

MÉTODO DE TRATAMIENTO PARA ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS

La presente invención se refiere, en general, a métodos para el tratamiento de enfermedades neurológicas y, más específicamente, a un anticuerpo anti-CSF-1 para el tratamiento de enfermedades neurológicas.

Existe una amplia variedad de enfermedades neurológicas asociadas a las respuestas neuroinflamatorias, siendo las más prominentes, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), el autismo, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, la meningitis, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, el accidente cerebrovascular, la lesión cerebral traumática o la epilepsia, la epileptogénesis y trastornos convulsivos y la convulsión en general.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, por su sigla en inglés) definen la epilepsia como un trastorno neurológico crónico, recurrente y repetitivo compuesto por fenómenos paroxismales causados por descargas excesivas y caóticas en las células neuronales del cerebro. Su incidencia tiene dos picos: uno en la niñez y la adolescencia y un segundo pico más marcado por encima de los 60 años de edad. De acuerdo con el Consejo Internacional para la Epilepsia (IBE, por su sigla en inglés), alrededor de 50 millones de personas

sufren de epilepsia en todo el mundo, donde el 20-30% de ellos sufre más de una crisis epiléptica por mes (Forsgren et al., Eur J Neurol 2005;12:245-53).

El número de nuevos casos de epilepsia por año en todo el mundo oscila entre 24 y 53 casos por cada 100.000 habitantes. En Europa, a partir de estudios de prevalencia llevados a cabo en diferentes países y años, se calculó que 0,9 millones de niños y adolescentes, 1,9 millones de adultos de 20 a 64 años de edad, y 0,6 millones de personas de más de 65 años de edad sufren de epilepsia (Forsgren et al., Eur J Neurol 2005;12:245-53).

Se considera que la epilepsia comprende un conjunto diverso de trastornos neurológicos crónicos caracterizados por crisis epilépticas. Estas crisis pueden ser recurrentes o no provocadas, o pueden constituir crisis individuales combinadas con alteraciones del cerebro que incrementan la posibilidad de futuras crisis. Las crisis epilépticas tienen como resultado, típicamente, una actividad neuronal anormal, excesiva o hipersincrónica en el cerebro.

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más comunes con una prevalencia de aproximadamente un 1% de la población global. De acuerdo con la definición más reciente provista por la Liga Internacional Contra la Epilepsia "una convulsión epiléptica es una ocurrencia transitoria de signos y/o síntomas debido a una actividad

neuronal excesiva o sincrónica en el cerebro” y “epilepsia es un trastorno del cerebro caracterizado por una predisposición permanente para generar crisis epilépticas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta afección.” (Fisher et al., 2014).

El conocimiento sobre las causas de la epilepsia ha evolucionado rápidamente desde la llegada de tecnologías de secuenciación del genoma entero y el creciente entendimiento del genoma humano. Además, los nuevos conceptos y tecnologías en la biología celular molecular y la genética han revolucionado nuestra comprensión de la patofisiología de la epilepsia. Actualmente, las técnicas de neuroimágenes nos permiten una comprensión sin precedentes de los circuitos y estructuras del cerebro implicados en la generación de las crisis y la progresión de la epilepsia. Finalmente, en las técnicas neurofisiológicas, tales como la electroencefalografía (EEG) o la electrofisiología in vitro brindan mayor información sobre el rol de las redes neuronales en la epilepsia.

Existen diferentes tipos de crisis y etiología de la epilepsia, por ejemplo, crisis generalizadas, crisis focales y crisis de origen desconocido. Las crisis focales son conceptualizadas como originadas en algún punto dentro

de las redes limitado a un hemisferio (que involucran a un área específica de la corteza cerebral), mientras que las crisis generalizadas son conceptualizadas como originadas en algún punto dentro de las redes bilateralmente distribuidas y de rápido acoplamiento (que involucran a toda la corteza cerebral) (Berg and Scheffer, 2011). La clasificación actual de las crisis por parte de la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) publicada por Berg et al., 2010 comprende a) crisis generalizadas, lo que significa en particular tónicas-clónicas (en cualquier combinación), ausencia (típica, atípica, ausencia con característica especial, ausencia mioclónica, mioclonia de párpados), mioclónicas (mioclónicas, atónicas mioclónicas, tónicas mioclónicas, clónicas, tónicas, atónicas), b) crisis focales con y sin afectación del conocimiento y la consciencia, y c) crisis de origen desconocido (espasmos epilépticos).

Las crisis focales sin afectación de la consciencia son i) con componentes motores o autonómicos. Esto corresponde generalmente al concepto de "convulsión parcial simple", donde "motor focal" y "autonómico" son términos que pueden transmitir adecuadamente este concepto dependiendo de las manifestaciones de la convulsión, o ii) implican fenómenos sensoriales y psíquicos subjetivos. Esto corresponde al concepto a un "aura".

Las crisis focales con afectación del conocimiento o la consciencia corresponden generalmente al concepto de "crisis parcial compleja" que evoluciona a crisis convulsivas bilaterales (que comprenden componentes tónicos, clónicos o tónicos y clónicos). Esta expresión reemplaza el término "crisis secundariamente generalizadas".

Asimismo, actualmente se han definido mejor los principales factores etiológicos: 1) causas genéticas: un resultado directo de un defecto(s) genético conocido o presunto en el cual las crisis son el síntoma principal del trastorno; 2) causas estructurales/metabólicas: una afección o enfermedad estructural o metabólica distinta que, según se ha demostrado, está asociada a un riesgo sustancialmente mayor de desarrollar epilepsia; 3) causas desconocidas, cuando la naturaleza de la causa subyacente no puede ser determinada (Berg and Scheffer, 2011).

Además, actualmente se están introduciendo nuevos conceptos sobre los procesos que conducen a la epilepsia, es decir, la epileptogénesis, y ellos demandan mayores esfuerzos de investigación en este campo. La epileptogénesis se refiere al desarrollo y extensión del tejido capaz de generar crisis espontáneas, que tienen como resultado (1) el desarrollo de una afección epiléptica y/o (2) la progresión una vez establecida la afección (Pitkänen

et al., (2013). La modificación de la enfermedad o del síndrome tiene dos componentes: antiepileptogénesis y modificación de la comorbilidad.

La antiepileptogénesis es un proceso que contrarresta los efectos de la epileptogénesis, que incluye prevención, modificación de las crisis y cura. Con respecto a la prevención, una prevención completa detiene el desarrollo de la epilepsia. Una prevención parcial puede demorar el desarrollo de la epilepsia o reducir su gravedad. Por ejemplo, se producen las crisis, pero pueden ser de menor frecuencia, más cortas o un tipo de crisis más suaves (modificación de las crisis). La antiepileptogénesis también puede prevenir o reducir la progresión de la epilepsia una vez que ha sido establecida. La Modificación de la Comorbilidad significa un tratamiento que alivia o invierte el desarrollo sintomático o la progresión de comorbilidades relacionadas con la epilepsia, tales como ansiedad, depresión, afectación somatomotora o disminución cognitiva.

Un tratamiento curativo se define como una reversión completa y permanente de la epilepsia, de modo tal que no se producen crisis después de la supresión del tratamiento (Pitkänen et al., 2013).

Se proponen nuevos métodos terapéuticos que apuntan a una modificación de la enfermedad en la epilepsia cuando el

agente modificador de la enfermedad se puede administrar antes o después de la aparición de epilepsia, puede prevenir o demorar el desarrollo de epilepsia. Cuando dicho tratamiento se administra después del diagnóstico de epilepsia, puede aliviar la gravedad de las crisis, prevenir o reducir la progresión de la epilepsia o cambiar las crisis de resistentes a los fármacos a sensibles a los fármacos.

Los conceptos terapéuticos anteriormente descriptos son fundamentalmente diferentes de la norma de cuidado habitual en la epilepsia, que incluye fármacos antiepilépticos (AEDs) dirigidos a mecanismos de excitabilidad neuronal y que, por lo tanto, proporcionan efectos anticonvulsivos. Estos fármacos no tratan las causas subyacentes o patofisiología de la epilepsia y el 30-40% de los pacientes con epilepsia padecen crisis descontroladas y comorbilidades asociadas a la enfermedad, a pesar de un impresionante arsenal terapéutico de más de 20 AEDs disponibles en el mercado.

Esto crea una necesidad médica importante no satisfecha aun de proporcionar fármacos más eficaces con propiedades modificadoras de la enfermedad neurológica.

Podemos apreciar que la inflamación cumple un rol indicativo en la patofisiología de la epilepsia y epileptogénesis humana. En particular, la activación de las

células microgliales está asociada a la inducción de vías pro-inflamatorias principales observadas en la epilepsia de lóbulo temporal humana (TLE), modelos experimentales de TLE y epileptogénesis. Esto es sugerido principalmente por un cambio de estudios llevado a cabo en tejidos del cerebro obtenidos tanto de pacientes como de modelos roedores con TLE, los cuales indican una fuerte estimulación de los genes asociados a las vías inmunes/inflamatorias, que incluyen varias quimiocinas y citoquinas proinflamatorias. Se supone que las células microgliales crónicamente activadas liberan citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF α , IL1b) que luego actúan e incrementan la excitabilidad neuronal y activa las crisis. Esto está mejor documentado para IL1b, que es capaz de exacerbar la actividad convulsiva en modelos experimentales, mientras que la disminución o inhibición de la producción de IL1b tiene efectos anticonvulsivos y puede modificar el curso de la enfermedad en modelos experimentales.

Sin embargo, los fármacos objetivo validados disponibles actualmente que controlan la actividad de la microglia son bastante dispersos y los métodos terapéuticos existentes se centralizan principalmente en entidades químicas (NCEs). Por ejemplo, Elmore et al., 2014, publicó un trabajo donde se utilizó un pequeño compuesto molecular (PLX3397) para inhibir el receptor del factor estimulante

de colonias 1 (CSF-1R) y brindó datos que confirman que este receptor es un regulador clave de la función y viabilidad de la microglia.

El factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) y la interleuquina-34 de molécula estructuralmente similar pero no relacionada con la secuencia (IL-34) son dos ligandos endógenos de CSF1R, que es expresado exclusivamente por macrófagos y microglia. 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. El CSF-1 está compuesto por dos polipéptidos "monoméricos", que forman una proteína de CSF-1 dimérica biológicamente activa. El CSF-1 existe en al menos tres formas maduras debido a empalme de ARN, procesamiento proteolítico de precursores y modificaciones postraduccionales que incluyen glicosilación y adición de proteoglicano (ver, 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 diversas formas de la proteína de CSF-1 incluyen dos moléculas secretadas, una que es glicosilada, la otra compuesta por una secuencia terminal amino más larga y modificación de proteoglicano. Otra variante es una molécula transmembrana (TM) que es glicosilada pero que no tiene partes proteoglicano. Esta

forma de membrana se puede quitar mediante escisión proteolítica para liberar una molécula soluble y activa. Todas las formas son producidas como polipéptidos precursores que tienen una secuencia señal de 32 aminoácidos en el término amino, una región transmembrana putativa de aproximadamente 23 aminoácidos cerca del término carboxilo y una cola COOH-terminal citoplásmica corta. Los péptidos precursores son procesados posteriormente por escisiones proteolíticas amino terminales o carboxi terminales para producir las formas maduras de CSF-1 con residuos 1-149 que son idénticos y que 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 pertenece a un grupo de agonistas biológicos que promueven la producción de células sanguíneas. Específicamente, actúa como factor de crecimiento, de diferenciación y de supervivencia para células progenitoras de médula ósea del linaje de fagocitos mononucleares. Además, el CSF-1 estimula la supervivencia, proliferación y función de macrófagos a través de un receptor específico en células respondedoras. Otros experimentos indicaron que el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) altera el fenotipo de la microglia humana adulta cultivada después de la biopsia de pacientes con TLE intratable (Smith et al., 2013). Otros

datos recientes indican que las mutaciones en el gen CSF-1R causan leucoencefalopatías difusas hereditarias que están asociadas a crisis y epilepsia (Rademakers et al., 2011; Guerreiro et al., 2013).

El receptor CSF-1 (CSF-1R) también se denomina producto del gen c-fms o CD115. El CSF-1R es una glicoproteína TM de tipo 1 de 165 kDa que pertenece a la familia de las tirosina quinasas del receptor tipo III. Además, el receptor CSF-1 es responsable de la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de células fagocíticas mononucleares, que incluyen la microglía. Los ratones que carecen de CSF-1 exhiben un número reducido de macrófagos en los tejidos periféricos. Lo que es más importante aún, los ratones deficientes de CSF-1R también carecen de microglia en el cerebro, lo cual está asociado a un fenotipo letal. De hecho, las células de la microglia son las únicas células del cerebro que expresan el CSF-1R bajo condiciones normales, aunque se han observado bajos niveles de CSF-1R en neuronas cultivadas. La fijación del ligando CSF-1 al CSF-1R tiene como resultado la fosforilación del receptor en uno o más residuos de tirosina, a través de la acción del dominio de tirosina quinasa. Esta fosforilación se puede detectar porque están disponibles anticuerpos que se fijan al receptor sólo después de la fosforilación (por ejemplo, anticuerpo Fosfo-

M-CSF-Receptor (Tyr546) #3083 de Cell Signaling Technology).

Los anticuerpos para el CSF-1R son conocidos en el arte. Sherr, C.J. et al., Blood 73 (1989) 1786-1793 describe anticuerpos contra CSF-1 R que inhiben la actividad del CSF-1 (Sherr, C.J. et al., Blood 73 (1989) 1786-1793). El documento WO 09/026303 divulga anticuerpos anti-CSF-1 que se unen al CSF-1R humano y modelos de tumores en ratón *in vivo* que utilizan un anticuerpo anti-CSF-1R murino. El documento WO 11/123381 divulga anticuerpos anti-CSF-1R que internalizan el CSF-1R y que tienen actividad ADCC. El documento WO 11/123381 divulga modelos de tumores en ratón *in vivo* que utilizan un anticuerpo anti-CSF-1R murino. El documento WO 11/140249 divulga anticuerpos anti-CSF-1R que bloquean la fijación del CSF-1 al CSF-1R, que se establecen como útiles en el tratamiento del cáncer. El documento WO 09/112245 divulga un anticuerpo IgG1 anti-CSF-1R que inhibe la fijación de CSF-1 al CSF-1R y se indica que es útil en el tratamiento del cáncer, de la enfermedad intestinal inflamatoria y de la artritis reumatoide. El documento WO 11/131407 divulga un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la fijación del CSF-1 al CSF-1R y se indica que es útil en el tratamiento de la pérdida ósea y del cáncer. El documento WO 11/107553 divulga un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la fijación

del CSF-1 al CSF-1R y se indica que es útil en el tratamiento de la pérdida ósea y del cáncer. El documento WO 11/070024 divulga anticuerpos anti-CSF-1R que se fijan al fragmento CSF-1R humano del D4. El documento WO 15/028455 divulga un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la fijación del CSF-1 al CSF-1R y se indica que es útil en el tratamiento de la fibrosis y del cáncer.

Sin embargo, aún existen severas limitaciones y problemas asociados a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) de moléculas biológicas grandes, como, por ejemplo, los anticuerpos. Hasta el momento, no se ha probado con éxito la modulación de la inflamación cerebral por grandes moléculas y anticuerpos. En cambio, se ha demostrado que etanercept, un receptor del TNF recombinante clínicamente utilizado fusionado al anticuerpo IgG1 no cruza la barrera hematoencefálica (BHE) y no afecta la inflamación provocada por el TNF- α en el cerebro después de la administración sistémica en roedores (Zhou et al., 2011). Aún existen dudas significativas sobre el potencial de efectos terapéuticos centralmente mediados de los anticuerpos sistémicamente inyectados, lo cual sería la vía de administración típica en la clínica. Esto resulta particularmente problemático para un anticuerpo anti-CSF1R, porque el CSF1R también se expresa en las células endoteliales de los capilares del cerebro y la activación

de este receptor por su ligando natural, IL-34, ha demostrado que restaura la integridad de la BHE y limita su permeabilidad (Jin et al., 2014).

En consecuencia, aún existe una necesidad médica no satisfecha aún de un tratamiento terapéutico y/o profilaxis mejorado, seguro y eficaz de la enfermedad neurológica. Por consiguiente, es objeto de la presente invención brindar un nuevo método de tratamiento de enfermedades neurológicas, más especialmente, de la epilepsia.

En un aspecto, la presente invención brinda un inhibidor de la actividad del CSF-1R para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas.

En un aspecto, el inhibidor de la presente invención es un ácido nucleico. En otro aspecto, el inhibidor de la presente invención es un anticuerpo, o fragmento o derivado funcionalmente activo de éste.

En un aspecto, la presente invención presenta resultados que indican que la inyección sistémica del anticuerpo anti-CSF-1R en un modelo animal de epilepsia de lóbulo temporal (TLE) es capaz de modular la función de la microglia, lo cual es evidenciado por un cambio en la expresión de los genes microgliales.

En consecuencia, los resultados presentados brindan una entidad biológica terapéutica viable y potente (NBE)

como inhibidor de la actividad del CSF-1R para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas.

Por lo tanto, la presente invención trata las necesidades no satisfechas aún y brinda un inhibidor de la actividad del CSF-1R para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas. La presente invención también brinda un inhibidor de la actividad del CSF-1R para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la epilepsia, la epileptogénesis, las crisis epilépticas y las convulsiones.

En un aspecto de la presente invención se brinda el uso de un inhibidor de la actividad del CSF-1R, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas.

La presente invención también brinda una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la actividad del CSF-1R. Además, la presente invención brinda un método para el tratamiento y/o profilaxis de un sujeto humano que padece o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad neurológica, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la actividad del CSF-1R.

En una realización de la presente invención, el inhibidor de la actividad del CSF-1R provisto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas

es un ácido nucleico. En otro aspecto, el inhibidor de la presente invención es un anticuerpo, o fragmento o derivado funcionalmente activo de éste.

En la presente invención, el término "enfermedad neurológica" se refiere a las siguientes enfermedades: enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) síndrome de Angelman, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, espectro autista, trastorno bipolar, daño cerebral, lesión cerebral, tumor cerebral, síndrome de dolor central, atrofia central, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), dolor crónico, síndrome de dolor regional complejo, enfermedad de Creutzfeldt_Jakob, demencia, síndrome de Down, síndrome de Dravet, encefalitis, temblor esencial, ataxia de Friedreich, síndrome del cromosoma X frágil, síndrome de temblor/ataxia asociado al cromosoma X frágil (FXTAS), lesión de cabeza, cefaleas, herpes zoster, enfermedad de Huntington, hipoxia, encefalomielitis inmunomediada, espasmos infantiles, hipertensión intracraneal, enfermedad de Lafora, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Lennox-Gastaut, leucodistrofia, leucoencefalopatías con sustancia blanca evanescente, demencia de cuerpos de Lewy, lisencefalia, enfermedad de Lyme - secuelas neurológicas, megaloencefalia, meningitis, microencefalia, migraña, miniaccidente cerebrovascular (ataque isquémico

transitorio), enfermedad neuronal motora - ver esclerosis lateral amiotrófica, demencia multiinfarto, esclerosis múltiple, encefalopatía mioclónica de infantes, mioclono, manifestaciones neurológicas de SIDA, secuelas neurológicas de lupus, lipofuscinosis neuronal cerioidea, neuropatía, enfermedad de Niemann-Pick, síndrome de Ohtahara, enfermedad de Parkinson, enfermedades paraneoplásicas, esclerosis lateral primaria, enfermedades de Prion, leucoencefalopatía multifocal progresiva, parálisis supranuclear progresiva, encefalitis de Rasmussen, síndrome de piernas inquietas, síndrome de Rett, síndrome de persona rígida, apoplejía, ataque isquémico transitorio, lesión cerebral traumática, temblor, esclerosis tuberosa, enfermedad de Unverricht-Lundborg, epilepsia uncinada, síndrome de West, enfermedad de Wilson.

