CSF-1, IL-34 o CSF-1R o las células que expresan dichos polipéptidos pueden ser usados para producir anticuerpos que reconocen específicamente a dichos polipéptidos. Los polipéptidos CSF-1, IL-34 y CSF-1-R pueden ser polipéptidos ‘maduros’ o fragmentos biológicamente activos o derivados de los mismos. Preferiblemente, el polipéptido CSF-1 contiene aminoácidos 1-149 que se consideran importantes para la actividad biológica.

El CSF-1R, tal y como se usa aquí, se refiere a la proteína llamada CSF-1R, sus isoformas y los fragmentos biológicamente activos del mismo. En una realización, el CSF-1R es una proteína humana o una isoforma de la misma.

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

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

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

Los polipéptidos CSF-1 y CSF-1 R pueden ser preparados mediante procesos bien
10 conocidos en la técnica a partir de células huésped manipuladas genéticamente que comprenden sistemas de expresión o se pueden recuperar 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 en la superficie celular. El fragmento de aminoácido se puede fusionar a un anclaje GPI para facilitar dicha expresión. Luego, las células
15 se pueden usar para inmunizar los huéspedes.

En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos términos se usan de manera intercambiable a menos que se especifique lo contrario. En algunos casos, los polipéptidos CSF-1 o CSF-1R pueden ser parte de una proteína mayor, tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionado a un marcador de afinidad.

Los anticuerpos generados contra estos polipéptidos se pueden obtener administrando los
20 polipéptidos o células que expresan los mismo a un animal, preferiblemente a un animal no humano, usando protocolos reconocidos y de rutina; véase, por ejemplo, Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986. Muchos animales de sangre caliente pueden ser inmunizados, tales como
25 conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas o cerdos. Sin embargo, generalmente se prefieren los ratones, conejos, cerdos y ratas.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica, como por ejemplo la técnica del hibridoma (Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozboret *al.*, 1983,
30 Immunology Today, 4:72) y la técnica de hibridoma de EBV (Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, p77-96, Alan R Liss, Inc. 1985).

Los anticuerpos para uso en la invención también se pueden generar usando métodos de un solo anticuerpo de linfocitos, mediante la clonación y expresión de ADNc de la región variable de inmunoglobulina a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos por medio de, 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.

Tal y como se emplea específicamente en la presente, se refiere a un anticuerpo que solo reconoce el antígeno al cual es específico, o un anticuerpo que tiene afinidad de unión al antígeno significativamente mayor al que es específico, comparado a la unión a antígenos a los cuales es no específico, por ejemplo una afinidad de unión al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces superior.

Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina manipulados genéticamente de tal manera que los genes de la cadena ligera y pesada están compuestos de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Es probable que estos anticuerpos quiméricos sean menos antigénicos. Los anticuerpos bivalentes pueden hacerse por medio de 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 uso en la presente invención es humanizado. Tal y como se usa en la presente, 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 CDR (incluyendo, si así se desea, uno o más CDR modificados) a partir de un anticuerpo donante (p. Ej. un anticuerpo monoclonal murino) injertado en una estructura región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (p. Ej. un anticuerpo humano) (véase, *p. Ej.* US 5,585,089; WO91/09967). Para revisión, véase Vaughan *et al*, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998.

En una realización, en vez de transferir toda la CDR, solo uno o más de los residuos determinantes de la especificidad de una cualquiera de las CDR descritas anteriormente en este documento se transfieren a la estructura del anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34). En una realización, solo los residuos determinantes de la

especificidad de una o más de las CDR descritas anteriormente se transfieren a la estructura del anticuerpo humano. En otra realización, solo los residuos determinantes de la especificidad de cada una de las CDR descritas anteriormente se transfieren a la estructura del anticuerpo humano.

5 En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las regiones estructurales no necesitan tener exactamente la misma secuencia que el anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los residuos inusuales se pueden cambiar a residuos que se producen con más frecuencia para esa clase o tipo de cadena aceptante. De manera alternativa, se pueden cambiar los residuos seleccionados en las regiones estructurales del aceptor de modo que correspondan al residuo
10 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. Un protocolo para seleccionar los residuos en las regiones estructurales del aceptor que puede que sea necesario cambiarlo se establece en WO91/09967.

 Cuando las CDR o los residuos determinantes de la especificidad se injertan, cualquier
15 secuencia adecuada del marco de zona variable de aceptor que esté relacionada con la clase/tipo del anticuerpo donante del que se derivan las CDR, incluyendo regiones estructurales de ratones, primates y humanos.

 Convenientemente, el anticuerpo humanizado tiene un dominio variable que comprende las regiones estructurales del aceptor humano, así como una o más CDR. Así, en una realización
20 se proporciona un anticuerpo humanizado que une el CSF-1, IL-34 o CSF-1R humano, en donde el dominio variable comprende las regiones estructurales del aceptor humano y las CDR donantes no humanas.

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

 En un cuerpo humanizado de la presente invención, las cadenas pesadas y ligeras
30 aceptantes no necesariamente deben derivarse del mismo anticuerpo y, si así lo desean, pueden

comprender cadenas compuestas que tienen regiones estructurales derivadas de diferentes cadenas.

Los anticuerpos para uso en la presente invención también se pueden generar usando varios métodos de presentación de fagos conocidos en el arte, incluyendo a los descritos por
 5 Brinkman et al. (en J. Immunol. 1995, methods, 182, 25-34: 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;
 10 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108. Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla, tales como los descritos en US 4,946,778 también se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla para polipéptidos CSF-1, IL-34 o CSF-1R. Además, se pueden usar ratones transgénicos u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados.

El anticuerpo usado en la presente invención puede comprender una molécula de anticuerpo completa con cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de las mismas, pero no se limitan a anticuerpos de dominio único Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv (p. Ej. VH o VL o VHH), anticuerpos scFv, bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los
 20 anteriores (véase, por ejemplo, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son muy conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpo para uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las
 25 solicitudes internacionales de patente WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, por ejemplo, pueden ser biespecíficos o monoespecíficos (véase, por ejemplo, WO 92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 y WO2010/035012).

En una realización, el anticuerpo se proporciona como una proteína de fusión de
 30 anticuerpo de unión a CSF-1 de IL-34 o CSF-1R que comprende una fracción de inmunoglobulina, por ejemplo un fragmento Fab o Fab', y uno o dos anticuerpos de dominio

único (dAb) vinculados directa o indirectamente a los mismos, tal y como se describe, por ejemplo, en WO2009/040562, WO2010/035012, WO2011/030107, WO2011/061492 y WO2011/086091, todos incorporados a la presente por referencia.

5 En una realización, la proteína de fusión comprende dos anticuerpos de dominio, por ejemplo, como una pareja de variable de cadena pesada (VH) y variable de cadena ligera (VL), opcionalmente unidos por un enlace disulfuro.

10 En una realización, el elemento Fab o Fab' de la proteína de fusión tiene la misma especificidad o una similar al anticuerpo o anticuerpos de dominio único. En una realización, el elemento Fab o Fab' tiene una especificidad diferente al anticuerpo de dominio único o anticuerpos, es decir que la proteína de fusión es multivalente. En una realización, una proteína de fusión multivalente de acuerdo con la presente invención tiene un sitio de unión de albúmina, por ejemplo una pareja VH/VL proporciona un sitio de unión a la albúmina.

15 Los fragmentos de anticuerpo y los métodos para producirlos son muy conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181. Ejemplos particulares de fragmentos de anticuerpo para uso en la presente invención son fragmentos Fab' que tienen una región bisagra nativa o modificada. Un número de regiones bisagra modificadas ya se describieron, por ejemplo, en US 5,677,425, WO99/15549, y WO98/25971 y estas se incorporan a la presente por referencia. Otros ejemplos de fragmentos de anticuerpo particular para uso en la presente invención incluyen aquellos descritos en solicitudes 20 internacionales de patente PCT/GB2004/002810, PCT/GB2004/002870 y PCT/GB2004/002871 (todas presentadas el 1º de julio 2004). De manera particular, se prefieren los fragmentos Fab de anticuerpo modificado descritos en la solicitud internacional de patente 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.

25 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, ya sea kappa o lambda.

30 El anticuerpo puede ser de cualquier clase (p. Ej. IgG, IgE, IgM, IgD y IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina. En una realización, el anticuerpo para uso en la presente invención es de la clase IgG y se puede seleccionar de entre cualquiera de las subclases IgG, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

diferencial por diferentes isotipos de IgG depende de la afinidad de estos residuos a FcγRs. En humanos, IgG1 y IgG3 son conocidos por inducir funciones efectoras, mientras que IgG2 y IgG4 inducen las funciones efectoras débilmente.

En una realización preferida, el anticuerpo para uso en la presente invención es un anticuerpo IgG2 o IgG4 que induce las funciones efectoras débilmente, incluyendo la ADCC. Es particularmente preferible que el anticuerpo para uso en el tratamiento de la enfermedad fibrótica en la presente invención tenga una función efectora limitada porque el uso de un anticuerpo con la función efectora puede causar una mayor reducción de las células que expresan CSF1-R incluyendo los macrófagos, lo que puede causar efectos secundarios en el paciente.

El anticuerpo para uso 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., and Adair,J.R. 1993. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. *Mol. Immunol.* **30**:105-108) describen un método de mutagénesis de sitio dirigido para minimizar la formación de media molécula de anticuerpos IgG4. En este informe, la sustitución de un único aminoácido dentro de la bisagra núcleo, S241P, resultó en una formación de media-molécula sustancialmente menor. Por consiguiente, en la realización en 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 postraduccionales. El tipo y el alcance de estas modificaciones depende a menudo de la línea de células huésped usada para expresar el anticuerpo, así como las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y la desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico de carboxi-terminal (como la lisina o arginina) debido a la acción de las carboxipeptidasas (tal y 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 o epítipo específico del polipéptido CSF-1R, CSF-1 o IL-34 humano puede ser identificada por cualquier método adecuado mapeo de epítipos conocido en la técnica, combinado con cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Ejemplos de dichos métodos incluyen el cribado de péptidos de diferentes longitudes derivados

del CSF-1R para unirse al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que puede unirse específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos CSF-1, IL-34 o CSF-1R se pueden producir sintéticamente o por digestión proteolítica del polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R. Los péptidos que se unen al anticuerpo se pueden identificar, por ejemplo, mediante análisis de espectrometría de masas. En otro ejemplo, se puede utilizar espectroscopía de RMN o cristalografía de rayos X para identificar el epítipo unido por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención se puede usar, en caso de que sea necesario, como un inmunógeno para obtener anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítipo.

Las moléculas biológicas, tales como los anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, lo que le confieren a la molécula una carga positiva o negativa neta. La cantidad de carga general “observada” dependerá de la secuencia de aminoácidos absoluta de la entidad, el entorno local de los grupos cargados en la estructura en 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoeléctrico (pI) es el pH en el que una molécula particular o la superficie accesible al disolvente de la misma no tiene ninguna carga eléctrica neta. En un ejemplo, el anticuerpo CSF-1, IL-34 o CSF-1R y los fragmentos se pueden diseñar para tener un punto isoeléctrico apropiado. Esto puede llevar a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más robustas, en una solubilidad adecuada particular y/o perfiles de estabilidad y/o características mejoradas de purificación.

De esta forma, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo CSF-1, IL-34 o CSF-1R humanizado diseñado para que tenga un punto isoeléctrico diferente al del anticuerpo originalmente identificado. El anticuerpo puede, por ejemplo, ser diseñado mediante sustitución de un residuo de aminoácido, como por ejemplo reemplazando un residuo de aminoácido ácido por uno o más residuos de aminoácidos básicos. Alternativamente, se pueden introducir los residuos de aminoácidos básicos o se pueden retirar los residuos de aminoácidos ácidos. Alternativamente, si la molécula tiene un valor inaceptablemente alto de pI, se pueden introducir residuos ácidos para bajar el pI, conforme sea necesario. Al manipular el pI, hay que tener cuidado para mantener la actividad deseable del anticuerpo o el fragmento. De esta forma, en una realización el anticuerpo o fragmento diseñado tiene la misma o substancialmente la misma actividad que el anticuerpo o fragmento “no modificado”.

Se pueden usar programas 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, para predecir el punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento.

Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención pueda ser alterada usando cualquier método adecuado que se conozca en la técnica. Por consiguiente, la presente invención también hace referencia a variantes de las moléculas del anticuerpo de la presente invención que tienen una mejor afinidad por CSF-1, IL-34 o CSF-1R. Dichas variantes pueden ser obtenidas por medio de una serie de protocolos de maduración de afinidad, incluyendo mutación de las CDR (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), intercambio de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), barajado de ADN (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), presentación de fagos (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (*supra*) discuten estos métodos de maduración de afinidad.

Si así se desea, un anticuerpo para uso en la presente invención pueden conjugarse con una o más molécula(s) efectora(s). Se apreciará que la molécula efectora pueda comprender una única molécula efectora o dos o más de tales moléculas, ligadas de tal manera que formen una única fracción que se pueda unir a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo ligado a una molécula efectora, este se puede preparar mediante procedimientos químicos estándar o de ADN recombinante en el que el fragmento del anticuerpo se une directamente o mediante un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras a los anticuerpos son conocidas en la técnica (véase Hellstrom *et al.*, Controlled Drug Delivery, 2nd 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). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en 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, la unión puede conseguirse usando procedimientos de ADN recombinante, como por ejemplo los descritos en WO 86/01533 y EP0392745.

El término molécula efectora, tal y como se usa aquí, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, como por ejemplo enzimas,

otros anticuerpos o fragmentos de los anticuerpos, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. Ej. ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioiodide, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos informadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden ser detectados mediante espectroscopia de RMN o RPE.