Los ejemplos preferidos de enfermedades neurológicas incluyen síndrome de Angelman, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, espectro autista, lesión cerebral, tumor cerebral, enfermedad de Creutzfeldt_Jakob, demencia, síndrome de Down, síndrome de Dravet, encefalitis, síndrome del cromosoma X frágil, síndrome de temblor/ataxia asociado al cromosoma X frágil (FXTAS), lesión de cabeza, herpes zoster, hipoxia, encefalomiелitis inmunomediada, espasmos infantiles, enfermedad de Lafora, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Lennox-Gastaut,

leucodistrofia, leucoencefalopatías con sustancia blanca evanescente, lisencefalia, enfermedad de Lyme - secuelas neurológicas, meningitis, esclerosis múltiple, encefalopatía mioclónica de infantes, mioclono, secuelas neurológicas de lupus, síndrome de Ohtahara, enfermedades de Prion, encefalitis de Rasmussen, síndrome de Rett, lesión cerebral traumática, esclerosis tuberosa, enfermedad de Unverricht-Lundborg, epilepsia uncinada o síndrome de West.

En la presente invención, el tratamiento de la enfermedad neurológica pertenece preferentemente a la epilepsia, epileptogénesis, trastornos epilépticos o convulsión.

Los ejemplos de síndromes epilépticos ordenados por edad al inicio son: período neonatal (epilepsia neonatal familiar benigna (ENFB), encefalopatía mioclónica temprana (EMT), síndrome de Ohtahara), infancia (epilepsia de la infancia con crisis focal migratoria, síndrome de West, epilepsia mioclónica de la infancia (EMI), epilepsia infantil benigna, epilepsia infantil familiar benigna, síndrome de Dravet, encefalopatía mioclónica en trastornos no progresivos), niñez (crisis febriles más (FS+), que pueden comenzar en la infancia, síndrome de Panayiotopoulos, epilepsia con crisis mioclónicas atónicas (previamente astáticas), epilepsia benigna con puntas

centrotemporales (EBPCT), epilepsia de lóbulo frontal nocturna autosómica dominante (ELFNAD), epilepsia occipital de la niñez de inicio tardío (tipo Gastaut), epilepsia con ausencias mioclónicas, síndrome de Lennox-Gastaut, encefalopatía epiléptica con puntas y ondas continuas, durante el sueño (CSWS)^b, síndrome de Landau-Kleffner (SLK), epilepsia de ausencia infantil (EAI)), adolescencia/adulthood (epilepsia de ausencia juvenil (EAJ), epilepsia mioclónica juvenil (EMJ), epilepsia con crisis tónico-clónicas generalizadas únicamente, mioclono epiléptico progresivo (MEP), epilepsia autosómica dominante con afectación auditiva (EADAA), otras epilepsias de lóbulo temporal familiar), relación menos específica con la edad (epilepsia focal familiar con focos variables (niñez a adulthood), epilepsias reflejo), constelaciones distintivas (epilepsia de lóbulo temporal con o sin esclerosis hipocámpal (ELT con o sin EH), síndrome de Rasmussen, crisis gelásticas hamartoma hipotalámico, hemiconvulsión-hemiplejía-epilepsia, las epilepsias que no entran dentro de estas categorías de diagnóstico pueden distinguirse primero en base a la presencia o ausencia de una condición estructural o metabólica conocida (causa presumida) y luego en base al modo principal de inicio de la crisis (generalizada vs. focal)), epilepsias atribuidas a y organizadas por causas estructurales-metabólicas

(malformaciones del desarrollo cortical (hemimegaloncefalia, heterotopías, etc.), síndromes neurocutáneos (esclerosis tuberosa compleja, Sturge-Weber, etc.), tumor, infección, traumatismo, angioma, insultos perinatales, apoplejía), epilepsias de causa desconocida y condiciones con crisis epilépticas que tradicionalmente no son diagnosticadas como forma de epilepsia *per se* (crisis neonatales benignas (CNB), crisis febriles (CF)).

En una realización más preferida, la presente invención brinda un inhibidor para uso en el tratamiento y/o profilaxis de la epilepsia donde el tipo de epilepsia se selecciona entre el grupo que comprende crisis generalizadas, crisis focales y crisis de origen desconocido. En una realización más preferida, la presente invención brinda un inhibidor para uso en el tratamiento y/o profilaxis de la epilepsia de lóbulo temporal (TLE).

El término "actividad del CSF-1R" tal como se utiliza en la presente se refiere al espectro de actividad entendida en el arte para el CSF-1R, en particular, la actividad del CSF-1R humano y sus isoformas, por ejemplo, 1, 2, 3 o todas las isoformas. Por ejemplo, la unión del ligando con el 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 posterior cascada de eventos de transducción de señales

pueden mediar la migración, sobrevida, diferenciación y proliferación celular (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 células transfectadas de moléculas del receptor CSF-1R mutantes que comprenden residuos de fenilalanina en lugar de residuos de tirosina seleccionados revelaron la asociación de residuos de tirosina específicos con resultados celulares tales como sobrevida, proliferación y morfología (Yu et al J Leukoc Biol 2008 Sep 84(3): 852-863). Los métodos proteómicos y las técnicas de inmunotransferencia que utilizan anticuerpos anti-fosfotirosina junto con anticuerpos específicos de las moléculas, han identificado una serie de moléculas intracelulares implicadas en la mediación de estas funciones celulares luego de la estimulación del ligando 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.

Un inhibidor de la actividad del CSF-1R de acuerdo con la presente invención es un agente que interfiere, por ejemplo, reduce/inhíbe, bloquea o compite con la actividad del CSF-1R, en particular la actividad del CSF-1R en una enfermedad neurológica. Se prefieren particularmente los agentes que interfieren con la actividad del CSF-1R en la

enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la epilepsia, la epileptogénesis, las crisis epilépticas y las convulsiones. Los inhibidores de acuerdo con la presente invención pueden inhibir parcial o totalmente la actividad del CSF-1R. Los inhibidores que se utilizan en la presente invención incluyen, sin limitación alguna, inhibidores que son capaces de interactuar con (por ejemplo, unirse a o reconocer) 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 son capaces de inhibir la expresión de IL-34, CSF-1 o CSF-1R, o son capaces de inhibir la interacción entre CSF-1R y CSF-1 y/o IL-34. Dichos inhibidores pueden ser, sin limitación alguna, anticuerpos, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, ARN antisentido y ARNsi), carbohidratos, lípidos, proteínas, polipéptidos, peptidomiméticos y otros fármacos.

Los ejemplos de inhibidores adecuados incluyen, sin carácter limitativo, un fragmento funcional sintético del receptor CSF-1R que se une al CSF-1 e interfiere con la fijación al receptor CSF-1R nativo, un fragmento funcional sintético de CSF-1 que se une al receptor CSF-1 e interfiere con la unión al receptor CSF-1 nativo, un fragmento funcional sintético de IL-34 que se une al receptor CSF-1 e interfiere con la unión al receptor CSF-1 nativo, un anticuerpo que se une al CSF-1 o IL-34 o al

receptor CSF-1 e interfiere con la interacción receptor CSF-1-ligando, una molécula de ácido nucleico antisentido que se hibrida específicamente al ARNm que codifica CSF-1, IL-34 o el receptor CSF-1 u otro fármaco que inhibe la actividad de IL-34, CSF-1 o CSF-1R.

Los inhibidores de la actividad del receptor CSF-1 son conocidos en el arte como métodos para identificar y producir dichos inhibidores. La neutralización de anticuerpos anti-CSF-1 ha sido descripta, por ejemplo, por Weir *et al.*, 1996, J Bone Miner. Res. 11, 1474-1481 y Haran-Ghera *et al.*, 1997, Blood, 89, 2537-2545, que también describen anticuerpos anti-CSF-1R. También se han descrito antagonistas antisentido de CSF-1R (EP 1223980).

Los agentes que pueden ser inhibidores adecuados se pueden seleccionar entre una variedad de agentes candidatos. Los ejemplos de agentes candidatos incluyen, sin carácter limitativo, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), carbohidratos, lípidos, proteínas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos y otros fármacos. Los agentes se pueden obtener utilizando cualquiera de los numerosos enfoques que encontramos en los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en el arte, que incluyen bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida o fase en solución paralelas espacialmente tratables; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución; el

método con bibliotecas "una perla un compuesto"; y los métodos con bibliotecas sintéticas que utilizan selección por cromatografía de afinidad. El enfoque con bibliotecas sintéticas es adecuado para bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de péptidos, oligómeros no peptídicos o bibliotecas de compuestos (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145; US 5.738.996 y US 5.807.683).

Los ejemplos de métodos adecuados basados en la descripción de la presente para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en el arte, 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. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell *et al*, 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; y Gallop *et al*, 1994, *J. Med. Chem.* 37:1233.

Las bibliotecas de compuestos se pueden presentar, por ejemplo, en solución (por ejemplo, Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412-421), o en perlas (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), escamas (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), bacterias (US 5,223,409), esporas (US 5,571,698; 5,403,484; and 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; Cwirla et al, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382; y Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222:301-310).

En un ejemplo, el inhibidor para utilizar en la presente invención puede ser un ácido nucleico. En particular, las moléculas de ácido nucleico de CSF-1, IL-34 o CSF-1R se pueden utilizar como moléculas antisentido, para alterar la expresión de sus polipéptidos respectivos uniéndose a los ácidos nucleicos complementarios. Los ácidos nucleicos de CSF-1, IL-34 o CSF-1R se pueden obtener utilizando técnicas de clonación estándares a partir, por ejemplo, de ADN genómico o ADNc, o se pueden sintetizar utilizando técnicas muy conocidas y disponibles comercialmente. Los ácidos nucleicos de CSF-1, IL-34 o CSF-1R pueden contener una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de CSF-1, IL-34 o CSF-1R. Las técnicas estándares conocidas por los expertos en el arte se pueden utilizar para introducir mutaciones, que incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. El ácido nucleico antisentido de acuerdo con la presente invención incluye un ácido nucleico de CSF-1, IL-34 o CSF-1R capaz de hibridarse en virtud de alguna secuencia complementaria a una parte de un ARN (preferentemente, ARNm) que codifica el polipéptido

respectivo. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una región codificadora y/o no codificadora de un ARNm que codifica dicho polipéptido. Con mayor preferencia, los ácidos nucleicos antisentido provocan como resultado la inhibición de la expresión del polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R. La presente invención también brinda un inhibidor de la actividad del CSF-1R para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un sujeto humano que padece o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad neurológica, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la actividad del CSF-1R, que es un ADN aislado, que comprende al menos ocho nucleótidos (por ejemplo, de 15 a 22 nucleótidos, como ser 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 22 nucleótidos) que son antisentido a un gen o ADNc que codifica un polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R.