Los ejemplos de las moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos, incluyendo cualquier agente que sea perjudicial para (*p. Ej.* que mate) las células. Los ejemplos incluyen combrestatins, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, esponjistatina, rizoxina, halicondrinas, roridina, hemiasterlina, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y análogos y 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 clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), cyclophosphamide, busulfán, dibromo manitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (*(p. Ej.* daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (*e.g.* dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicina o duocarmicina), y agentes antimitóticos (*(p. Ej.* vincristina y vinblastina).

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

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen mas no se limitan a enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, los polipéptidos y los péptidos de interés incluyen pero no se limitan a las inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de difteria, una proteína como la insulina, factor de necrosis tumoral, α -interferon, β -interferon, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, *p. Ej.* angiostatina o

endostatina, o, un modificador de respuesta biológica, como por ejemplo una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales que emiten positrones (para uso en tomografía de emisión de positrones), e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, generalmente, la Patente de EE.UU. No. 4,741,900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta galactosidasa, o acetilcolinesterasa-galactosidase, or acetylcholinesterase; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, dicloro triazinilo amino fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina, y aecuorina; y los 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 *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la entrega de un anticuerpo al sistema inmune a través de una barrera epitelial. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión de albúmina tales como los descritos en WO05/117984.

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

Cuando la molécula efectora es un polímero, por lo general puede ser un polímero sintético o de origen natural, como por ejemplo un polialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, polialquenileno o un polímero de polioxialquileno o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. Ej. un homo o heteropolisacárido.

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

Los ejemplos específicos de los polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), alcohol de polivinilo de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o derivados de los mismos, especialmente polietilenglicol opcionalmente sustituido, como por ejemplo metoxi polietilenglicol o derivados de los mismos.

- 5 Los polímeros de origen natural específicos incluyen la 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.

- Se pretende que los “derivados”, tal y como se usan aquí, incluyan los derivados reactivos, como por ejemplo los grupos reactivos tiol-selectivos, tales como las maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar ligado directamente o a través de un segmento de unión al polímero. Se apreciará que el residuo de dicho grupo en algunos casos haga parte del producto como el grupo de unión entre el anticuerpo y el polímero.
- 10

- El tamaño del polímero se puede variar a voluntad, pero por lo general estará en un intervalo de peso molecular entre 500Da y 50000Da, por ejemplo entre 5000 y 40000Da, como por ejemplo entre 20000 y 40000Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse, en particular, con base en el uso previsto para el producto, como por ejemplo la capacidad de localizarse en ciertos tejidos, tales como los tumores o extender la vida media circulante (para revisión, véase Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando el producto esté destinado a dejar la circulación y penetrar en el tejido, por ejemplo para uso en el tratamiento de un tumor, puede resultar ventajoso usar un polímero de pequeño peso molecular, como por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5000Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede resultar ventajoso usar un polímero de peso molecular superior, por ejemplo que tenga un peso molecular dentro del rango de 20000Da y 40000Da.
- 15
- 20
- 25

Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tales como un polietilenglicol o, especialmente, un metoxi polietilenglicol o un derivado de los mismos, y especialmente con un peso molecular en el rango de aproximadamente 15000Da a aproximadamente 40000Da.

- 30 En un ejemplo de anticuerpo para uso en la presente invención se unen a fracciones de polietilenglicol (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento del anticuerpo y

las moléculas de PEG pueden estar unidas a través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional de aminoácidos terminales ubicados en el fragmento del anticuerpo, como por ejemplo cualquier grupo libre de amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Dichos aminoácidos pueden ocurrir naturalmente en el fragmento del anticuerpo o se pueden diseñar en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, US 5,219,996; US 5,667,425; WO98/25971, WO2008/038024). En un ejemplo, la molécula del anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado, en donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de su uno o más aminoácidos de cadena pesada para permitir la unión de una molécula efectora. Convenientemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a la que se puede unir la molécula efectora. Se pueden utilizar múltiples lugares para unir las dos o más moléculas PEG.

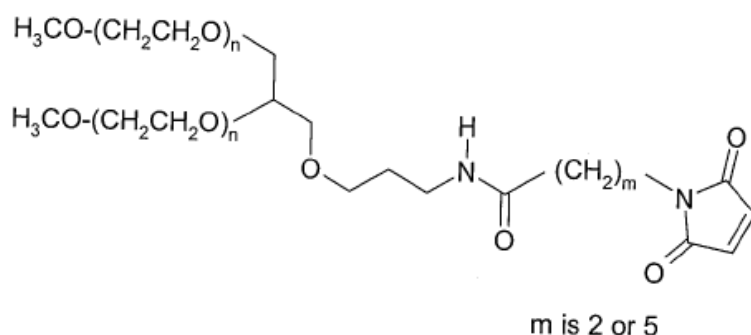
Convenientemente, las moléculas PEG están unidas covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento del anticuerpo modificado se puede unir covalentemente al átomo de azufre de un resto de cisteína localizado en el fragmento. La unión covalente generalmente será un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se utiliza un grupo tiol como el punto de unión de moléculas efectoras apropiadamente activado, se pueden usar, por ejemplo, derivados selectivos de tiol, tales como derivados de maleimida y cisteína. Se puede usar un polímero activado como el material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímeros, tal y como se describe anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo tiol reactivo, como por ejemplo un éster o ácido α -halocarboxílico, p. Ej. yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una sulfona de vinilo o un disulfuro. Dichos materiales de partida se pueden obtener en el mercado (por ejemplo con Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) o se pueden preparar a partir de materiales de partida disponibles en el mercado, usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (que se puede obtener a través de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (que se puede obtener a través de Nektar, anteriormente Shearwater).

En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado, un fragmento Fab' o un fragmento diFab PEGilado, *es decir*, que tiene PEG (polietilenglicol) unido covalentemente al

mismo, *p. Ej.* de acuerdo con el método revelado en EP 0948544 o en EP1090037 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. En un ejemplo, el PEG se une a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado de PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina se puede unir covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina se puede unir a un polímero de metoxi polietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 20,000Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede, por lo tanto, ser de aproximadamente 40,000Da.

Las moléculas particulares de PEG incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etilamina de N,N'-bis(metoxi polietilenglicol) PM 20.000), lisina modificada, también conocida como PEG2MAL40K (que se puede obtener a través de Nektar, anteriormente Shearwater).

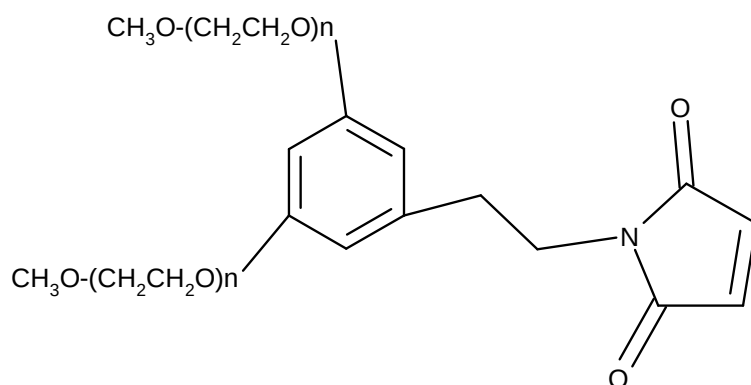
Entre las fuentes alternativas de enlazadores de PEG se incluye a NOF, que suministran GL2-400MA3 (en donde m en la estructura abajo es 5) y GL2-400MA (en donde n es aproximadamente 450:



Es decir, cada PEG es de aproximadamente 20,000Da.

Por consiguiente, en una realización el PEG es 2,3-bis(metil polioxietileno-oxi)-1-[[3-(6-maleimido-1-oxoetil)amino]propiloxi} hexano (el PEG ramificado de 2 brazos, -CH₂)₃NHCO(CH₂)₅-MAL, Mw 40,000 conocido como SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Otras alternativas de moléculas efectoras de PEG del siguiente tipo:



En una realización se proporciona un anticuerpo, como por ejemplo un anticuerpo de longitud completa, PEGilado (por ejemplo con un PEG descrito en la presente), unido mediante un residuo aminoácido de cisteína en o cerca del aminoácido 226 en la cadena, por ejemplo el aminoácido 226 de la cadena pesada (por numeración secuencial).

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

Las moléculas Fab-PEG conforme a la presente invención pueden ser particularmente ventajosas en tanto que tienen una vida media independiente del fragmento Fc.

En una realización, se proporciona un scFv conjugado con un polímero, como por ejemplo una molécula 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 empiezan con una proteína, tal y como se describe en US 8,017,739, incorporada a la presente por referencia.

Para identificar los inhibidores de la actividad del CSF-1R, los expertos en la técnica pueden utilizar distintas técnicas. En un ejemplo, los inhibidores se identifican al identificar primero los agentes que interactúan con CSF-1, IL-34 o CSF-1R y luego probando esos agentes para identificar los que inhiben la actividad del CSF-1R. En uno de dichos ejemplos, el agente es un anticuerpo.

Los agentes que interactúan con CSF-1, IL-34 o CSF1-R se pueden identificar usando cualquier método adecuado, por ejemplo usando un sistema de ensayo basado en células o libres de células, en donde el polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R entra en contacto con un agente

candidato y se determina la capacidad del agente candidato de interactuar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad del agente candidato de interactuar con un polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R se compara con un rango de referencia o control. Si así se desea, este ensayo se puede usar para cribar una pluralidad (p. Ej. una librería) de agentes candidatos usando una

5 pluralidad de muestras de polipéptidos CSF-1, IL-34 o CSF-1R. En un ejemplo de ensayo libre de células, una primera y segunda muestra que comprenden un polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R nativo o recombinante entran en contacto con un agente candidato o un agente de control y la capacidad del agente candidato de interactuar con el polipéptido es determinada al comparar la diferencia en interacción entre el agente candidato y el agente de control. Preferiblemente,

10 primero se inmoviliza el polipéptido, por ejemplo al contactar el polipéptido con un anticuerpo inmovilizado que lo reconoce específicamente y lo une, o al contactar una preparación purificada de polipéptido con una superficie diseñada para unir proteínas. El polipéptido puede purificarse parcial o completamente (por ejemplo, parcial o completamente libre de otros polipéptidos) o parte de un lisado celular. Adicionalmente, el polipéptido puede ser una proteína de fusión que

15 comprende el polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF1-R o una porción biológicamente activa de la misma y un dominio como por ejemplo glutatión S-transferasa o la región Fc de IgG. Alternativamente, el polipéptido puede ser biotinilado usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (p. Ej. kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL). La capacidad del agente candidato de interactuar con el polipéptido se puede determinar usando métodos

20 conocidos por los expertos en el arte, ELIS A, BIAcore™, citometría de flujo o tecnología de ensayo de microvolumen fluorescente (FMAT, por sus siglas en inglés). En otro ejemplo en donde se usa un ensayo a base de células, una población de células que expresan CSF-1, IL-34 o CSF-1 R entra en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato de interactuar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad del agente candidato

25 de interactuar con CSF-1, IL-34 o CSF-1R se compara con un rango de referencia o control. La célula, por ejemplo, puede ser de origen eucariota (p. Ej. levadura o mamífero) y puede expresar el polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1 R de forma endógena o se puede modificar genéticamente para expresar el polipéptido. En algunas instancias, el polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R o el agente candidato está etiquetado, por ejemplo con un marcador radiactivo (como por ejemplo P,

30 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 usar métodos alternativos como ELISA, citometría de flujo y FMAT. Se pueden identificar agentes que inhiben la actividad del CSF-1R mediante cualquier método adecuado, como por ejemplo mediante: (i) comparar la actividad del 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 del CSF-1R. Tales ensayos pueden usarse para cribar agentes candidatos, en el seguimiento clínico o en el desarrollo de fármacos. Tal y como se describe arriba, los agentes pueden ser preseleccionados cuando sea el caso (p. Ej. un anticuerpo) para identificar agentes que interactúan con CSF-1, IL-34 o CSF-1R antes de seleccionar dichos agentes que se unen por su capacidad de inhibir la actividad del CSF-1R. En un ejemplo, el sistema de ensayo a base de células se usa para identificar agentes capaces de inhibir la actividad del CSF-1R.

En un ejemplo particular, el ensayo usado para identificar los inhibidores de la actividad del CSF-1R es el ensayo estándar de estimulación de colonia *in vitro* de Metcalf, 1970, J. Cell.Physiol.76-89, en donde CSF-1 es capaz de estimular la formación de colonias de macrófagos. Se agregan los inhibidores potenciales al ensayo y se mide la proliferación de macrófagos por medio de cualquier método adecuado, como por ejemplo mediante la incorporación de ³H timidina o conversión de colorante formazán. Por consiguiente, la inhibición se mide como una reducción en la proliferación en comparación con los controles.

En otro ejemplo, los inhibidores de CSF-1R pueden regular negativamente la expresión del polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R, como por ejemplo inhibidores antisentido. Dichos inhibidores pueden ser identificados por medio de cualquier método conocido en el arte. En un ejemplo, dichos inhibidores son identificados en un sistema de ensayo a base de células. Por consiguiente, una población de células que expresan un polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R o un ácido nucleico entran en contacto con un agente candidato y la capacidad del agente candidato de alterar la expresión del polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R es determinado mediante comparación con un rango de referencia o control. En un ejemplo, las poblaciones de células que expresan un polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF1-R entran en contacto con un agente candidato o un agente de control y la capacidad del agente candidato de alterar la expresión de los polipéptidos CSF-1, IL-34 o CSF1-R o ácidos nucleicos es determinada al comparar la diferencia en el nivel de expresión de los polipéptidos CSF-1, IL-34 o CSF1-R o ácidos nucleicos entre las

poblaciones de células tratadas y de control. Si así se desea, este ensayo se puede usar para cribar una pluralidad (p. Ej. una librería) de agentes candidatos. La célula, por ejemplo, puede ser de origen eucariota (p. Ej. levadura o mamífero) y puede expresar el polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1 R de forma endógena o se puede modificar genéticamente para expresar un polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1 R. La capacidad de los agentes candidatos para alterar la expresión de un dicho polipéptido o ácidos nucleicos puede ser determinada por medio de métodos conocidos para los expertos en el arte, como por ejemplo y no limitado a ciometría de flujo, radiomarcage, un ensayo de centelleo, inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western, análisis de transferencia Northern o RT-PCR.