En una realización, el inhibidor para utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad neurológica es un anticuerpo que interactúa con (es decir, se une o reconoce) CSF-1 o IL-34. En otra realización, el anticuerpo interactúa selectivamente con CSF-1 o IL-34. La expresión "interactúa selectivamente con (por ejemplo, reconoce o se une a)" significa que el anticuerpo tiene una mayor afinidad con los polipéptidos de CSF-1 o IL-34 que con otros polipéptidos. Los ejemplos de anticuerpos adecuados

son aquellos que inhiben la actividad de CSF-1 o IL-34 uniéndose a CSF-1 o IL-34 de tal forma que impide que sea biológicamente activo, por ejemplo, evitando la unión de CSF-1 o IL-34 con su receptor.

Una realización de la presente invención brinda un inhibidor para utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad neurológica, donde el anticuerpo o fragmento o derivados de él se unen al CSF-1R. Con mayor preferencia, un inhibidor para utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad neurológica es un anticuerpo que interactúa con (es decir, se une a o reconoce) el CSF-1R e inhibe la actividad del CSF-1R. En una realización, el anticuerpo interactúa selectivamente con el CSF-1R. La expresión "interactúa selectivamente con (por ejemplo, reconoce o se une a)" significa que el anticuerpo tiene una mayor afinidad con el polipéptido de CSF-1R que con otros polipéptidos. Los ejemplos de anticuerpos adecuados son aquellos que inhiben la actividad del CSF-1R uniéndose al CSF-1R de tal forma que impide que sea biológicamente activo.

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

En una realización, el inhibidor de la actividad del CSF-1R para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas de acuerdo con la presente

invención bloquea la unión del CSF-1 con el receptor CSF-1R.

El término "bloquear" tal como se utiliza en la presente, se refiere a bloquear físicamente como ser obstaculizar el receptor, pero también incluye cuando el anticuerpo o los fragmentos se unen a un epítipo que causa, por ejemplo, un cambio conformacional, lo que significa que el ligando natural con el receptor ya no se une (denominado, en la presente, bloqueo alostérico o inhibición alostérica). En una realización, los anticuerpos de la presente divulgación se unen a todos los isotipos de CSF-1R, por ejemplo, aquellos con variaciones en el dominio ECD, tales como V23G, A245S, H247P, V279M y combinaciones de dos, tres o cuatro de dichas variaciones. Tanto CSF-1 como IL-34 son ligandos para CSF-1R y los anticuerpos para utilizar en la invención preferentemente inhiben la actividad tanto de CSF-1 como de IL-34 en un tamiz celular funcional. Los anticuerpos para utilizar de acuerdo con la presente invención preferentemente tampoco causan la activación del CSF-1R y/o la internalización del CSF-1R.

Los ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo para bloquear el CSF-1R se describen en la presente en los ejemplos, ver Ejemplo 2.

BIACore es un ejemplo de un ensayo empleado para medir la cinética de unión, los ensayos ELISA o ensayos a base de

células que emplean monocitos o células THP-1 también pueden ser útiles. Tanto CSF-1 como IL-34 son ligandos para CSF-1R y el anticuerpo anti-CSF-1R puede bloquear la unión del CSF-1 o IL-34 o CSF-1R, pero preferentemente bloquea la unión tanto de CSF-1 como de IL-34 con el CSF-1R. El anticuerpo anti-CSF-1R preferentemente tampoco causa la activación del CSF-1R o internalización del CSF-1R. Los ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo para causar la activación del CSF-1R o internalización del CSF-1R se describen en los ejemplos, ver Ejemplo 2 que describe un ensayo que mide la proliferación dependiente del CSF-1.

Los polipéptidos de CSF-1, IL-34 o CSF-1R o las células que expresan dichos polipéptidos se pueden utilizar para producir anticuerpos que reconocen específicamente dichos polipéptidos.

Los polipéptidos de CSF-1, IL-34 o CSF-1R pueden ser polipéptidos "maduros" o fragmentos o derivados biológicamente activos de ellos. Preferentemente, el polipéptido de CSF-1 contiene aminoácidos 1-149 que, según se cree, son importantes para la actividad biológica.

El CSF-1R tal como se emplea en la presente se refiere a la proteína denominada CSF-1R (tal como se muestra en la SEQ ID NO: 11), isoformas de ella y fragmentos biológicamente activos de ella. La SEQ ID NO: 11 muestra la

secuencia de 972 aminoácidos entera del CSF-1R humano, donde los residuos 1-19 son el péptido señal predicho. Preferentemente, el polipéptido de CSF-1R contiene aminoácidos 20-517 del ser humano, que representa la región extracelular predicha de la secuencia de CSF-1R. Las formas alternativas de CSF-1R son conocidas. En una realización, el CSF-1R es proteína humana o una isoforma de ella. En general, un anticuerpo empleado en la presente invención estará dirigido al dominio extracelular del CSF-1R. El CSF-1R humano tal como se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO: 15) está registrado en la base de datos UniProt bajo el número P07333.

Los polipéptidos de CSF-1 y CSF-1R se pueden preparar a través de procesos conocidos en el arte a partir de la modificación genética de células huésped que comprenden sistemas de expresión o se pueden recuperar de fuentes biológicas naturales. En una realización, la secuencia que se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO: 15) se puede transfectar a una línea celular adecuada y el polipéptido se puede expresar en la superficie celular. El fragmento de aminoácido se puede fusionar a un anclaje GPI para facilitar dicha expresión. Las células luego se pueden emplear para inmunizar huéspedes.

En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Éstos se

utilizan indistintamente salvo que se especifique lo contrario. Los polipéptidos de CSF-1, IL-34 o CSF-1R en algunos casos pueden ser parte de una proteína más grande como ser una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada a un marcador de afinidad o similar.

Los anticuerpos generados contra estos polipéptidos se pueden obtener administrando los polipéptidos o células que los expresan a un animal, preferentemente un animal no humano, utilizando protocolos conocidos y de rutina, ver por ejemplo Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986. Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas o cerdos pueden ser inmunizados. Sin embargo, generalmente los preferidos son los ratones, los conejos, los cerdos y las ratas.

En una realización, el inhibidor provisto en la presente invención es un anticuerpo, o fragmento o derivado funcionalmente activo de él. En otra realización, el inhibidor provisto en la presente invención es un anticuerpo monoclonal o policlonal. En otra realización, el inhibidor provisto en la presente invención es un anticuerpo o fragmento o derivado de él, que es anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar a través de cualquier método conocido en el arte como ser la

técnica del hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today*, 4:72) y la técnica del hibridoma de EBV (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos para utilizar en la invención también pueden generarse utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales clonando y expresando ADNc de región variable de inmunoglobulina generado a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, a través de los métodos que se describen en Babcook, J. *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(15):7843-78481; WO 92/02551; WO 2004/051268 y WO 2004/106377.

El término "específico" tal como se emplea en la presente se refiere a un anticuerpo que sólo reconoce el antígeno para el cual es específico o un anticuerpo que tiene una afinidad de unión significativamente mayor con el antígeno para el cual es específico, en comparación con la unión a antígenos para los cuales no es específico, por ejemplo, una afinidad de unión al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces más alta.

Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que han sido

genéticamente modificados de modo tal que los genes de cadenas ligeras y pesadas están compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Estos anticuerpos quiméricos son proclives a ser menos antigénicos. Los anticuerpos bivalentes pueden producirse a través de métodos conocidos en el arte (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 (ver, por ejemplo, el documento WO 92/22853).

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "molécula de anticuerpo humanizada" se refiere a una molécula de anticuerpo donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDRs (incluso, si se desea, una o más CDRs modificadas) de un anticuerpo dador (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertado en un framework de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano) (Ver, por ejemplo, los documentos US 5.585.089, WO 91/09967). Para un análisis, ver Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998.

En una realización, en lugar de transferir la CDR entera, sólo se transfieren los residuos que determinan especificidad desde una o más CDRs que se han descripto

anteriormente al framework de anticuerpos humanos (ver, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). En una realización, sólo se transfieren los residuos determinantes de especificidad desde una o más de las CDRs que se han descripto anteriormente en la presente al framework de anticuerpos humanos. En otra realización, sólo se transfieren los residuos determinantes de especificidad desde cada una de las CDRs que se han descripto anteriormente en la presente al framework de anticuerpos humanos.

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las regiones framework no necesariamente tienen exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los residuos inusuales se pueden cambiar a residuos que ocurren con mayor frecuencia para esa clase o tipo de cadena aceptora. Alternativamente, los residuos seleccionados en las regiones framework aceptoras pueden cambiar de modo tal que coincidan con el residuo hallado en la misma posición en el anticuerpo dado (ver Reichmann et al., 1998, *Nature*, 332, 323-324). Estos cambios deben mantenerse en un grado mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo dador. Un protocolo para seleccionar residuos en las regiones framework aceptoras que pueden necesitar ser cambiados se establece en el documento WO 91/09967.

Cuando las CDRs o residuos determinantes de especificidad son injertados, se puede emplear cualquier secuencia framework de región variable aceptora apropiada teniendo en cuenta la clase/tipo de anticuerpo dador del cual derivan las CDRs, incluidas regiones framework de ratón, primate y humano.

Convenientemente, el anticuerpo humanizado tiene un dominio variable que comprende regiones framework aceptoras humanas, así como también una o más CDRs. Por lo tanto, en una realización se provee el bloqueo del anticuerpo humanizado que se une al CSF-1, IL-34 o CSF-1R humano, donde el dominio variable comprende regiones framework aceptoras humanas y CDRs dadoras no humanas.

Los ejemplos de frameworks humanos que se pueden utilizar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, *supra*). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden utilizar para la cadena pesada, REI se puede utilizar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden utilizar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente, se pueden utilizar secuencias de línea germinal humanas; éstas están disponibles en <http://www.imgt.org/>.

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las cadenas pesada y ligera aceptoras no necesariamente deben derivar del mismo anticuerpo y pueden comprender, si

se lo desea, cadenas compuestas que tienen regiones framework derivadas de diferentes cadenas.

Los anticuerpos para utilizar en la presente invención también se pueden generar utilizando varios métodos de exhibición de fagos conocidos en el arte e incluyen aquellos divulgados por Brinkman et al. (in J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames et al. (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177- 186), Kettleborough et al. (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic et al. (Gene, 1997 187 9-18), Burton et al (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) y WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401, y US 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 y 5.969.108. Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla, tales como los que se describen en el documento US 4.946.778, también se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla para polipéptidos de CSF-1, IL-34 o CSF-1R. Asimismo, se pueden utilizar ratones transgénicos, u otros organismos, incluidos otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados.

Una realización de la presente invención brinda un inhibidor de la actividad del CSF-1R que es un anticuerpo, o fragmento o derivado de él, que es biespecífico o

multiespecífico. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo que se utiliza en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas se puede seleccionar entre el grupo que comprende una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras enteras o un fragmento de ella seleccionado entre el grupo que comprende Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de un único dominio (por ejemplo, VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bivalentes, trivalentes o tetravalentes, Bis-scFv, dicuerpos, tricuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores (ver, 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 conocidos en el arte (ver, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para utilizar en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' que se describen en las solicitudes de patente internacional WO 2005/003169, WO 2005/003170 y WO 2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender especificidades múltiples, por ejemplo, pueden ser biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (ver, por

ejemplo, los documentos WO 92/22583, WO 05/113605, WO 2009/040562 y WO 2010/035012).

En una realización, el anticuerpo es provisto como proteína de fusión a anticuerpos de unión CSF-1, IL-34 o CSF_1R que comprende una parte de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento Fab o Fab', y uno o dos anticuerpos de un único dominio (dAb) unido directamente o indirectamente a él, por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO2009/040562, WO2010/035012, WO2011/030107, WO2011/061492 y WO2011/086091, todos ellos incorporados a la presente como referencia.

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

En una realización, el elemento Fab o Fab' de la proteína de fusión tiene la misma o similar especificidad para con el anticuerpo o anticuerpos de un único dominio. En una realización, el Fab o Fab' tiene una especificidad diferente para con el anticuerpo o anticuerpos de un único dominio, es decir, 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 a

albúmina, por ejemplo, un par VH/VL brinda un sitio de unión a albúmina.

Los fragmentos de anticuerpos y métodos para producirlos son conocidos en el arte, ver, por ejemplo, Verma et al, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181. Los ejemplos particulares de fragmentos de anticuerpos para uso en la presente invención son fragmentos Fab' que poseen una región bisagra nativa o una región bisagra modificada. Se han descrito una serie de regiones bisagra modificadas, por ejemplo, en los documentos US 5.677.425, WO99/15549, y WO98/25971 y éstos se incorporan a la presente como referencia. Otros ejemplos de fragmentos de anticuerpo particulares para uso en la presente invención incluyen los que se describen en las solicitudes de patente internacional PCT/GB2004/002810, PCT/GB2004/002870 y PCT/GB2004/002871 (todas ellas presentadas el 1 de julio de 2004). En particular, se prefieren los fragmentos Fab de anticuerpos modificados que se describen en la solicitud de patente internacional PCT/GB2004/002810.

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

En una realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3 y

la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, de estar presente, se pueden seleccionar teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular, las funciones efectoras que se requieran. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En particular, los dominios de región constante IgG se pueden utilizar, especialmente de los isotipos IgG e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 se pueden utilizar cuando la molécula de anticuerpo está destinada para fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos.

En una realización específica, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo IgG2 o IgG4. Podrá apreciarse que también se pueden utilizar las variantes de secuencias de estos dominios de regiones constantes. Por ejemplo, se pueden emplear las moléculas de IgG4 en las cuales la serina en la posición 241 se ha modificado a prolina tal como se describe en Angal *et al.*, 1993, *Molecular Immunology*, 1993, 30:105-108. Una única sustitución de aminoácido abole la heterogeneidad del

anticuerpo de ratón/humano quimérico (IgG4). Angal *et al.*, Mol. Immunol. **30**:105-108 describe un enfoque de mutagénesis dirigida al sitio para minimizar la formación de media molécula de anticuerpos IgG4. En este informe, una única sustitución de aminoácido dentro de la bisagra núcleo, S241P, tuvo como resultado sustancialmente menos formación de media molécula. En consecuencia, en la realización donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, el anticuerpo puede incluir la mutación S241P. Una inducción ADCC diferencial por diferentes isotipos de IgG depende de la afinidad de estos residuos con FcγRs. En los seres humanos, es sabido que IgG1 e IgG3 inducen las funciones efectoras mientras que IgG2 e IgG4 inducen las funciones efectoras débilmente. En una realización preferida, el anticuerpo que se utiliza en la presente invención es un anticuerpo IgG2 o IgG4 que induce las funciones efectoras débilmente, incluido ADCC. En particular, se prefiere que el anticuerpo que se utiliza para tratar enfermedades neurológicas en la presente invención tenga una limitada función efectora porque el uso de anticuerpo con función efectora puede causar una mayor depleción de células que expresan CSF-1R que tienen el potencial de añadir efectos secundarios en el paciente.

Los expertos en el arte también podrán comprender que los anticuerpos pueden someterse a una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y el grado de

estas modificaciones a menudo depende de la línea de células huésped utilizadas para expresar el anticuerpo, así como también de las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desaminación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de residuo básico carboxi-terminal (como ser lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (tal como se describe en Harris, RJ. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995). En consecuencia, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo puede estar ausente.

En otra realización, los inhibidores de la actividad del CSF-1R que se pueden utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas son un anticuerpo, o fragmento o derivado de él, que cruza la barrera hematoencefálica (BHE) alcanzando en el cerebro una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para el tratamiento y/o profilaxis de un paciente que padece una enfermedad neurológica.

La expresión "terapéuticamente eficaz" tal como se utiliza en la presente se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, reducir o evitar una enfermedad o afección meta, o exhibir un efecto terapéutico, farmacológico o preventivo detectable. Para

cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente ya sea en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, habitualmente roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también se puede utilizar para determinar el rango de concentración adecuado y la vía de administración. Dicha información luego se puede utilizar para determinar dosis útiles y vías de administración en los seres humanos.

La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, de la salud general del sujeto, de la edad, del peso y género del sujeto, de la dieta, del tiempo y de la frecuencia de administración, de la combinación(es) de fármacos, de las sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede ser determinada por experimentación de rutina y se encuentra dentro del criterio del médico. Por lo general, una cantidad terapéuticamente eficaz oscilará entre 0,01 mg/kg y 500 mg/kg, por ejemplo, entre 0,1 mg/kg y 200 mg/kg, como ser 100 mg/kg.

En otra realización, el inhibidor para utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas es un anticuerpo o fragmento o derivado de él y comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una CDR que

tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

La presente invención también brinda un inhibidor para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, donde el anticuerpo o fragmento o derivado de él comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de las CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para la CDR-L3.

En otra realización, el inhibidor para utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas es un inhibidor que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-H3, y donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en

la SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para la CDR-L3.

En otra realización, el inhibidor para utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas es un inhibidor donde la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9.

La presente invención también brinda un inhibidor para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas donde la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7.

La presente invención también brinda un inhibidor para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7.

En un aspecto de la presente invención, se brinda un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión o derivado de él, donde el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDRs y la secuencia de CDR-H1 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4, la secuencia de CDR-H2 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 y la secuencia de CDR-H3 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6.

Preferentemente, el anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión de éste adicionalmente comprende una cadena ligera, donde el dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDRs y la secuencia de CDR-L1 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, la secuencia de CDR-L2 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de CDR-L3 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3. En una realización, una región variable está provista de al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con una secuencia de región variable que se divulga en la presente.

El término "identidad" tal como se utiliza en la presente indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. El término "similitud" tal como se utiliza en la presente indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede ser sustituida por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que a menudo pueden ser sustituidos por otros incluyen, sin carácter limitativo:

- fenilalanina, tirosina and triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);

- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, the BLAST™ software available from NCBI (Altschul, S.F. *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. *et al.*, 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

En una realización de la presente invención, el inhibidor para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas es un inhibidor donde el anticuerpo o fragmento o derivado de él que tiene una afinidad de unión [K_D] con el CSF-1R humano de 10 pM o menos de 10 pM determinado de acuerdo con el método BIAcore.

En una realización de la presente invención, el inhibidor para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas es un inhibidor donde el anticuerpo, o fragmento o derivado de él, lleva a cabo un bloqueo cruzado de la unión de un anticuerpo anti-CSF-1R con una afinidad de [K_D] de 100 pM o menos, determinada de acuerdo con el método BIAcore.

El anticuerpo, o fragmento o derivado de él, de la presente invención tienen convenientemente una afinidad de unión alta. La afinidad se puede medir utilizando cualquier método conocido en el arte, incluidas técnicas tales como resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, BIAcore, que utilizan CSF-1R natural o recombinante aislado o una proteína de fusión/polipéptido adecuado. Por ejemplo, la afinidad se puede medir utilizando el dominio extracelular CSF-1R humano recombinante. El dominio extracelular CSF-1R humano recombinante que se utiliza puede ser un monómero. Convenientemente, las moléculas de

anticuerpo para utilizar en la presente invención tienen una afinidad de unión con el CSF-1R humano aislado de aproximadamente 1 nM o menos de 1 nM. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 500 pM o menos. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 250 pM o menos. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 200 pM o menos. En una realización, la presente invención brinda un anticuerpo anti-CSF-1R con una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o menos. En una realización, la presente invención brinda un anticuerpo anti-CSF-1R humanizado con una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o menos, preferentemente aproximadamente 10 pM o menos, preferentemente aproximadamente 5 pM o menos. En otra realización, la presente invención brinda un anticuerpo anti-CSF-1R humanizado con una afinidad de unión de unión de aproximadamente 100 pM o menos, preferentemente, de aproximadamente 10 pM o menos, con mayor preferencia, de aproximadamente 5 pM o menos.

Cuanto menor es el valor numérico de la afinidad, mayor es la afinidad del anticuerpo o fragmento con el antígeno.