Los agentes que inhiben la actividad del CSF-1R pueden ser identificados o probados, por ejemplo para determinar las cantidades terapéuticamente efectivas en uno o más modelos animales. Ejemplos de animales adecuados incluyen mas no se limitan a ratones, ratas, conejos, monos, conejillos de indias perros y gatos. En un ejemplo en el que el agente inhibe la expresión del CSF-1, IL-34 o CSF-1R, un primer y segundo grupo de mamíferos son administrados con un agente candidato o un agente de control y la capacidad del agente candidato de inhibir la expresión del polipéptido CSF-1, IL-34 o CSF-1R o ácido nucleico es determinada comparando la diferencia en el nivel de expresión entre el primer y el segundo grupo de mamíferos. Cuando así se desea, los niveles de expresión de los polipéptidos CSF-1, IL-34 o CSF-1R o ácidos nucleicos en el primer y segundo grupo de mamíferos se puede comparar al nivel del polipéptido o ácido nucleico CSF-1, IL-34 o CSF-1R en un grupo de control de mamíferos. El agente candidato o un agente de control puede ser administrado por medios conocidos en el arte (p. Ej. por vía oral, rectal o parenteral, como por ejemplo por vía intraperitoneal o por vía intravenosa). Los cambios en la expresión de un polipéptido o ácido nucleico se pueden valorar con los métodos descritos anteriormente.

En otro ejemplo, la inhibición de la actividad CSF-1R se puede determinar monitoreando un alivio o mejoría en los síntomas de la enfermedad, y/o un retraso en la aparición o un avance más lento de la enfermedad. Por ejemplo, pero sin limitarse al mismo, en el caso de la FPI esto se puede manifestar como una reducción en la disminución de la función pulmonar medida por la capacidad vital forzada, una reducción en la capacidad de difusión según lo medido por la DLCO, o una reducción en la disminución de la distancia caminada en seis minutos. La inhibición de la actividad del CSF-1R en pacientes con FPI también se puede determinar

monitoreando eventos clínicos tales como las exacerbaciones, definidas como un rápido deterioro de la actividad de la enfermedad en ausencia de otras causas. En el caso de la fibrosis hepática, la prueba de Fibrosis Hepática Mejorada (ELF, por sus siglas en inglés) se puede usar para monitorear la enfermedad, midiendo cuantitativamente la cantidad de ácido hialurónico, propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III (PIIINP) e inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (TIMP1) en suero y combinándolos mediante el uso de un algoritmo para producir una única puntuación ELF, cuya magnitud indica la gravedad de la enfermedad. Respecto a la esclerosis sistémica, los efectos de la inhibición del CSF-1R se pueden manifestar como una progresión reducida de la Escala de Piel Modificada de Rodnan y/o la Escala de Gravedad de Medsger, o a nivel de órganos individuales, por ejemplo el retraso de la enfermedad pulmonar intersticial asociada a la esclerodermia. El efecto de la inhibición del CSF-1R en el curso de la fibrosis renal, incluyendo mas no limitado a la enfermedad renal crónica y la fibrosis del injerto post-trasplante, se puede manifestar como una reducción en la disminución o mejora de la tasa de filtración glomerular (TFG) y/o la proteinuria.

De esta forma, en una realización emplear un inhibidor del CSF-1R puede proporcionar una reducción en una o más de las actividades complementarias en la disminución de la función pulmonar, según como se mide por la capacidad vital forzada o una reducción en la disminución de la distancia recorrida en la prueba de caminata de seis minutos en pacientes con IPF. La pruebas de Fibrosis Hepática Mejorada (ELF) se puede usar para monitorear la fibrosis hepática, midiendo cuantitativamente la cantidad de ácido hialurónico, propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III (PIIINP) y el inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (TIMP1) en suero y combinándolos mediante el uso de un algoritmo para producir una única puntuación ELF, cuya magnitud indica la gravedad de la enfermedad.

Las técnicas conocidas por los médicos familiarizados con la enfermedad fibrótica pueden ser usadas para determinar si un agente candidato ha alterado uno o más síntomas asociados con la enfermedad. En el arte se conocen algunos modelos diferentes de enfermedad fibrótica. Estos incluyen la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, según revisado en Moore BB and Hogaboam CM, 2008, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 294, L152-60; Scotton CJ and Chambers RC, 2010 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 299, L439-41, modelo de fibrosis inducida por la adenosina en ratón deficiente en adenosina desaminasa (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 and Franko AJ, 1989, Radiation Research 119, 1-14; Sharplin J and Franko AJ, 1989, Radiation Research 119, 15-31; Johnston CJ et al, 1998, Exp Lung Res, 24, 321-37; Haston CK and Travis EL, 1997, Cancer Res 57, 5286-91; Katoh H *et al*, 2010, J Radiat Res, 51, 325-332), la 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 OUU (obstrucción ureteral unilateral) de la fibrosis renal (Klahr S and 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 and Harris DC, 2011, Nephrology, 16, 30-38), el modelo de reducción de 5/6 de la enfermedad renal crónica (Griffin A et al, 1994, J Am Soc Nephrol, 4, 2023-31; el modelo inducido por el ácido hipocloroso de la esclerosis sistémica (Servettaz, A et al, 2009, J Immunol, 182(9), 5855-64), y modelos alternativos de la esclerosis sistémica como la fibrosis de la piel inducida por la bleomicina, modelo de ratón con piel firme, en el que los ratones son heterocigotos para una mutación en el gen de la fibrilina-1 y el modelo esclerodermiforme de la enfermedad de injerto contra huésped en donde los ratones desarrollan fibrosis pulmonar y de piel, según revisado en Yamamoto, T, 2010, J Dermatol, 37, 26-41. Generalmente los diferentes modelos animales exhiben una producción excesiva y la deposición de la matriz extracelular que incluye el colágeno en el órgano o tejido afectado, lo que constituye el sello de la fibrosis. Otras mediciones de la enfermedad fibrótica variarán de modelo a modelo, ya que diferentes órganos se ven afectados en los modelos específicos. La elevación de los niveles de proteína y de creatinina de la urea se puede medir en los modelos de fibrosis renal, mientras que en los modelos de fibrosis pulmonar a menudo se utiliza una puntuación histopatológica de la extensión y la gravedad de la fibrosis, como por ejemplo la puntuación de Ashcroft modificada (Hubner RH *et al*, 2008, Biotechniques 44: 507-17).

Las técnicas de monitoreo de la fibrosis incluyen pruebas de función pulmonar para la fibrosis pulmonar, la prueba ELF para la enfermedad/fibrosis hepática, el FibroTest (análisis de

sangre de los marcadores de fibrosis) para la enfermedad hepática y la elastografía transitoria (Fibroscan®), que es una tecnología de imagen que permite medir la rigidez del hígado, y que resulta útil para detectar y evaluar la fibrosis hepática. También se puede realizar un análisis de muestras de tejido a partir de una biopsia.

5 Tal y como se discute en este documento, los inhibidores de la actividad del CSF-1R se pueden usar en el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica. Para tal uso, los agentes generalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la actividad del CSF-1R y un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable. El término 'tratamiento'

10 incluye la terapia ya sea terapéutica o profiláctica. Cuando en el presente documento se hace referencia a un método para tratar o prevenir una enfermedad o condición usando un inhibidor particular o una combinación de inhibidores, debe entenderse que dicha referencia pretende incluir el uso de dicho inhibidor o combinación de inhibidores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica. La composición por

15 lo general se suministra como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método de administración a pacientes deseado). Los inhibidores de uso en la invención preferiblemente son administrados a un sujeto por vía oral o intrarrectal, pero también pueden ser administrados por otras vías diferentes, como por ejemplo

20 por vía transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa e intramuscular. La ruta de administración más adecuada dependerá, en cualquier caso, del inhibidor particular, el sujeto, y la naturaleza y severidad de la enfermedad y la condición física del sujeto.

Los inhibidores de uso en la invención pueden ser administrados de forma combinada, p. Ej. de forma simultánea, secuencial o separada, con otro o más compuestos terapéuticamente

25 activos, que pueden ser, por ejemplo, una terapia antifibrótica como las terapias de pirfenidona o contra el cáncer.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis. Dicha unidad puede contener, por ejemplo, mas no limitado a, entre 1000mg/kg y

30 0,01mg/kg por ejemplo entre 750mg/kg y 0,1mg/kg, como por ejemplo entre 100mg/kg y 1mg/kg

dependiendo de la condición tratada, la vía de administración y la edad, peso y condición del sujeto.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso en la invención pueden adoptar una amplia variedad de formas, dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración.

5 Las composiciones para administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en la forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes y elixires, o pueden presentarse como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Las preparaciones líquidas orales pueden contener agentes de suspensión, tal y como se conoce en el arte. En el caso de las
10 preparaciones sólidas orales, tales como polvos, cápsulas y comprimidos, se pueden incluir los vehículos como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes, y similares. Debido a que son fáciles de administrar, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso generalmente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos.

15 Además de las formas de dosificación comunes expuestas anteriormente, los agentes activos de la invención también se pueden administrar a través de medios de liberación controlada y/o dispositivos de entrega. Los comprimidos y las cápsulas pueden comprender vehículos o excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, como por ejemplo jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona; rellenos, como por ejemplo
20 lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes de compresión, por ejemplo estearato de magnesio, talco, polietilenglicol y sílice; desintegrantes, por ejemplo almidón de papa; o agentes humectantes aceptables tales como el laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse con técnicas acuosas o no acuosas estándar de acuerdo con los métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal. Las composiciones farmacéuticas de
25 la presente invención adecuadas para administración por vía oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, sobres o comprimidos, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del agente activo, como polvo o gránulos, o como una solución o una suspensión en una emulsión líquida acuosa, una líquida no acuosa, una de aceite-en-agua o una de agua-en-aceite. Dichas composiciones pueden ser preparadas por medio de cualquiera de
30 los métodos de farmacia pero todos los métodos incluyen el paso de asociar el agente activo con el vehículo, lo que constituye uno o más ingredientes necesarios. Por lo general, las

composiciones se preparan mezclando de manera uniforme e íntima el agente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, de ser necesario, dando forma al producto en la presentación deseada. Por ejemplo, un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios.

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral se pueden preparar como soluciones o suspensiones de los agentes activos de la invención en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, como por ejemplo hidroxipropil celulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones
10 contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones de inyección estériles acuosas o no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la composición isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las soluciones,
15 dispersiones y suspensiones extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas con dispositivos médicos conocidos en el arte. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición farmacéutica de la invención puede ser administrada con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, como por ejemplo los dispositivos descritos en US 5,399,163;
20 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; o 4,596,556. Ejemplos de implantes y módulos útiles conocidos en la presente invención incluyen: US 4,487,603, que describe una bomba de micro-infusión implantable para dispensar medicamento 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 medicamento para suministrar
25 medicación a una velocidad de infusión precisa; US 4,447,224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármacos; US 4,439,196, que describe un sistema osmótico de administración de fármacos que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y US 4,475,196, que describe un sistema osmótico de suministro de medicamentos. Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos de este
30 tipo son conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, apósitos impregnados, pulverizaciones, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos, y similares. Estas composiciones se pueden preparar por medio de métodos convencionales que contienen el agente activo. De esta manera, también pueden comprender vehículos convencionales compatibles y aditivos, como por ejemplo conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, emolientes en cremas o ungüentos y etanol o alcohol oleico para lociones. Dichos vehículos pueden estar presentes en un porcentaje desde aproximadamente 1 por ciento hasta aproximadamente 98 por ciento de la composición. Más usualmente, formarán hasta aproximadamente 80 por ciento de la composición. A modo únicamente de ejemplo, una crema o ungüento se prepara mezclando cantidades suficientes de material hidrófilo y agua, que contienen desde aproximadamente 5-10 por ciento en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o ungüento que tenga la consistencia deseada. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica se pueden presentar como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Por ejemplo, el agente activo se puede suministrar desde el parche por iontoforesis. Para aplicaciones a tejidos externos, como por ejemplo la boca y la piel, las composiciones preferiblemente se aplican como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el agente activo puede ser usado con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Alternativamente, el agente activo puede ser formulado en una crema con una base de crema de aceite-en-agua o una base de agua-en-aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen caramelos, pastillas y enjuagues bucales. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica al ojo incluyen gotas para los ojos en donde el agente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. También incluyen ungüentos tópicos o cremas, como anteriormente. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal en donde el vehículo es un sólido son preferiblemente presentadas como supositorios de dosis unitaria. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao u otro glicérido o materiales usados comúnmente en la técnica, y los supositorios pueden formarse convenientemente por mezcla de la combinación con las **cabeza(s)** ablandadas o fundidas, seguido del enfriamiento y conformación de moldes. También se pueden administrar como enemas.

La dosis que se va a administrar de un inhibidor de la actividad del CSF-1R variará de acuerdo con el inhibidor particular, el tipo de enfermedad fibrótica, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto, así como la vía de administración seleccionada; la dosis adecuada puede ser determinada fácilmente por una persona experta en la técnica. Para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica en humanos y animales, se pueden administrar composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos (p. Ej. sujetos humanos) en dosis terapéuticamente o profilácticamente efectivas (p. Ej. dosis que resultan en la inhibición de la enfermedad fibrótica y/o el alivio de los síntomas de la enfermedad fibrótica) usando cualquier vía de administración adecuada, como por inyección y por otras vías de administración conocidas en la técnica para los productos clínicos, tales como productos clínicos a base de anticuerpos. Las composiciones pueden comprender al menos 0,05 por ciento en peso, por ejemplo de 0,5 a 50 por ciento en peso, como por ejemplo de 1 a 10 por ciento en peso o más por peso del inhibidor de la invención, dependiendo del método de administración. Un experto en el arte reconocerá que la cantidad óptima y la distancia entre las dosis individuales de un inhibidor de la invención se determinarán con base en la naturaleza y grado de la afección que se trata, la forma, ruta y lugar de administración, así como la edad y condición del sujeto particular que se está tratando, y que un médico finalmente determinará las dosis adecuadas que se van a usar. Esta dosis se puede repetir todas las veces que se considere apropiado. En caso de efectos secundarios, se puede alterar o reducir la cantidad y/o frecuencia de la dosis, conforme a la práctica clínica normal.