En otra realización de la presente invención, el inhibidor para utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas es un inhibidor donde el anticuerpo o fragmento o derivado de él lleva a cabo un bloqueo cruzado de la unión uniendo el mismo epítipo que el anticuerpo que bloquea. Los ejemplos de ensayos de bloqueo cruzado se describen en el documento WO 15/028455.

La presente invención también brinda un inhibidor para utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas donde el anticuerpo o fragmento o derivado de él compite con el anticuerpo o fragmento o derivado de él de un anticuerpo anti-CSF-1R para unirse a un dominio extracelular de c-fms humano de la SEQ ID NO: 15.

El término "compite" cuando se utiliza en el contexto de proteínas de unión a antígenos (por ejemplo, proteínas de unión a antígenos neutralizantes o anticuerpos neutralizantes) que compiten por el mismo epítipo significa que la competencia entre proteínas de unión al antígeno se determina por medio de un ensayo en el cual la proteína de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpo o fragmento o derivado inmunológicamente funcional de él), bajo prueba, impide o inhibe la unión específica de una proteína de unión al antígeno de referencia (por ejemplo, un ligando, o un anticuerpo de referencia) a un antígeno común (por ejemplo, c-fms o un fragmento de éste). Se pueden utilizar

numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo de enzimas directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo competitivo de tipo sándwich (ver, por ejemplo, Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 2:242-253); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (ver, por ejemplo, Kirkland et al., 1986, *J Immunol.* 137:3614-3619), ensayo marcado directo de fase sólida, ensayo de tipo "sándwich" marcado directo de fase sólida (ver, por ejemplo, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA marcado directo de fase sólida que utiliza marcador I-125 (ver, por ejemplo, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); EIA directo con biotina-avidina de fase sólida (ver, por ejemplo, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); y RIA marcado directo (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J Immunol.* 32:77-82). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que tienen cualquiera de éstos, una proteína de unión al antígeno de prueba no marcada y una proteína de unión al antígeno de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en presencia de la proteína de unión al antígeno de prueba. Habitualmente, la proteína de unión al antígeno de prueba

está presente en exceso. Las proteínas de unión al antígeno identificadas por ensayo competitivo (proteínas de unión al antígeno competitivas) incluyen proteínas de unión al antígeno que se unen al mismo epítipo que las proteínas de unión al antígeno de referencia y proteínas de unión al antígeno que se unen a un epítipo adyacente en una posición lo suficientemente próxima al epítipo fijado por la proteína de unión al antígeno de referencia para que se produzca el obstáculo estérico. Habitualmente, cuando una proteína de unión al antígeno competitiva se presenta en exceso, inhibirá la unión específica de una proteína de unión al antígeno de referencia a un antígeno común al menos un 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. En algunos casos, la unión está inhibida al menos un 80%, 85%, 90%, 95% o 97% o más.

En una realización de la presente invención, el inhibidor para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas es un inhibidor que se une al epítipo del CSF-1R humano como inhibidor de un anticuerpo CSF-1R.

En una realización de la presente invención, el inhibidor para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas es un anticuerpo que se une al epítipo de CSF-1R humano.

Esta región o epítipo específico del polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R humano se puede identificar a través de cualquier método de mapeo de epítipos conocido en el arte en combinación con cualquiera de los anticuerpos provistos en la presente invención. Los ejemplos de dichos métodos incluyen selección de péptidos de longitudes variables obtenidos del CSF-1R para que se una al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño posible que se pueda unir específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos de CSF-1, IL-34 o CSF-1R se pueden producir sintéticamente o por digestión proteolítica del polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R. Los péptidos que se unen al anticuerpo se pueden identificar, por ejemplo, mediante análisis de espectrometría de masa. En otro ejemplo, se puede utilizar espectroscopia de RMN o cristalografía de rayos X para identificar el epítipo unido por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, se puede utilizar el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención, si se requiere, como inmunógeno para obtener anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítipo.

Las moléculas biológicas, tales como anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, otorgándole así a la molécula una carga neta

positiva o negativa. La cantidad de carga "observada" general dependerá de la secuencia de aminoácidos absoluta de la entidad, del medio ambiente local de los grupos cargados en la estructura 3D y de las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoeléctrico (pI) es el pH en el cual una molécula particular o superficie accesible al solvente de ésta no lleva ninguna carga eléctrica neta. En un ejemplo, el anticuerpo de CSF-1, IL-34 o CSF-1R y fragmentos pueden modificarse para que tengan el punto isoeléctrico apropiado. Esto puede conducir a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más robustas, en particular, perfiles de solubilidad y/o estabilidad adecuados y/o características de purificación mejoradas.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención brinda un anticuerpo de CSF-1, IL-34 o CSF-1R humanizado, modificado para que tenga un punto isoeléctrico diferente al del anticuerpo identificado originariamente. El anticuerpo puede, por ejemplo, ser modificado reemplazando un residuo de aminoácido, por ejemplo, reemplazando un residuo de aminoácido ácido por uno o más residuos de aminoácidos básicos. Alternativamente, se pueden introducir residuos de aminoácidos básicos o se pueden remover residuos de aminoácidos ácidos. Alternativamente, si la molécula tiene un valor de pI inaceptablemente alto se pueden introducir residuos ácidos a un pI menor, según lo requerido. Es

importante que al manipular el pI debe tenerse cuidado de retener la actividad deseada del anticuerpo o fragmento. Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo o fragmento modificado tiene la misma o sustancialmente la misma actividad que el anticuerpo o fragmento "no modificado".

Se pueden emplear programas tales como ** ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html, y <http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/dabim/compo-p.html>, para predecir el punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento. Alternativa o adicionalmente, el pI se puede medir utilizando cualquier técnica de laboratorio estándar.

Podrá apreciarse que la afinidad de los anticuerpos provistos por la presente invención se puede alterar utilizando cualquier método conocido en el arte. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpos de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada con CSF-1, IL-34 o CSF-1R. Dichas variantes se pueden obtener a través de una serie de protocolos de maduración de afinidad que incluyen mutación de las CDRs (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), barajado 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), exhibición de fagos (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256,

77-88, 1996) y PCR sexual (Crameri *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (*supra*) trata estos métodos de maduración de afinidad.

Si se desea, un anticuerpo para uso en la presente invención se puede conjugar con una o más moléculas efectoras. Una realización de la presente invención brinda un anticuerpo para utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, donde el anticuerpo o fragmento o derivado de él se conjuga con una o más moléculas efectoras.

Podrá apreciarse que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de dichas moléculas conectadas a fin de formar una única parte que se pueda adosar a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, esto se puede preparar a través de procedimientos químicos o de ADN recombinante estándares en los cuales el fragmento de anticuerpo está unido directamente o a través de un agente de acoplamiento con la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras con anticuerpos son conocidas en el arte (ver Hellstrom *et al.*, Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson *et al.*, eds., 1987, págs. 623-53; Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik *et al.*, 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83,

67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los que se describen en los documentos 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 se puede lograr utilizando procedimientos de ADN recombinantes, por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

El término "molécula efectora" tal como se utiliza en la presente incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otro anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, polímeros de origen sintético o natural, ácidos nucleicos y fragmentos de ellos, por ejemplo ADN, ARN y fragmentos de ellos, radionucleidos, en particular, radioyodo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos reporteros tales como compuestos fluorescentes o compuestos que se pueden detectar mediante espectroscopia de RMN o ESR.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, que las mate). Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, staurosporina, maitansinoides, spongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas,

hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de ellos.

Las moléculas efectoras también incluyen, sin carácter limitativo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina de platino(II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente, daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente, actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), calicheamicinas o duocarmicinas), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionucleidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}I , Lu^{177} , Bismuto ^{213} , Californio ^{252} , Iridio ^{192} y Tungsteno ^{188} /Renio ^{188} ; o

fármacos tales como, sin carácter limitativo, alquilfosfocolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, sin carácter limitativo, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, sin carácter limitativo, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, pseudomonas exotoxina, o difteria toxina, una proteína como ser insulina, factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógenos del tejido, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina, o, un modificador de la respuesta biológica como ser linfoquina, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por su sigla en inglés), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por su sigla en inglés), factor de crecimiento nervioso (NGF, por su sigla en inglés) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en diagnosis. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos

prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radioactivos, metales emisores de positrones (para uso en la tomografía de emisión de positrones) e iones de metales paramagnéticos no radioactivos. Ver, en general, la patente estadounidense No. 4.741.900 para iones de metal que se pueden conjugar con anticuerpos para uso en diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinoesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de danisilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y acuorina; y los nucleidos radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

En otro ejemplo, la molécula efectora puede incrementar la semivida del anticuerpo *in vivo* y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la administración de un anticuerpo a través de la barrera epitelial al sistema inmune. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de

unión a albúmina tales como los que se describen en el documento WO 05/117984.

En una realización, es ventajosa una semivida provista por una molécula efectora que sea independiente del CSF-1R.

Cuando la molécula efectora es un polímero, en general puede ser un polímero de origen sintético o natural, por ejemplo, un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena recta o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo, un homopolisacárido o heteropolisacárido.

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

Los ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) poli(vinilalcohol) de cadena recta o ramificada sustituidos o derivados de ellos, en especial, poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido como ser metoxipoli(etilenglicol) o derivados de ellos.

Los polímeros de origen natural específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glicógeno o derivados de ellos.

En una realización, el polímero es albúmina o un fragmento de ella, como ser albúmina de suero humana o un fragmento de ella.

El término "derivados" tal como se utiliza en la presente incluye derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede ser unirse directamente o a través de un segmento conector con el polímero. Podrá apreciarse que el residuo de dicho grupo formará parte, en ciertos casos, del producto como grupo conector entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variar según lo deseado, pero generalmente tendrá un peso molecular que oscila entre 500 Da y 50000 Da, por ejemplo, entre 5000 y 40000 Da como ser entre 20000 y 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse, en particular, en base al uso deseado del producto, por ejemplo, la capacidad para localizar ciertos tejidos tales como tumores o prolongar la semivida en circulación (ver Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Por lo tanto, por ejemplo, cuando el producto debe 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, por ejemplo, con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones donde el producto permanece en circulación, puede resultar ventajoso usar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo, que

tenga un peso molecular que oscile entre 20000 Da y 40000 Da.

Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, como ser un poli(etilenglicol) o, en especial, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado de ellos, y en especial, con un peso molecular que oscile entre aproximadamente 15000 Da y aproximadamente 40000 Da.

En un ejemplo, los anticuerpos que se utilizan en la presente invención se adosan a partes de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG se puede unir a través de cualquier grupo funcional de aminoácidos de cadena lateral o terminal amino disponible ubicada en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden originarse naturalmente en el fragmento de anticuerpo o pueden adaptarse en el fragmento utilizando métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, los documentos US 5.219.996, US 5.667.425, WO 98/25971, WO 2008/038024). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado donde la modificación es la adición en el extremo C terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos 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 al cual se puede adosar la molécula efectora. Se pueden utilizar múltiples sitios para adosar dos o más moléculas PEG.

Convenientemente, las moléculas PEG están covalentemente unidas a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero adosada al fragmento de anticuerpo modificado se puede unir covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína ubicado en el fragmento. La unión covalente será, generalmente, un enlace de disulfuro o en particular, un enlace de azufre-carbono. Cuando se utiliza un grupo tiol como punto de unión, se pueden utilizar moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo, derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína. Se puede utilizar un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímeros tal como se ha descrito anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo selectivo de tiol como ser un ácido α -halocarboxílico o éster, por ejemplo, yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Los materiales de partida se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente

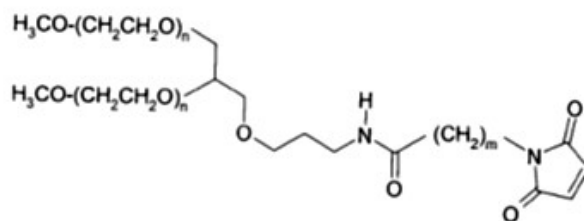
Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) o se pueden preparar a partir de materiales de partida disponibles comercialmente utilizando procedimientos químicos. Las moléculas PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (obtenida de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenido de Nektar, anteriormente Shearwater).

En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado, fragmento Fab' o diFab que es PEGilado, es decir, PEG (poli(etilenglicol)) covalentemente unido a él, por ejemplo, de acuerdo con el método que se divulga en el documento EP 0948544 o EP1090037 [ver 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, PEG está unido a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida covalentemente unido a un grupo tiol individual en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina

puede unirse covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina se puede unir a un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por lo tanto, el peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser aproximadamente 40.000 Da.

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

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

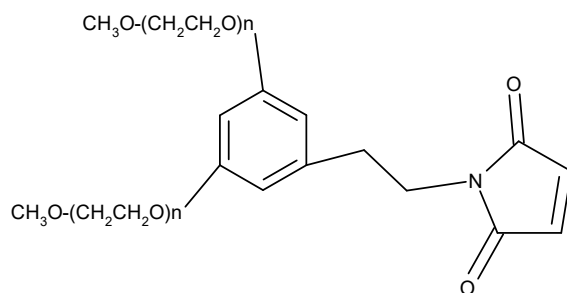


m es 2 ó 5

Es decir, cada PEG es aproximadamente 20.000 Da.

Por lo tanto, en una realización PEG es 2,3-bis(metilpolioxietilen-oxi)-1-[[3-(6-maleimido-1-oxohexil)amino]propiloxi] hexano (el PEG ramificado en 2 brazos, $-\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{-MAL}$, Mw 40.000 conocido como SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Otras moléculas efectoras PEG alternativas del siguiente tipo:



En una realización, se brinda un anticuerpo, como ser un anticuerpo de longitud total, que es PEGilado (por ejemplo, con un PEG que se describe en la presente), unido a través de un residuo de aminoácido de cisteína a o alrededor del aminoácido 226 en la cadena, por ejemplo, aminoácido 226 de la cadena pesada (mediante numeración secuencial).

En una realización, la presente divulgación brinda una molécula Fab'PEG que comprende uno o más polímeros PEG, por ejemplo, 1 ó 2 polímeros como ser un polímero o polímeros de 40 kDa. Las moléculas Fab-PEG de acuerdo con la presente divulgación pueden ser particularmente ventajosas ya que tienen una semivida independiente del fragmento Fc. En una realización, se brinda un scFv conjugado con un polímero, como ser una molécula PEG, una molécula de almidón o una molécula de albúmina. En una realización, el anticuerpo o fragmento está conjugado con una molécula de almidón, por ejemplo, para incrementar la semivida. Los métodos de conjugación comienzan con una proteína tal como se describe en el documento US 8.017.739 que se incorpora a la presente como referencia.

Para identificar la actividad del CSF-1R, los expertos en el arte pueden tener en cuenta una serie de enfoques diferentes. En un ejemplo, los inhibidores son identificados identificando primero los agentes que interactúan con el CSF-1, IL-34 o CSF-1R y posteriormente evaluando a estos agentes para identificar aquellos que inhiben la actividad del CSF-1R. En un ejemplo, el agente es un anticuerpo.

Los agentes o inhibidores que interactúan con el CSF-1, IL-34 o CSF-1R se pueden identificar utilizando cualquier método adecuado, por ejemplo, utilizando un

sistema de ensayo libre de células o a base de células, donde el polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R entra en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido. Preferentemente, la capacidad de un agente candidato para interactuar con un polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R se compara con un rango o control de referencia. Si se desea, este ensayo se puede utilizar para seleccionar una pluralidad (por ejemplo, una biblioteca) de agentes candidatos utilizando una pluralidad de muestras de polipéptidos de CSF-1, IL-34 o CSF-1R. En un ejemplo de un ensayo libre de células, una primera y una segunda muestra que comprende el polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R entra en contacto con un agente candidato o agente de control y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido comparando la diferencia de interacción entre el agente candidato y el agente control. Preferentemente, el polipéptido se inmoviliza primero, por ejemplo, por contacto del polipéptido con un anticuerpo inmovilizado que lo reconoce específicamente y se une a él, o por contacto de una preparación purificada de polipéptido con una superficie diseñada para ligar proteínas. El polipéptido puede ser parcial o completamente purificado (por ejemplo, parcial o completamente libre de otros polipéptidos) o ser parte de un lisado celular. Además, el

polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprende el polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R o una parte biológicamente activa de éste y un dominio como ser glutatión-S-transferasa o la región Fc de IgG1. Alternativamente, el polipéptido se puede biotinilar utilizando técnicas conocidas por los expertos en el arte (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL). La capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido se puede determinar a través de métodos conocidos por los expertos en el arte, por ejemplo, ELISA, BIAcore™, citometría de flujo o tecnología de ensayo de microvolumen fluorescente (FMAT). En otro ejemplo, donde se utiliza un ensayo a base de células, una población de células que expresan el CSF-1, IL-34 o CSF-1R entra en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido. Preferentemente, la capacidad del agente candidato para 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 (por ejemplo, levadura o mamífero) y puede expresar el polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R en forma endógena o se puede modificar genéticamente para expresar el polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R o el agente candidato se marca, por ejemplo, con un marcador

radioactivo (como ser P, S o I) o un marcador fluorescente (como ser isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído o fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre un polipéptido y un agente candidato. También se pueden emplear métodos alternativos tales como ELISA, citometría de flujo y FMAT. Los agentes que inhiben la actividad del CSF-1R se pueden identificar a través de cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante: (i) comparación de 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 control; y (ii) determinación de si el agente candidato inhibe la actividad del CSF-1R. Dichos ensayos se pueden utilizar para seleccionar agentes candidatos, en monitoreo clínico o en el desarrollo de fármacos. Tal como se ha descrito anteriormente, los agentes se pueden preseleccionar cuando sea apropiado (por ejemplo, un anticuerpo) para identificar agentes que interactúan con CSF-1, IL-34 o CSF-1R antes de seleccionar aquellos agentes que se unen por su capacidad para inhibir la actividad del CSF-1R. En un ejemplo, se utiliza un sistema de ensayo a base de células para identificar agentes capaces de inhibir la actividad del CSF-1R. En un ejemplo particular, el ensayo utilizado para identificar inhibidores de la

actividad del CSF-1 o actividad del CSF-1R es el ensayo de estimulación de colonias in vitro estándar de Metcalf, 1970, J. Cell. Physiol. 76-89, en el cual CSF-1 es capaz de estimular la formación de colonias de macrófagos. Se agregan inhibidores potenciales al ensayo y se mide la proliferación de macrófagos a través de cualquier método adecuado como ser la incorporación de ^3H timidina o conversión de colorante de formazán. Por lo tanto, la inhibición se mide como reducción en la proliferación en comparación con los controles.

En otro ejemplo, los inhibidores del CSF-1R pueden reducir la expresión del polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R, por ejemplo, inhibidores antisentido. Dichos inhibidores se pueden identificar a través de un método conocido en el arte. En un ejemplo, dichos inhibidores se identifican en un sistema de ensayo a base de células. En consecuencia, una población de células que expresan el polipéptido o ácido nucleico de CSF-1, IL-34 o CSF-1R entran en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para alterar la expresión del polipéptido o ácido nucleico de CSF-1, IL-34 o CSF-1R por comparación con un rango de referencia o control. En un ejemplo, una población de células que expresan un polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R entran en contacto con un agente candidato o un agente de control y se determina

la capacidad del agente candidato para alterar la expresión de los polipéptidos o ácidos nucleicos de CSF-1, IL-34 o CSF-1R por comparación de la diferencia en el nivel de expresión de los polipéptidos o ácidos nucleicos de CSF-1, IL-34 o CSF-1R entre las poblaciones de células tratadas y control. si se desea, este ensayo se puede utilizar para seleccionar una pluralidad (por ejemplo, una biblioteca) de agentes candidatos. La célula, por ejemplo, puede ser de origen eucariota (por ejemplo, de la levadura o mamíferos) y puede expresar un polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R en forma endógena o se puede modificar genéticamente para expresar el polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R. La capacidad de los agentes candidatos para alterar la expresión de dicho polipéptidos o ácidos nucleicos se puede determinar a través de métodos conocidos por los expertos en el arte, por ejemplo y sin limitación alguna, por citometría de flujo, radiomarcado, ensayo de centelleo, inmunoprecipitación, análisis de inmunotransferencia Western, análisis de inmunotransferencia Northern o RT-PCR.