En otro ejemplo, cuando el inhibidor es un ácido nucleico, este se puede administrar por medio de terapia génica (véase, por ejemplo, Hoshida, T. et al, 2002, *Pancreas*, 25:111-121; Ikuno, Y. 2002, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002 43:2406-2411; Bollard, C, 2002, *Blood* 99:3179- 3187; Lee E., *Mol. Med.* 7:773-782). La terapia génica se refiere a la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable; en un ejemplo este es un ácido nucleico CSF-1, IL-34 o CSF-IR o porciones del mismo. Cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles en la técnica puede ser usados conforme a la presente invención. El suministro del ácido nucleico terapéutico a un paciente puede ser terapia génica directa *in vivo* (es decir, el paciente se expone directamente al ácido nucleico o vector que contiene ácido nucleico) terapia génica indirecta *ex vivo* (es decir que las células primero se transforman con el ácido nucleico *in vitro* y luego se trasplantan al paciente). Por ejemplo, para la terapia génica *in vivo*, un vector de

expresión que contiene el ácido nucleico CSF-1, IL-34 o CSF-IR puede ser administrado de tal manera que se vuelva intracelular, es decir, mediante infección usando un retroviral defectuoso o atenuado u otros vectores virales descritos, por ejemplo, en US 4,980,286 o por Robbins et al, 1998, Pharmacol. Ther. 80:35-47. Los distintos vectores retrovirales conocidos en el arte son los descritos en Miller et al. (1993, Meth. Enzymol. 217:581-599) que han sido modificados para eliminar las secuencias retrovirales no requeridas para empaquetar el genoma viral y para su posterior integración al ADN de la célula huésped. También se pueden usar los vectores adenovirales, que son ventajosos debido a su capacidad para infectar células que no se dividen, y dichos vectores adenovirales de alta capacidad se describen en Kochanek (1999, Human Gene Therapy, 10:2451-2459). Los vectores virales quiméricos que pueden usarse son los descritos por Reynolds et al. (1999, Molecular Medicine Today, 1:25 -31). Los vectores híbridos también se pueden usar y son descritos por Jacoby et al. (1997, Gene Therapy, 4:1282-1283).

En la terapia génica también se puede usar la inyección directa de ADN desnudo o por bombardeo de micropartículas (p. Ej. Gene Gun(R); Biolistic, Dupont) o por revestimiento con lípidos. Los receptores de la superficie celular/compuestos de transfección o la encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas o la administración del ácido nucleico en unión con un péptido conocido por entrar en el núcleo o su administración en unión a un ligando predispuesto a la endocitosis mediada por receptor (Véase Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem., 262:4429-4432) también se pueden usar para centrarse en tipos de células que expresan específicamente los receptores de interés. En la terapia génica *ex vivo*, un gen es transferido a células *in vitro*, usando cultivo de tejidos y las células son suministradas al paciente por medio de varios métodos, tales como inyección subcutánea, aplicación de las células en un injerto de piel y la inyección intravenosa de células sanguíneas recombinantes, tales como las células madre hematopoyéticas o progenitoras. Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico CSF-1, IL-34 o CSF-IR para fines de terapia génica incluyen, por ejemplo, las células epiteliales, las células endoteliales, los queratinocitos, los fibroblastos, las células musculares, los hepatocitos y las células sanguíneas. Entre las células sanguíneas que se pueden usar se incluyen, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos, células hematopoyéticas o células progenitoras, y similares.

En un aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención comprende un ácido nucleico CSF-1, IL-34 or CSF-IR, en donde dicho ácido nucleico hace parte de un vector de

expresión que expresa un polipéptido CSF1, IL-34 o CSF-IR o una proteína quimérica del mismo en un huésped adecuado. De manera particular, dicho ácido nucleico contiene un promotor unido operativamente a la región codificante del polipéptido, en donde dicho promotor es inducible o constitutivo (y, opcionalmente, específico al tejido).

- 5 A continuación se describirá la invención haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y que no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

FIGURAS

- 10 La **Figura 1A** La Figura 1A muestra la secuencia de aminoácidos para CSF-1R humano.
La **Figura 1B** La Figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos para ciertas variantes de CSF-1R
La **Figura 1C** La Figura 1C muestra la secuencia de aminoácidos de CSF-1R adecuada para expresión en superficies celulares
- 15 La **Figura 2** muestra los datos de citometría de flujo que confirman que el CSF-1 unido al receptor en las células M-NFS-60 fue detectable por este método
La **Figura 3** muestra que el Ab535, ya sea inmovilizado en la superficie del pocillo de cultivo tisular, o libre en solución, no apoyó la proliferación de células M-NFS-60 en la ausencia de CSF-1 a las concentraciones usadas
- 20 La **Figura 4a** muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo la cantidad de colágeno de fluido de lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés) comparado con el tratamiento con el control de isotipo
La **Figura 4b** muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo la puntuación de Ashcroft de las muestras comparado con el tratamiento con
25 control de isotipo, demostrando que la patología fibrótica de los ratones tratados con Ab535 había mejorado
La **Figura 4c** muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo la cantidad de albúmina en el fluido de BAL comparado con el tratamiento con control de isotipo, lo que demuestra una mejora en la integridad de la barrera pulmonar de los
30 ratones tratados con Ab535.

La **Figura 4d** muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo el número de macrófagos en el fluido de BAL.

La **Figura 5** muestra imágenes representativas del análisis histopatológico de los pulmones de animales tratados con control con solución salina, control de bleomicina más isotipo y bleomicina más Ab 535. Los animales tratados con Ab 535 tuvieron una reducción significativa de la fibrosis pulmonar comparado con los animales tratados con control de isotipo y bleomicina.

La **Figura 6a** muestra que el tratamiento con Ab4535 de ratones con deficiencia de ADA con fibrosis pulmonar inducida redujo la concentración de colágeno del fluido de BAL comparado con el tratamiento con control de isotipo.

La **Figura 6b** muestra que el tratamiento con Ab535 de los ratones con deficiencia de ADA con fibrosis pulmonar inducida redujo la puntuación de Ashcroft de las muestras comparado con el tratamiento con control de isotipo, demostrando que la patología fibrótica de los ratones tratados con Ab535 había mejorado.

La **Figura 6c** muestra que el tratamiento con Ab535 de los ratones con deficiencia de ADA con fibrosis pulmonar inducida redujo la cantidad de albúmina en el BAL comparado con el tratamiento con control de isotipo, demostrando que la integridad de la barrera pulmonar de los ratones tratados con Ab535 había mejorado.

La **Figura 6d** muestra que el tratamiento con Ab535 de los ratones con deficiencia de ADA con fibrosis pulmonar inducida redujo el número de macrófagos en el fluido de BAL.

La **Figura 7** muestra imágenes representativas del análisis histopatológico del tejido pulmonar de ratones deficientes en ADA y ratones salvajes tratados ya sea con Ab535 o un anticuerpo de control de isotipo (ratón IgG1). Las secciones de tejido pulmonar fueron teñidas con tricrómico de Masson. El tratamiento con Ab535 de los ratones con deficiencia de ADA redujo en gran medida la cantidad de tejido fibrótico y deposición de colágeno.

1 El aislamiento de un anticuerpo CSF-1R anti-ratón

2 Los conejos recibieron 5 inmunisations con células que expresan transitoriamente los residuos 1-512 del CSF-1R de ratón (**Uniprot Entry p09581**). La respuesta del anticuerpo fue monitoreada en ELISA usando placas Nunc Maxisorp revestidas con 2 µg/ml de CSF-1R de ratón-Fc de conejo. Se observaron títulos de sueros a una dilución de 1:100,000 con ambos conejos. FACS también determinó la unión de sueros a las células M-NFS-60 (Metcalf et al.,

1970). Se trazó la FL1 media frente a la dilución del anticuerpo. Se observó unión a una dilución de 1:10,000.

Usando la línea celular M-NFS-60 dependiente en CSF-1 (Metcalf et al., 1970), se mostró que las sueros de ambos conejos podía bloquear la supervivencia de las células dependiente del CSF-1 a una dilución de 1:100 (no se muestran los datos).

Se sembraron cien placas de 96 pocillos con 1000-5000 células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de conejo por pocillo, que se dejaron crecer durante 1 semana a 37 C en la presencia de células de timoma de ratón EL4-B5 y medio condicionado de células T de conejo (TNS). Luego se cribaron sobrenadantes que contienen anticuerpos en un ensayo de FMAT usando células M-NFS-60 y un conjugado de Cy5 específico con Fc de anti-conejo. Se identificaron 678 aglutinantes de CSF-1R. De estas, aproximadamente el 3% bloqueó la proliferación de las células M-NFS-60 dependientes de CSF-1 en un ensayo de células. Los aglutinantes también se cribaron en ELISA usando placas revestidas con 2 µg/ml de CSF-1R- de conejo-Fc y la unión revelada con un conjugado de F(ab') anti-conejo y 2-HRP. Los aglutinantes también se cribaron en un ensayo de bloqueo en fase sólida basado en ELISA. Para este ensayo, se revistieron placas de 384 pocillos Nunc Maxisorp con 0,5 µg/ml de CSF-1R- de conejo-Fc y posteriormente se bloquearon en PBS/0,1% Tween-20/1% PEG20000. Las placas se lavaron y luego se añadió sobrenadante de cultivo a las placas y se incubó durante >1 hora a temperatura ambiente. Luego se agregó CSF-1 al sobrenadante a una concentración final de 10 ng/ml y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y luego se incubó con 0,5 µg/ml de anticuerpo CSF-1 anti-ratón biotinilado de cabra (R&D systems). La unión del CSF-1 al receptor se reveló usando estreptavidina-HRP. Se seleccionaron ocho pocillos para la progresión. Todos demostraron unión a células y proteína y se bloquearon en el ensayo de células M-NFS-60 y en ELISA.

Se utilizó un método basado en la fluorescencia para identificar las células B específicas de antígeno de un pocillo positivo. Se mezclaron células B secretoras de inmunoglobulina de un pocillo positivo con perlas de estreptavidina recubiertas con CSF-1 de conejo Fc biotinilado de ratón y un conjugado de FITC específico de fragmento de F(ab')₂ de cabra anti-conejo F(ab')₂(Jackson ImmunoResearch). Luego de incubarse a 37C por 1 hora, el anticuerpo secretado de las células B específicas de antígeno fue capturado cerca de esa célula B. La presencia del conjugado de FITC resultó en el etiquetado de perlas recubiertas de anticuerpo y la

formación de focos fluorescentes alrededor de las células B específicas de antígeno. Estas células B individuales, identificadas por medio de un microscopio de fluorescencia, luego se recogieron con un micromanipulador y se depositaron en un tubo de PCR. Se recuperaron genes de región variable de anticuerpos de células individuales mediante transcripción inversa (RT)-PCR. Luego, se expresaron las regiones V de conejo como anticuerpos quiméricos de IgG4 humano o Fabs en un sistema de expresión transitoria de CHO. 4 de 8 pocillos produjeron anticuerpos anti-CSF-1R recombinantes. Luego se confirmó la actividad de neutralización con los anticuerpos recombinantes en el ensayo con células M-NFS-60. También se realizó un BIAcore usando las moléculas Fab para determinar la afinidad con CSF-1R de conejo Fc (Tabla 1). Con base en la actividad de neutralización y afinidad, se seleccionó el Ab535 como el reactivo CSF-1R anti-ratón. Posteriormente, este anticuerpo fue murinizado en un sistema mamífero como un IgG1 murina de longitud completa y fue purificado.

Método BIAcore

Se probó la capacidad de los anticuerpos de unir el CSF-1R en un ensayo BIAcore mediante medición de la cinética de unión a una proteína de fusión recombinante purificada CSF-1R/Fc.

El formato de ensayo fue la captura de los anticuerpos anti-CSF-1R por IgG,F(ab')₂ anti-humano inmovilizado, seguido de titulación del hCSF-1R/Fc sobre la superficie capturada. Se realizó un BIA (Análisis de Interacción Biomolecular) usando un BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Todos los experimentos se realizaron a 25 °C. Se inmovilizó a Affinipure F(ab')₂ fragmento cabra anti-IgG humana F(ab')₂ fragmento específico (Jackson ImmunoResearch) sobre un Chip Sensor CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) mediante química de acoplamiento de amina a un nivel de ~6000 unidades de respuesta (RU). Se utilizó tampón HBS-EP (10 mM HEPES pH 7.4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% tensoactivo P20, GE Healthcare Bio-Sciences AB) como tampón de desplazamiento con una velocidad de flujo de 10 µl/min. Se hizo una inyección de un anticuerpo anti-CSF-1R para dar un nivel de captura de aproximadamente 100 RU en el anti-IgG humano F(ab')₂ inmovilizado.

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 l/min por 3 min seguido de una fase de disociación de 8 min. Estos sensogramas se utilizaron para generar la velocidad de asociación. La superficie se regeneró a una velocidad de flujo de 10

$\mu\text{l}/\text{min}$ por dos inyecciones consecutivas de $10 \mu\text{l}$ de 40 mM HCl , seguido de una inyección de $5 \mu\text{l}$ de 10 mM NaOH . Se analizaron las curvas de unión sustraídas con antecedentes de doble referencia usando el software BIAevaluation software (versión 4.1) siguiendo los procedimientos estándar. Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del algoritmo de ajuste.

5 Los resultados para Ab553 se muestran en la **Tabla 1**.

Table 1

ANTICUERPO REF:	Constante de asociación $k_a (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	Constante de disociación $k_d (\text{s}^{-1})$	Constante de afinidad K_D
Ab 535	$8,05 \pm 0,01 \text{ e } 6$	$1,21 \pm 0,15 \text{ e } -5$	$1,50 \mu\text{M}$

Ejemplo 2 Análisis *In vitro* de Ab535

10 *El Ab535 BLOQUEA LA UNIÓN DEL CSF-535 MURINA A LAS LÍNEAS CELULARES POSITIVAS AL RECEPTOR CSF-1 IN VITRO*

Se investigó la capacidad del Ab535 unido al receptor de evitar la unión del CSF-1 al CSF-1R. Una línea celular positiva de CSF-1R murina, M-NFS-60, fue usada en un ensayo en el que las células fueron preincubadas con Ab535 o un anticuerpo de control antes de su exposición al CSF-1. Luego se detectó el CSF-1 unido a receptor usando un anticuerpo marcado con fluorescencia y citometría de flujo. Se interpretó que una disminución en la intensidad de fluorescencia de las células dependiente del Ab535 indica una capacidad del Ab535 unido al receptor de prevenir la unión del CSF-1 al CSF-1R.

Las células M-NFS-60 (LGC Promochem, Teddington, UK) se mantuvieron en suspensión en medio basal RPMI (Invitrogen) suplementado con 10% de suero de ternera fetal (PAA), Hepes (Invitrogen, 10 mM de concentración final), piruvato de sodio (Invitrogen, 1 mM de concentración final), Glucosa (Sigma-Aldrich, $4,5 \text{ g/l}$ de concentración final), Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich $1,5\%$ de concentración final), beta-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, $0,05$ de concentración final), CSF-1 murina recombinante (Preprotech, $3,3 \text{ ng/ml}$, concentración final).

Las células M-NFS-60 se prepararon en tampón de flujo (PBS (Invitrogen) suplementado con $0,2\%$ de BSA (Sigma-Aldrich $0,09\%$ de azida sódica (Sigma-Aldrich)) a una concentración de 1×10^6 células/ml. Se prepararon diluciones seriadas de Ab535 o un anticuerpo de control de isotipo IgG1 de murina en tampón de flujo y se agregaron a $100 \mu\text{l}$ alícuotas de células para

lograr concentraciones finales de 20, 5, 1,25, 0,32, 0,08 $\mu\text{g/ml}$ en 200 μl de volumen y se incubaron en hielo durante 1 hora. Posteriormente, las células se lavaron dos veces en tampón de flujo, se incubaron con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de CSF-1 murina 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 antimurina biotinilado (R&D Systems, 5 $\mu\text{g/ml}$) por 30 minutos en hielo, se lavaron dos veces en tampón de flujo y anticuerpo unido marcadas por incubación con estreptavidina conjugada con Alexafluor 488 (Invitrogen, dilución 1:200) en hielo por 15 minutos antes de un último paso de lavado y resuspensión de células en 500 μl de tampón de flujo. Se evaluó la fluorescencia de las células mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACSCaliber (Becton Dickinson) y se analizaron los datos usando un software WinMDI.

El análisis de citometría de flujo de datos confirmó que el CSF-1 unido al receptor en células M-NFS-60 fue detectable por este método (**Figura 2a**). La incubación de las células con Ab535 en cualquiera de las concentraciones utilizadas, antes de la adición de CSF-1, impidió la unión de CSF-1 a CSF-1R como (**Figura 2b**). La incubación de las células con un anticuerpo de control de isotipo en cualquiera de las concentraciones utilizadas no tuvo ningún efecto sobre la unión y detección del CSF-1 (**Figura 2c**).

LA UNIÓN DEL Ab535 AL CSF-1R NO SUSTITUYE EL CSF-1 EN LA PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE UNA LÍNEA CELULAR DEPENDIENTE DEL CSF-1 IN VITRO

Se investigó la capacidad del Ab535 de remplazar el CSF-1 en el apoyo a la supervivencia y proliferación de las células dependientes de CSF-1 usando células M-NFS-60 en un ensayo de proliferación celular que incluyó exponer las células al Ab535 libre en solución e inmovilizadas en plástico.

Para evaluar la capacidad de un Ab535 inmovilizado para apoyar las 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 por 24 horas antes de iniciar el ensayo de proliferación celular mediante la adición de 50 μl por pocillo de una solución que contiene 10 $\mu\text{g/ml}$ o 1 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo en PBS e incubación a 4°C. Los pocillos se aspiraron y el anticuerpo no unido se retiró lavando cada pocillo dos veces con 100 μl de PBS.

Las células M-NFS-60 de proliferación, mantenidas tal y como se describió 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 µl de un medio de crecimiento sin CSF-1. Otro medio de crecimiento de 50 µl, suplementado ya sea con CSF-1 murina recombinante, Ab535 o sin suplementos se añadió a los pocillos apropiados. Las placas se incubaron durante 72 horas y se determinó el número de células mediante un kit CellTiter Glo siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega) para generar una lectura de luminiscencia medible proporcional a los niveles de ATP y por consiguiente 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 las M-NFS-60 dependen del CSF-1 para la proliferación, según reflejado por el número de células significativamente mayor en pocillos suplementados con CSF-1 en comparación con los mantenidos en un medio de crecimiento sin CSF-1. Adicionalmente, el Ab535, ya sea inmovilizado en la superficie del pocillo de cultivo tisular, o libre en solución, no apoyó la proliferación de las células M-NFS-60 en ausencia del CSF-1 en las concentraciones usadas (**Figura 3**).

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

La bleomicina es un antibiótico aislado primero a partir de *Streptomyces verticillatus* y ha sido usada como un agente quimioterapéutico para varios tipos de cáncer. La bleomicina modelo de fibrosis pulmonar es un modelo bien establecido y se utilizó 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, J. G., Volmer, J., Mohsenin, A., Pero, R. S., Hong, J. S., Kheradmand, F., Lee, J. J. and Blackburn, M. R. (2008), A3 adenosine receptor signaling influences pulmonary inflammation and fibrosis. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol: 697-705.

Todos los ratones utilizados fueron ratones hembra C57Blk6 de tipo salvaje (20g) comprados de los Laboratorios Harlan. Se usó una instilación de corte intratraqueal (IT) en donde los ratones fueron anestesiados con Avertin y se realizó una traqueotomía para instilar una unidad de dosis de 3,5 de bleomicina en 50 µl de solución salina o 50 µl de solución salina sola como control. El tratamiento de esta manera lleva a una fase inflamatoria que tiene su pico el día 7 después de la exposición a la bleomicina y una fase fibrótica que ocurre máximo el día 21

después de la exposición. Se investigó el efecto del anticuerpo Ab535 cuando el anticuerpo se dosificó solamente en la fase fibrótica del modelo y fue administrado por vía subcutánea a 30mg/kg, tres veces por semana desde el día 9-21. Los animales fueron sacrificados en el día 21 y las lecturas incluyeron el análisis histopatológico de los pulmones, la celularidad del líquido de BAL (lavado broncoalveolar) y la cuantificación del colágeno soluble en el fluido BAL. Se realizó un análisis histopatológico para anotar el daño pulmonar usando un sistema de puntuación modificado Ashcroft 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 25cm y se procesaron por medio de una serie de alcoholes y xileno, incrustados en secciones de parafina y tejido y desparafinadas antes de su procesamiento y coloración con tricrómico de Masson.

La cantidad de colágeno soluble en fluido de BAL también se evaluó usando un kit de ensayo Sircol disponible en el mercado, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El efecto sobre la población de macrófagos en el fluido de BAL se determinó usando preparaciones de Cytospin. Las alícuotas de células BAL se centrifugaron en portaobjetos de microscopio, se coloraron con Diff-Quick y se contaron los macrófagos.

Se encontró que el tratamiento terapéutico con el anticuerpo anti-CSF-1R, Ab535, con inicio en el día 9 resultó en una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina muy reducida. Hubo una reducción significativa tanto en la severidad como en la extensión de la fibrosis. Los ratones tratados habían reducido la producción de colágeno, una patología fibrótica mejorada y una mejor protección de la barrera pulmonar.

La **Figura 4a** muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo la cantidad de colágeno de fluido de lavado broncoalveolar (BAL) comparado con el tratamiento con el control de isotipo.

La **Figura 4b** muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo la puntuación de Ashcroft de las muestras comparado con el tratamiento con control de isotipo, demostrando que la patología fibrótica de los ratones tratados con Ab535 había mejorado.

La **Figura 4c** muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo la cantidad de albúmina en el fluido de BAL comparado con el tratamiento con

control de isotipo, lo que demuestra una mejora en la permeabilidad vascular y la integridad de la barrera pulmonar de los ratones tratados con Ab535.

Figure 4d muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo el número de macrófagos en el fluido de BAL.

- 5 **Figure 5** muestra imágenes representativas del análisis histopatológico de los pulmones de animales tratados con control con solución salina, control de bleomicina más isotipo y bleomicina más Ab 535. Los animales tratados con Ab 535 tuvieron una reducción significativa de la fibrosis pulmonar comparada con los animales tratados con control de isotipo y bleomicina.

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

10 **ratón deficiente en adenosina desaminasa**

- La adenosina es un nucleósido de señalización potente, cuyos niveles aumentan cuando las células sufren estrés o daños y se produce una amplia variedad de respuestas cuando la adenosina involucra sus receptores específicos acoplados a proteínas G. La adenosina desaminasa (ADA) es una enzima de catabolismo de las purinas que convierte la adenosina en inosina. Los ratones con deficiencia en ADA se han generado y han mostrado tener niveles mayores 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 una enfermedad pulmonar crónica, como por ejemplo la destrucción alveolar, la inflamación de las vías respiratorias y la producción excesiva de moco, las cuales están asociadas con un aumento en los niveles de la adenosina en el pulmón (Blackburn MR et al, 2000, J Exp Med, 192: 159-70). Los efectos son tales que los ratones mueren antes de las tres semanas de edad debido a dificultades respiratorias. La administración de ADA exógena por medio de un régimen de dosis baja reduce los niveles de adenosina y extiende la vida útil de estos ratones, permitiendo el desarrollo de 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 está asociada con un aumento de los mediadores profibróticos, incluyendo TGFb-1 en los pulmones, aumento de la deposición de colágeno en el tejido pulmonar y aumento de la patología pulmonar fibrótica. Para investigar el efecto de las moléculas con potencial antifibrótico, los ratones con deficiencia en ADA se mantienen en un régimen de dosis baja de ADA exógena por varias semanas; luego, se para el tratamiento con ADA y se administra el agente antifibrótico potencial.

El efecto del anticuerpo anti-CSF-1R Ab535 se investigó en el modelo de fibrosis pulmonar de ratón deficiente en ADA. En este modelo, los ratones con deficiencia de la enzima se mantuvieron en terapia de la enzima ADA desde el día 1 al 21 después de su nacimiento. Se preparó un conjugado de ADA-poli(etilenglicol) (PEG) (Young HW et al, 2004, J Immunol 173: 1380-89) y se administraron inyecciones intramusculares en los días 1, 5, 9, 13 y 17 después de nacidos (0,625, 1,25, 2,5, 2,5 y 2,5 unidades respectivamente), seguidas de 5 unidades inyectadas por vía intraperitoneal el día 21. No se administraron más enzimas después del día 21. El Ab535 se dosificó por vía subcutánea a 30 mg/kg en un volumen de 100 µl tres veces por semana a partir del día 25 (después del nacimiento) hasta que los animales fueron sacrificados el día 42.

Los animales fueron sacrificados en el día 42 y las lecturas incluyeron el análisis histopatológico de los pulmones, la celularidad del líquido de BAL (lavado broncoalveolar) y la cuantificación del colágeno soluble en el fluido BAL. Se realizó un análisis histopatológico para anotar el daño pulmonar usando 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 25cm y se procesaron por medio de una serie de alcoholes y xileno, incrustados en secciones de parafina y tejido y desparafinados antes de su procesamiento y coloración con tricómico de Masson.

La cantidad de colágeno soluble en fluido de BAL también se evaluó usando un kit de ensayo Sircol disponible en el mercado, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El efecto sobre la población de macrófagos en el fluido de BAL se determinó usando preparaciones de Cytospin. Las alícuotas de células BAL se centrifugaron en portaobjetos de microscopio, se coloraron con Diff-Quick y se contaron los macrófagos.

Se encontró que el tratamiento terapéutico con el anticuerpo Ab53 anti-CSF-1R 5 redujo significativamente la fibrosis pulmonar en ratones con deficiencia en ADA. Los ratones tratados presentaban una producción de colágeno reducida, una patología fibrótica mejorada y una mejor función y protección de la barrera pulmonar.

La **Figura 6a** muestra que el tratamiento con Ab4535 de ratones con deficiencia de ADA con fibrosis pulmonar inducida redujo la concentración de colágeno del fluido de BAL comparado con el tratamiento con control de isotipo.

La **Figura 6b** muestra que el tratamiento con Ab535 de los ratones con deficiencia de ADA con fibrosis pulmonar inducida redujo la puntuación de Ashcroft de las muestras comparado con el

tratamiento con control de isotipo, demostrando que la patología fibrótica de los ratones tratados con Ab535 había mejorado.

La **Figura 6c** muestra que el tratamiento con Ab535 de los ratones con deficiencia de ADA con fibrosis pulmonar inducida redujo la cantidad de albúmina en el fluido de BAL comparado con el
5 tratamiento con control de isotipos, demostrando que la permeabilidad vascular y la integridad de la barrera pulmonar de los ratones tratados con Ab535 había mejorado.

Figure 6d muestra que el tratamiento con Ab535 de los ratones con deficiencia de ADA con fibrosis pulmonar inducida redujo el número de macrófagos en el fluido de BAL.

La **Figura 7** muestra imágenes representativas del análisis histopatológico del tejido pulmonar
10 de ratones deficientes en ADA y ratones salvajes tratados ya sea con Ab535 o un anticuerpo de control de isotipo (ratón IgG1). Las secciones de tejido pulmonar fueron teñidas con tricrómico de Masson. El tratamiento con Ab535 de los ratones con deficiencia de ADA redujo en gran medida la cantidad de tejido fibrótico y deposición de colágeno.

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

Reivindicaciones

1. Un inhibidor de la actividad del CSF-1R, para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica.
2. Un inhibidor de la actividad del CSF-1R conforme a la reivindicación 1, en donde el inhibidor es una entidad química pequeña (NCE).
3. Un inhibidor conforme a la reivindicación 1, en donde el inhibidor es un ácido nucleico.
4. Un inhibidor conforme a la reivindicación 1, en donde el inhibidor es un anticuerpo o un fragmento funcionalmente activo o un derivado del mismo.
5. Un inhibidor conforme a la reivindicación 4, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico.
6. Un inhibidor conforme a la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, scFv o un fragmento de unión al epítipo del mismo.
7. Un inhibidor conforme a cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está conjugado con una o más molécula(s) efectora(s).
8. Un inhibidor conforme a cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se une al CSF-1R.
9. Un inhibidor conforme a cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde la enfermedad fibrótica es fibrosis pulmonar idiopática (FPI).
10. Un inhibidor conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la enfermedad fibrótica es la esclerodermia.

11. Un inhibidor conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la enfermedad fibrótica es la fibrosis renal.
12. El uso de un inhibidor de la actividad del CSF-1R para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica.
13. El uso conforme a la reivindicación 12, en donde el inhibidor es una entidad química pequeña (NCE).
14. El uso conforme a la reivindicación 12, en donde el inhibidor es un ácido nucleico.
15. El uso conforme a la reivindicación 12, en donde el inhibidor es un anticuerpo o un fragmento funcionalmente activo o un derivado del mismo.
16. El uso conforme a la reivindicación 15, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico.
17. El uso conforme a la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, scFv o un fragmento de unión al epítipo del mismo.
18. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está conjugado con una o más molécula(s) efectora(s).
19. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en donde el anticuerpo se une a CSF-1R.
20. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 12-19 en donde la enfermedad fibrótica es fibrosis pulmonar idiopática (FPI).
21. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 12-19 en donde la enfermedad fibrótica es la esclerodermia.
22. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 12-19 en donde la enfermedad fibrótica es la fibrosis renal.

23. Un método para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la actividad del CSF-1R.
24. El método conforme a la reivindicación 23, en donde el inhibidor es una entidad química pequeña (NCE).
25. El método conforme a la reivindicación 23, en donde el inhibidor es un ácido nucleico.
26. El método conforme a la reivindicación 23, en donde el inhibidor es un anticuerpo o un fragmento funcionalmente activo o un derivado del mismo.
27. El método conforme a la reivindicación 26, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico.
28. El método conforme a la reivindicación 26 o la reivindicación 27, en donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, scFv o un fragmento de unión al epítipo del mismo.
29. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está conjugado con una o más molécula(s) efectora(s).
30. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 26-19, en donde el anticuerpo se une a CSF-1R.
31. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 23-30 en donde la enfermedad fibrótica es fibrosis pulmonar idiopática (FPI).
32. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 23-30, en donde la enfermedad fibrótica es la esclerodermia.

33. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 23-30 en donde la enfermedad fibrótica es la fibrosis renal.
34. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 23-33, en donde el inhibidor de la actividad del CSF-1R se administra en combinación con uno o más de los compuestos terapéuticamente activos.
35. El método conforme a la reivindicación 34, en donde el otro compuesto terapéuticamente activo es otro agente terapéutico antifibrótico.

REPRESENTACION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

UCB BIOPHARMA SPRL

domiciliado (s) 60 Allée de la Recherche, B-1070 Brussels,
en/of Belgium

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial e Intelectual, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta

REPRESENTATION

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial and Intellectual Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed

autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

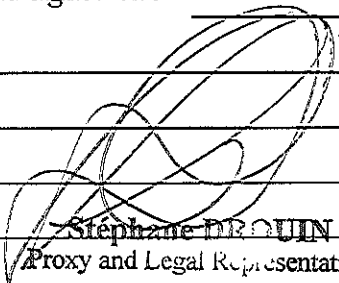
thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this

En/in

Por/by

Firma/Signature


Stéphane BROUIN
Proxy and Legal Representative

CAVELIER

ABOGADOS

Señor Director

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E.

S.

D.

Asunto :Solicitud de patente para **MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS**

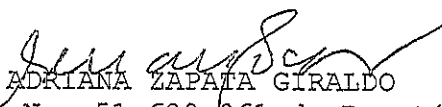
PCT/EP2014/068047

Solicitante :UCB BIOPHARMA SPRL

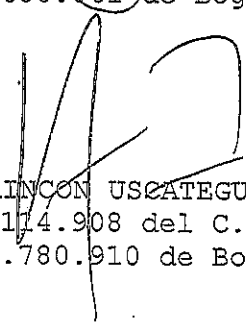
Yo, ADRIANA ZAPATA GIRALDO mayor de edad, vecina de esta ciudad, identificada con cédula de ciudadanía No. 51.680.061 de Bogotá, en mi calidad de representante legal de la sociedad CAVELIER ABOGADOS domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, en desarrollo de la representación que le fue otorgada por UCB BIOPHARMA SPRL, confiero poder a los doctores ANDRES RINCON USCATEGUI, identificado con cédula de ciudadanía No. 79.780.910 de Bogotá, portador de la tarjeta profesional No. 114.908, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 de Usaquén, portadora de la Tarjeta Profesional No. 23.555, JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL, identificado con la cédula de ciudadanía No. 16.209.380 de Cartago (Valle), portador de la Tarjeta Profesional No. 40.119 y EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY identificada con la cédula de ciudadanía No. 52.006.265 de Bogotá, portadora de la Tarjeta Profesional No. 65.794, para presentar la solicitud de registro de la patente indicada en la referencia.

Los apoderados quedan facultados para interponer recursos, transigir, conciliar, desistir, cancelar, recibir, renunciar, sustituir y revocar las sustituciones, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Señor Director,


ADRIANA ZAPATA GIRALDO
C.C. No. 51.680.061 de Bogotá

Acepto:


ANDRES RINCON USCATEGUI
T.P.A. No. 114.908 del C.S.J.
C.C. No. 79.780.910 de Bogotá

MMS\SDC\COLO-22392-841-004-0

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Skoki - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 852 - Tel: (57-4) 520 4760 / (57-4) 326 0789 / (57) 317 365 8663 / (57) 318 532 2365- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCB Biopharma SPRL

<120> MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD FIBRÓTICA

<130> G0180-PCT

<150> GB1315486.9

<151> 2013-08-30

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 972

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de CSF-1R humano

<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 de CSF-1R adecuada para su 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

Resumen

La presente invención hace referencia general a los métodos de tratamiento de la enfermedad fibrótica y, más específicamente, a un inhibidor de la actividad del CSF-1R para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica, en donde el inhibidor comprende una entidad química pequeña (NCE), un ácido nucleico o un anticuerpo o un fragmento funcionalmente activo o derivado del mismo. La presente invención también se refiere al uso de un inhibidor de la actividad del CSF-1R para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad fibrótica.

Fig. 2

Figura 7

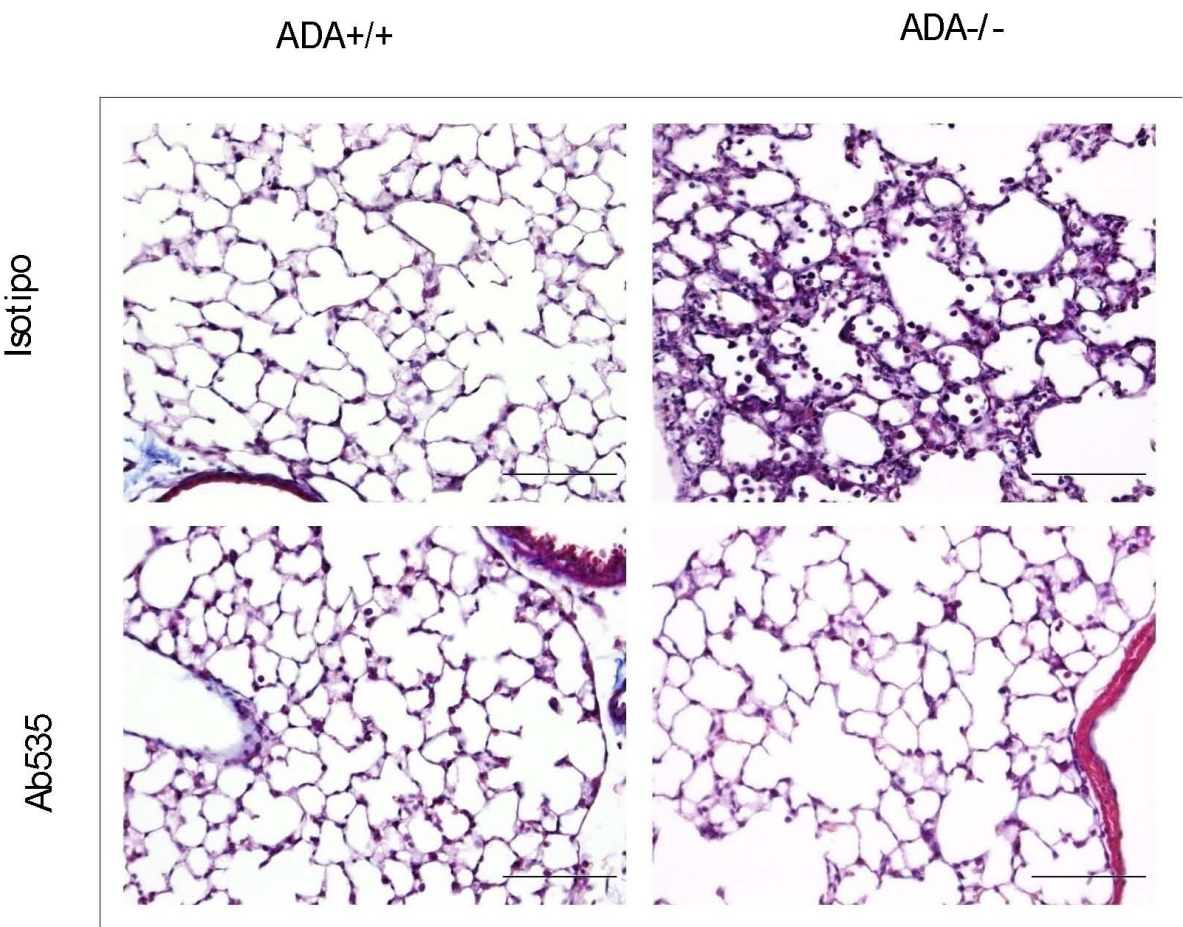
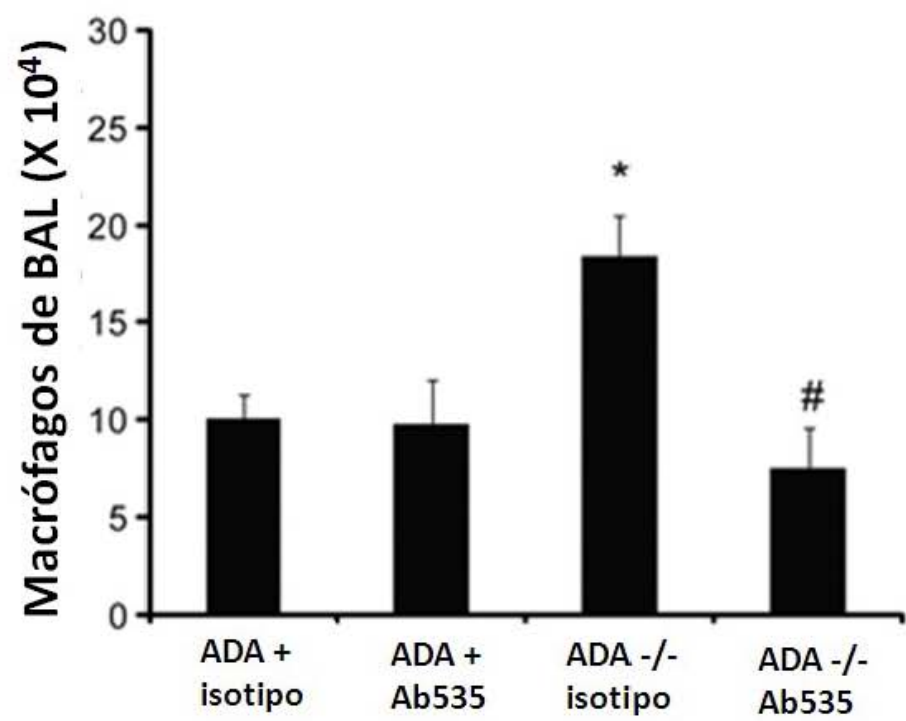


Fig 6d:



* Denota una diferencia significativa a ADA+ (tipo silvestre); # denota una diferencia significativa a los ratones ADA-/- tratados con anticuerpo de control de isotipos ($p \leq 0,05$).

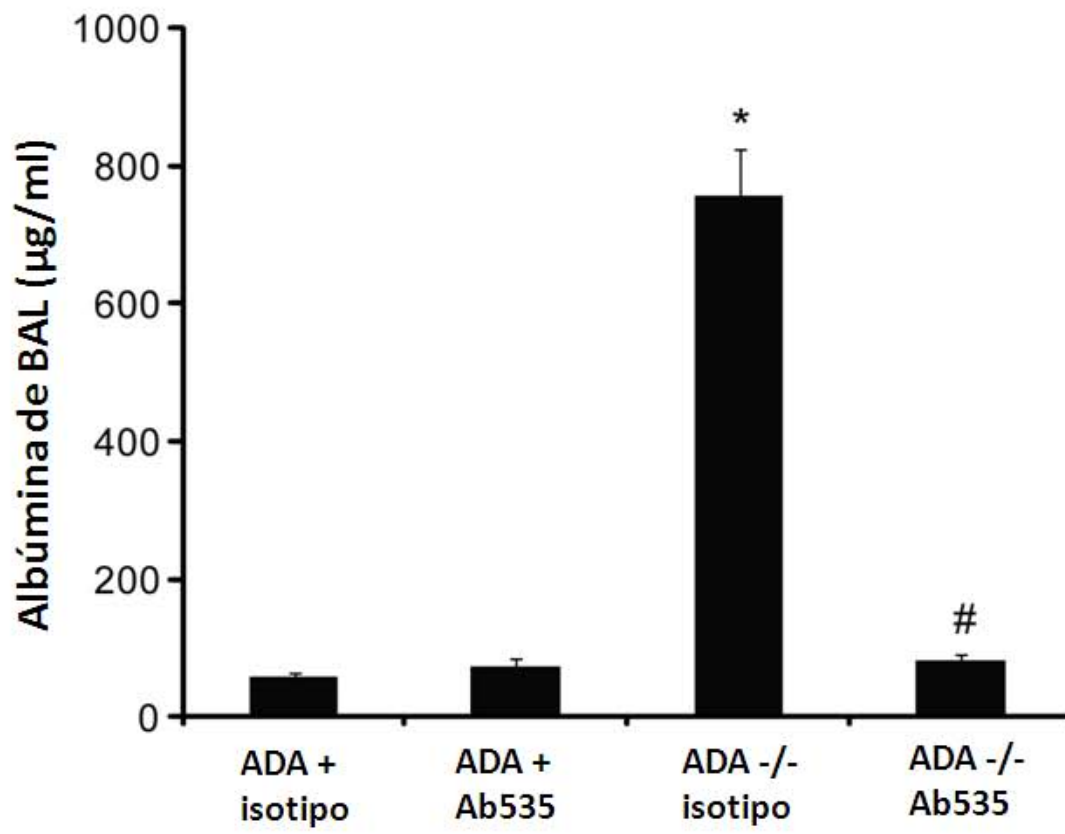
Figura 6c

Figura 6b

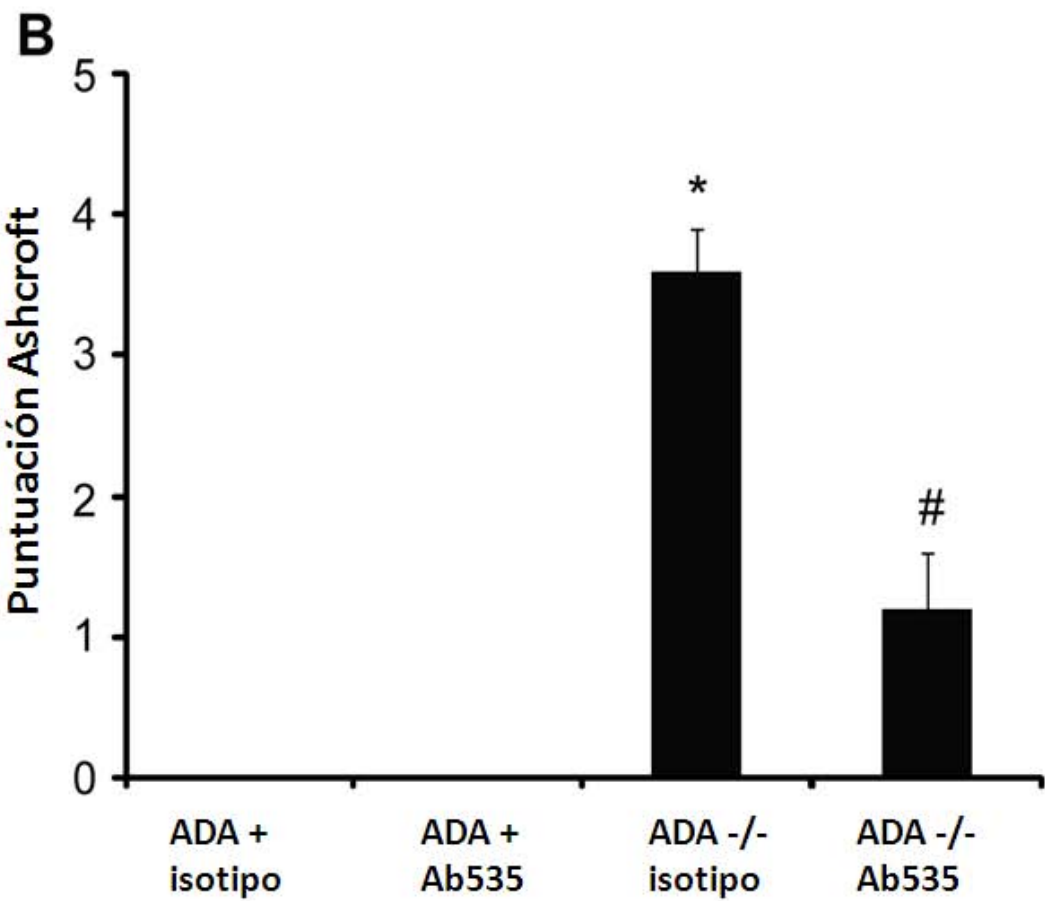


Figura 6a

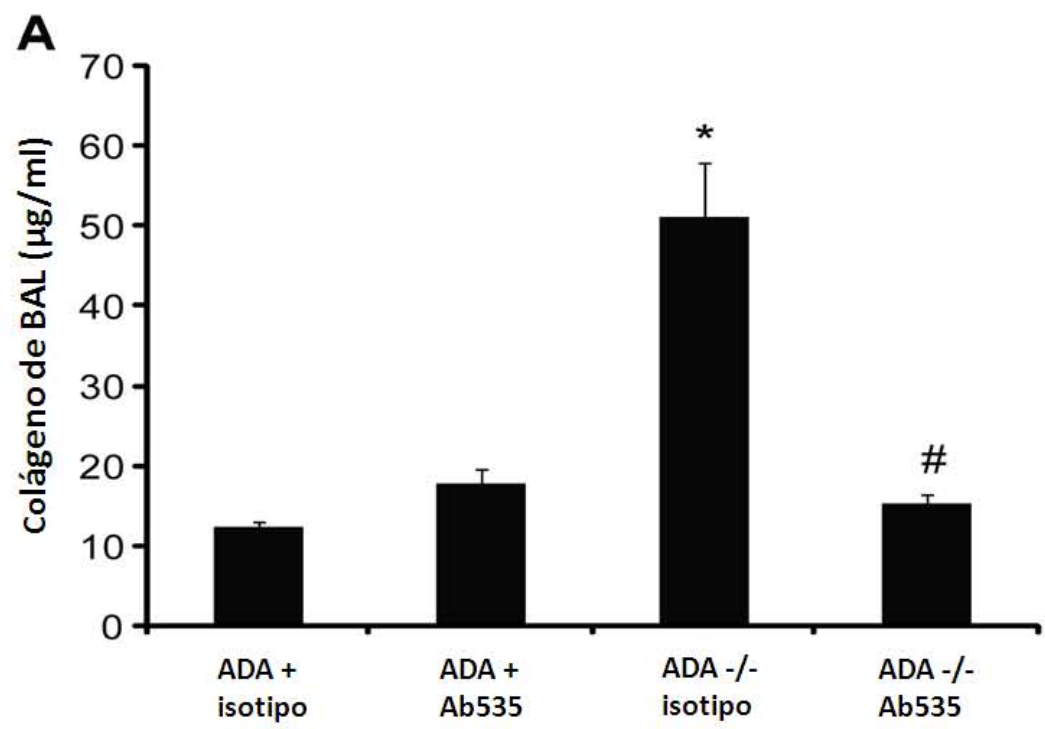


Figura 5

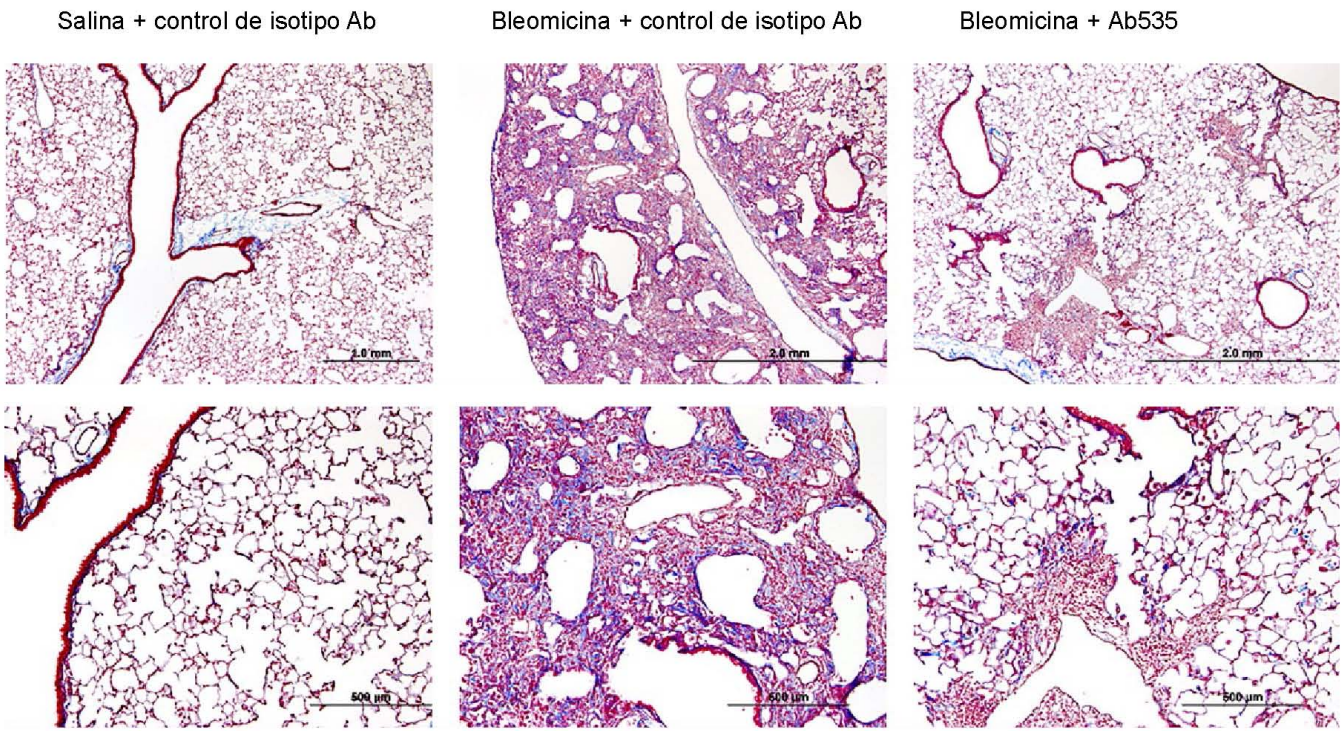


Fig 4d:

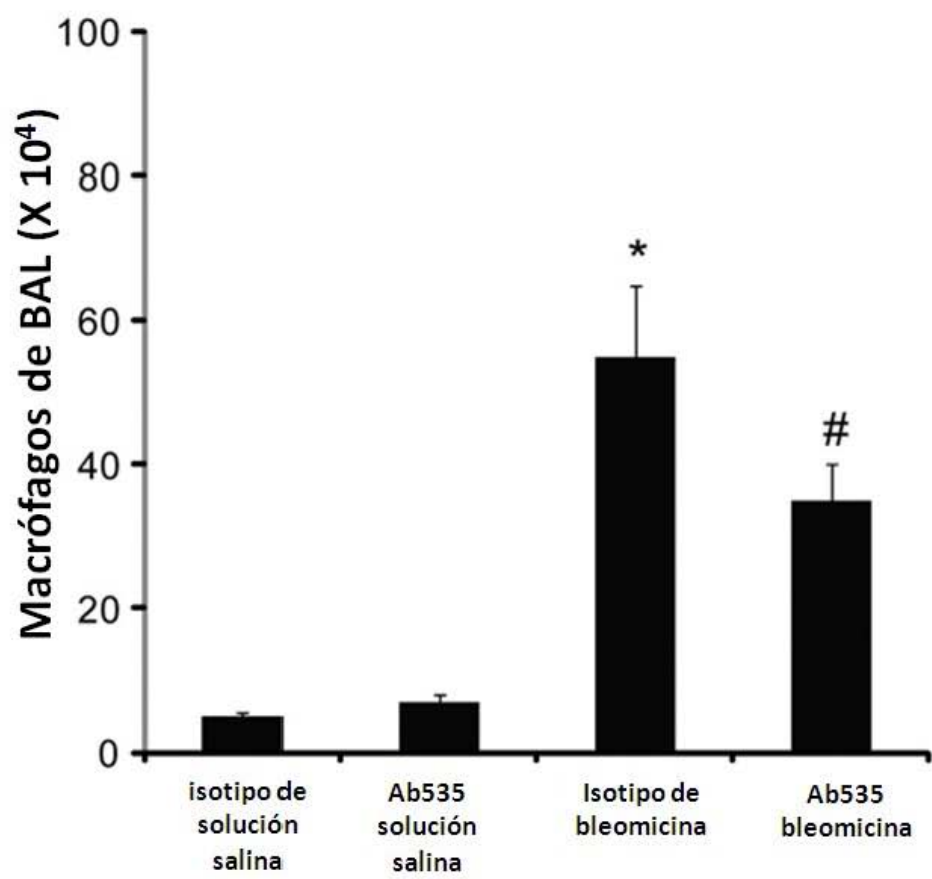


Figura 4c

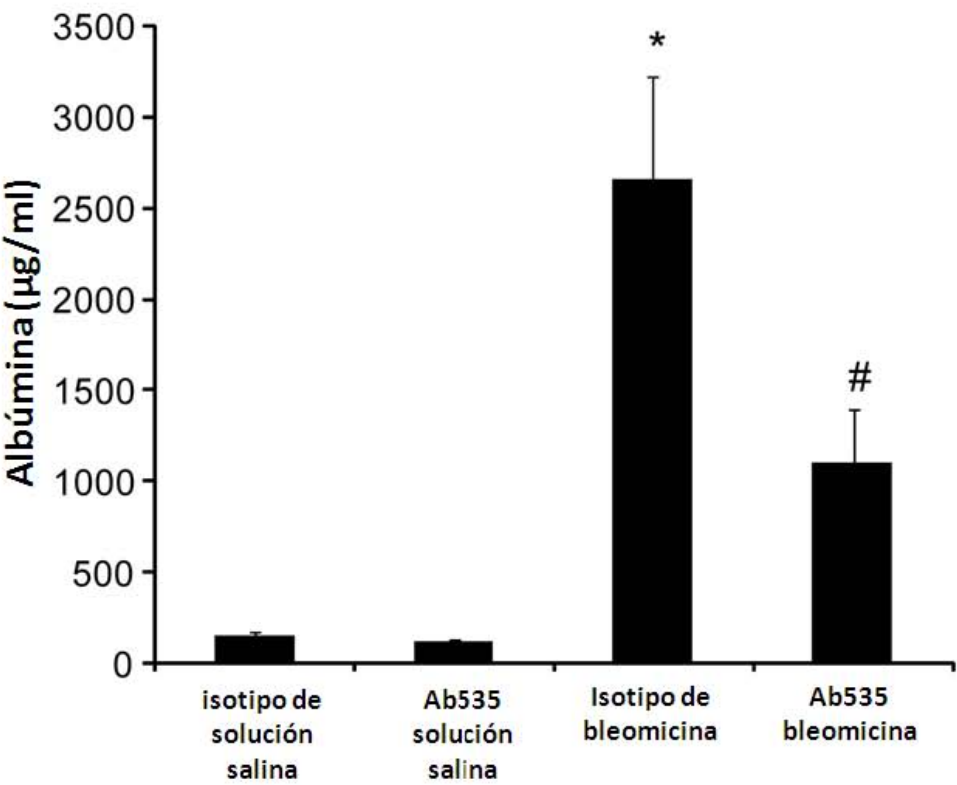


Figura 4b

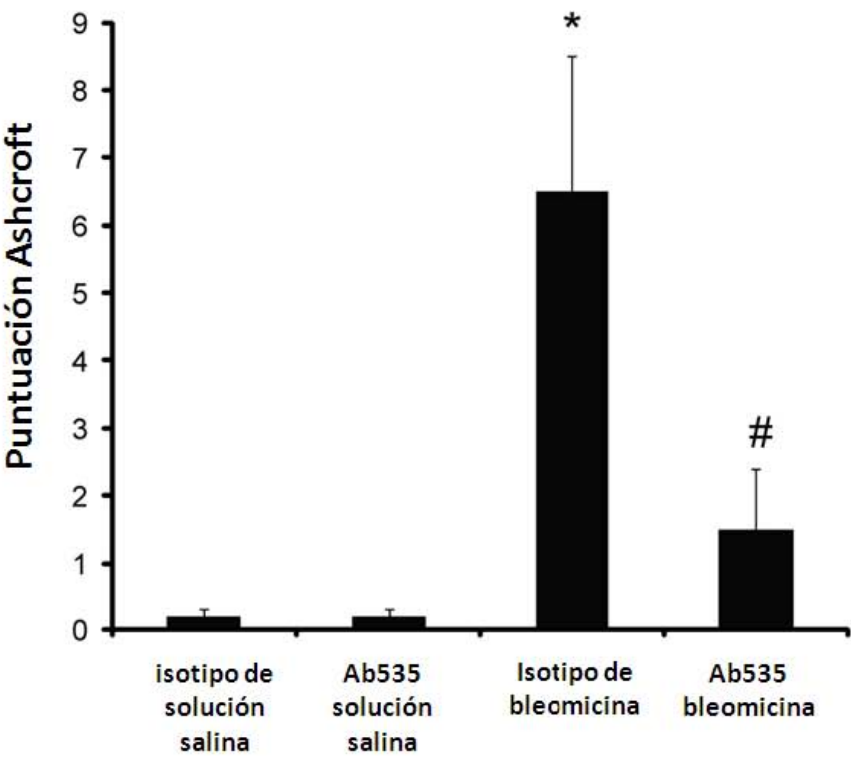


Figura 4a

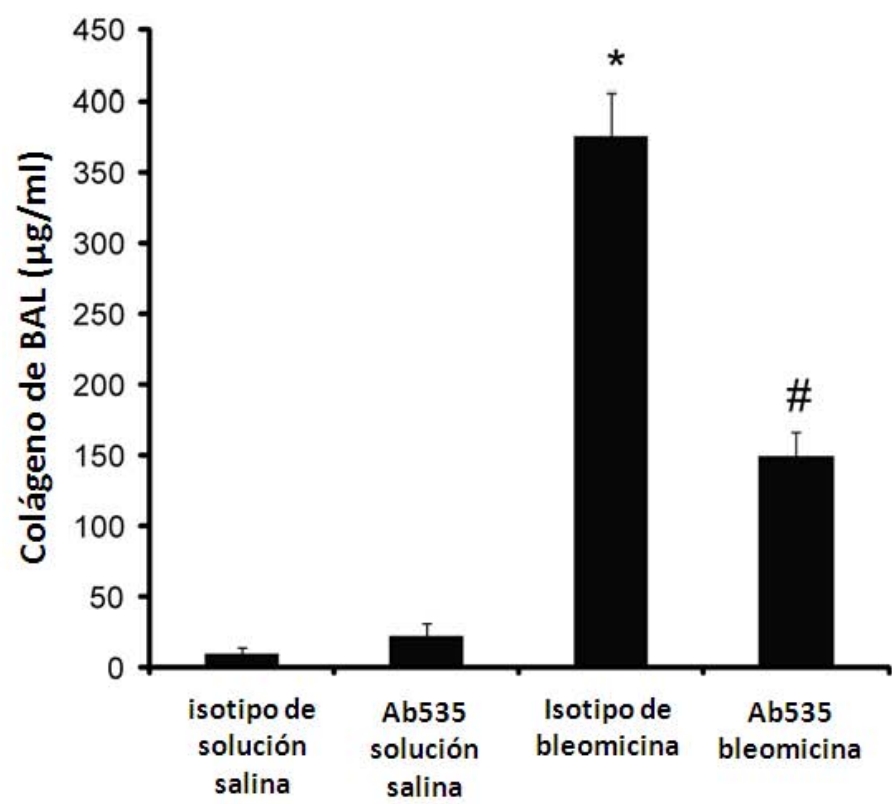


FIGURA 3

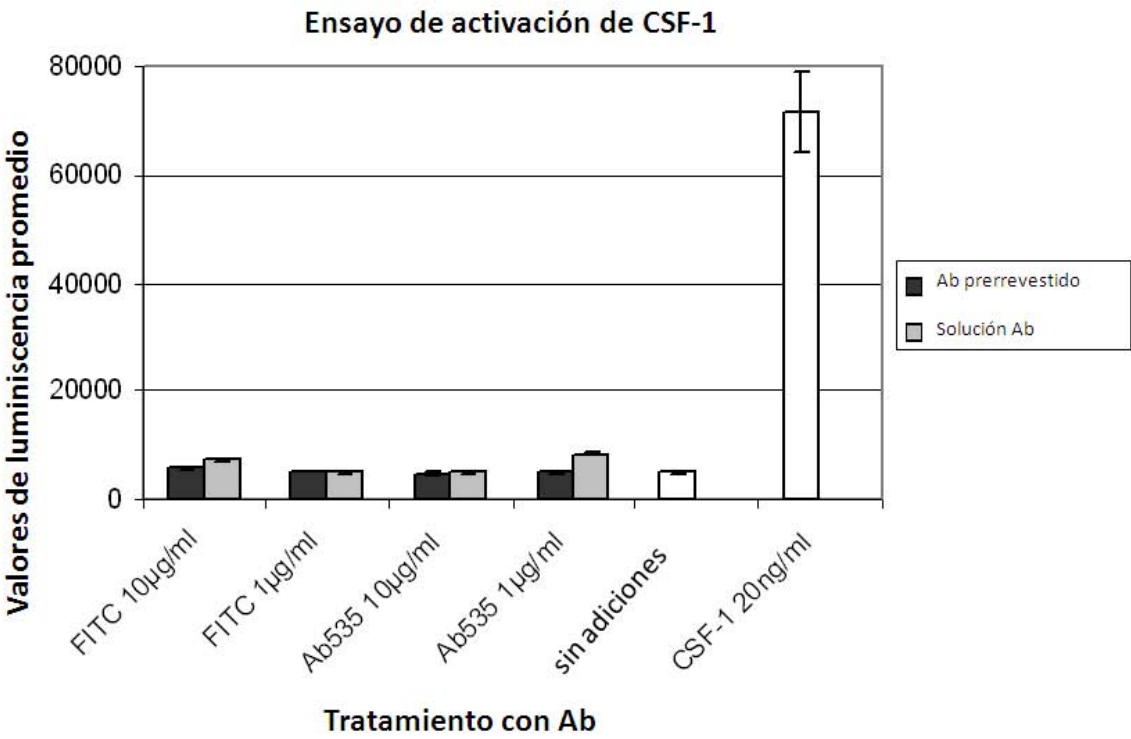
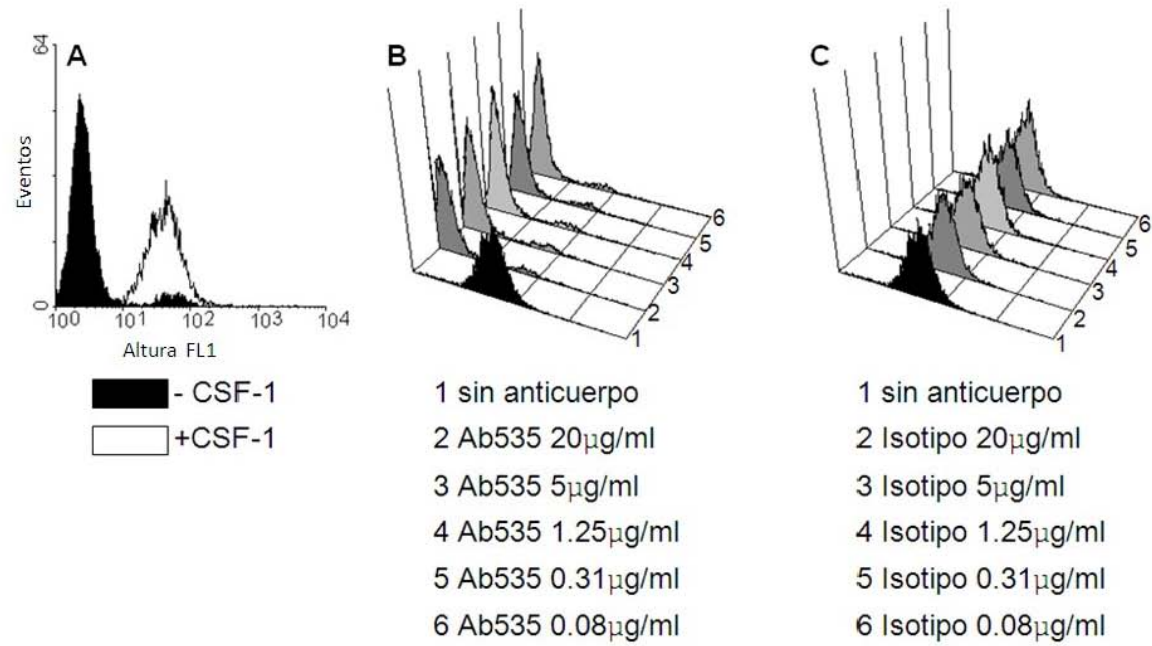


Figura 2



G0180-PCT

Figura 1B

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

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYR
CTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRP
LMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVQKVIPGPPALTLVPAE
LVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAIPQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
YSCVASNVQGHSTSMFFRVV

Secuencia de aminoácidos para CSF-1R (ENSP00000421174 49 aminoácidos) SEQ ID NO: 3

MRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVQK

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

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYR
CTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRP
LMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVQKVIPGPPALTLVPAE
LVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAIHQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
YSCVASNVOGHSTSMFFRVVESAYLNLSSEQNLIQEVTVGEGNLNKVMVEAYPGLQGFNWTYL
GPFSDHQPEPKLANATTKDITYRHTFTLSLPR LKPSEAGRYSFLARNPGGWRALTFELTLRYPPE
VSVIWT FINGSGTLLCAASGYPPQPNVTWLQCSGHTDR CDEAQLQVWDDPYPEVLSQEPFHKVT
VQSLT VETLEHNQTYECRAHNSVSGSGSWAFIPISAGATHPPDE

Figura 1C

Forma de CSF-1R adecuada para su expresión en una superficie celular SEQ ID NO: 5

MGPVLLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNGSVEW DGPPSPHWTLYSDGSSSILS
TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY VKDPARPWNV LAQEVVVFED QDALLPCLLT DPVLEAGVSL
VRVRGRPLMR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL MGGRKVMSSIS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA
ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDFVLQHN NTKLAIPQQS DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA
SNVQGHSTSMFFRVVESAY LNLSSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSHDHQPEPK
LANATTKDITY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIETF INSGTLLCA
ASGYPPQPNVT WLQCSGHTDR CDEAQLQVW DDPYPEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN QTYECRAHNS
VSGSGSWAFIP ISAGATHPP DE

Figura 1A

Secuencia de CSF-1R humano: SEQ ID NO: 1

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