Los agentes que inhiben la actividad del CSF-1R se pueden identificar o posteriormente someter a prueba, por ejemplo, para determinar las cantidades terapéuticamente eficaces en uno o más modelos animales. Los ejemplos de animales adecuados incluyen, sin carácter limitativo, ratones, ratas, conejos, monos, conejillos de India, perros

y gatos. En un ejemplo donde el agente inhibe la expresión del CSF-1, IL-34 o CSF-1R, se le administra a un primer y segundo grupo de mamíferos un agente candidato o agente control y la capacidad del agente candidato para inhibir la expresión del polipéptido o ácido nucleico de CSF-1, IL-34 o CSF-1R se determina por comparación de la diferencia en el nivel de expresión entre el primer y el segundo grupo de mamíferos. Cuando se desee, los niveles de expresión de los polipéptidos o ácidos nucleicos de CSF-1, IL-34 o CSF-1R en el primer y segundo grupo de mamíferos se puede comparar con el nivel de polipéptido o ácido nucleico de CSF-1, IL-34 o CSF-1R en el grupo control de mamíferos. El agente candidato o agente control se puede administrar a través de medios conocidos en el arte (por ejemplo, por vía oral, rectal o parenteral como ser por vía intraperitoneal o intravenosa o sistémica). Los cambios en la expresión de un polipéptido o ácido nucleico se pueden determinar a través de los métodos descritos anteriormente.

Los ejemplos de modelos de las enfermedades Alzheimer y Parkinson en roedores fueron demostrados, por ejemplo, por Wirths et al., 2010. Se ha demostrado la activación de la microglia y la incrementada expresión de Iba1 en el modelo de la enfermedad de Alzheimer en ratón transgénico APP/PS1KI. De un modo similar, Depboylu et al., 2012 ha mostrado una fuerte activación de la microglia asociada a

la expresión de Iba1 en el modelo inducido por MPTP de enfermedad de Parkinson. Lo que es más importante aún, se observó un fenotipo de activación robusta de la microglia y mayor señal Iba1 tanto en modelos en roedores como en primates no humanos de la enfermedad de Parkinson inducida por la sobreexpresión de α -sinucleína (Barkholt et al., 2012, Luk et al., 2012).

En otro ejemplo, la inhibición de la actividad del CSF-1R se puede determinar monitoreando una reducción o mejora de los síntomas de la enfermedad, y/o un inicio demorado o una progresión lenta de la enfermedad. Por ejemplo, pero sin limitación, en caso de una enfermedad neurológica como, por ejemplo, entre otras, la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, esto se puede manifestar como una reducción de los marcadores de la activación de la microglia o células microgliales en el cerebro o cultivo tisular. La inhibición de la actividad del CSF-1R en pacientes con una enfermedad neurológica también se puede determinar monitoreando eventos clínicos tales como exacerbaciones reducidas, definidas como deterioro rápido de la actividad de la enfermedad, en ausencia de otras causas. Por lo tanto, en una realización que emplea un inhibidor del CSF-1R se puede brindar una reducción de uno o más de los siguientes: enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica

(ELA) síndrome de Angelman, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, espectro autista, trastorno bipolar, daño cerebral, lesión cerebral, tumor cerebral, síndrome de dolor central, atrofia central, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), dolor crónico, síndrome de dolor regional complejo, enfermedad de Creutzfeldt_Jakob, demencia, síndrome de Down, síndrome de Dravet, encefalitis, temblor esencial, ataxia de Friedreich, síndrome del cromosoma X frágil, síndrome de temblor/ataxia asociado al cromosoma X frágil (FXTAS), lesión de cabeza, cefaleas, herpes zoster, enfermedad de Huntington, hipoxia, encefalomielitis inmunomediada, espasmos infantiles, hipertensión intracraneal, enfermedad de Lafora, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Lennox-Gastaut, leucodistrofia, leucoencefalopatías con sustancia blanca evanescente, demencia de cuerpos de Lewy, lisencefalia, enfermedad de Lyme - secuelas neurológicas, megaloencefalia, meningitis, microencefalia, migraña, miniaccidente cerebrovascular (ataque isquémico transitorio), enfermedad neuronal motora - ver esclerosis lateral amiotrófica, demencia multiinfarto, esclerosis múltiple, encefalopatía mioclónica de infantes, mioclono, manifestaciones neurológicas de SIDA, secuelas neurológicas de lupus, lipofuscinosis neuronal ceroida, neuropatía, enfermedad de Niemann-Pick, síndrome de Ohtahara,

enfermedad de Parkinson, enfermedades paraneoplásicas, esclerosis lateral primaria, enfermedades de Prion, leucoencefalopatía multifocal progresiva, parálisis supranuclear progresiva, encefalitis de Rasmussen, síndrome de piernas inquietas, síndrome de Rett, síndrome de persona rígida, apoplejía, ataque isquémico transitorio, lesión cerebral traumática, temblor, esclerosis tuberosa, enfermedad de Unverricht-Lundborg, epilepsia uncinada, síndrome de West, enfermedad de Wilson.

En un ejemplo preferido de la presente invención, el inhibidor se puede emplear en el tratamiento y/o profilaxis de la epilepsia, epileptogénesis, crisis y convulsiones. En otra realización preferida de la presente invención, el inhibidor se puede utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de tipos especiales de epilepsia, seleccionados entre el grupo que comprende crisis generalizadas, crisis focales y crisis de origen desconocido. En una realización más preferida de la presente invención, el inhibidor se puede utilizar para el tratamiento y/o profilaxis de epilepsia de lóbulo temporal (TLE).

Las técnicas conocidas por los médicos con conocimientos de enfermedades neurológicas se pueden utilizar para determinar si un agente candidato ha alterado uno o más síntomas asociados a la enfermedad. Se conocen en el arte una serie de modelos diferentes de enfermedad

neurológica. Por ejemplo, un modelo de neuroinflamación asociada a la activación de la microglia se basa en una inyección sistémica de endotoxina bacteriana de lipopolisacárido (LPS), que según se ha informado reduce la activación de la microglia hasta imitar el fenotipo de microglia que se observa en enfermedades neurológicas. Este modelo se puede utilizar en especies de roedores, pero un estudio reciente demostró que el modelo LPS se puede utilizar en primates no humanos, donde también está asociado a una activación robusta de la microglia (Hannestad et al., 2012).

Las técnicas de imágenes para las enfermedades neurológicas o estado de activación de la microglia pueden ser Tomografía de Emisión de Positrones (PET) que utilizan trazas radiactivas que se unen a la Proteína Translocadora (TSPO), lo cual muestra una fuerte inducción en la microglia activada (Hannestad et al., 2012). Se considera que el TSPO es un marcador transduccional de la activación de la microglia, porque se ha informado su inducción en el transcurso de varias enfermedades neurológicas tales como epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson (Amhaoul et al., 2014; Hommet et al., 2014; Edison et al., 2013).

Una realización de la presente invención brinda un inhibidor para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas que es un ácido nucleico.

En otra realización, la presente invención brinda un inhibidor que es una secuencia de ADN aislada que codifica la(s) cadena(s) pesada y/o ligera de un anticuerpo que inhibe la actividad del CSF-1R. En una realización preferida, la secuencia de ADN aislada que codifica la(s) cadena(s) pesada y/o ligera de un anticuerpo o fragmento o derivado de él, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-H3, y donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para la CDR-L3.

En otro ejemplo, donde el inhibidor es un ácido nucleico, éste se puede administrar a través de terapia génica (ver, por ejemplo, Hoshida, T. et al, 2002, *Pancreas*, 25:111-121; Ikuno, Y. 2002, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002 43:2406-2411; Bollard, C, 2002, *Blood*

99:3179- 3187; Lee E., 2001, Mol. Med. 7:773-782). La terapia génica se refiere a la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable, en un ejemplo éste es el ácido nucleico de CSF-1, IL-34 o CSF-1R o partes de éste. Se puede utilizar cualquiera de los métodos de terapia génica disponible en el arte de acuerdo con la presente invención. La administración del ácido nucleico terapéutico a un paciente puede ser una terapia génica in vivo directa (es decir, el paciente está directamente expuesto al ácido nucleico o vector que contiene el ácido nucleico) o terapia génica ex vivo indirecta (es decir, las células se transforman primero con el ácido nucleico in vitro y luego son trasplantadas al paciente).

Por ejemplo, para una terapia génica in vivo, se puede administrar un vector de expresión que contiene el ácido nucleico de CSF-1, IL-34 o CSF-1R de tal modo que se convierta en intracelular, es decir, por infección utilizando un vector retroviral defectivo o atenuado u otros vectores virales tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 4.980.286 o en Robbins et al, 1998, Pharmacol. Ther. 80:35-47. Los diversos vectores retrovirales que se conocen en el arte son tales como los que se describen en Miller et al. (1993, Meth. Enzymol. 217:581-599) que han sido modificados para eliminar aquellas secuencias retrovirales que no son requeridas para

el empaquetamiento del genoma viral y posterior integración en el ADN de la célula huésped. Asimismo, se pueden utilizar vectores adenovirales que son ventajosos debido a su capacidad para infectar células no divisoras, y tales vectores adenovirales de alta capacidad se describen en Kochanek (1999, Human Gene Therapy, 10:2451-2459). Los vectores quiméricos que se pueden utilizar son aquellos descritos por Reynolds et al. (1999, Molecular Medicine Today, 1:25 -31). Los vectores híbridos también se pueden utilizar y son descritos por Jacoby et al. (1997, Gene Therapy, 4:1282-1283). En la terapia génica también se puede utilizar la inyección directa de ADN desnudo o el bombardeo de micropartículas (por ejemplo, Gene Gun(R); Biolistic, Dupont) o recubrimiento con lípidos. Los receptores de la superficie de la célula/compuestos de transfección o la encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas o la administración de ácido nucleico en enlace con un péptido que, según se conoce, ingresa en el núcleo o la administración en enlace con un ligando predispuesto a endocitosis mediada por el receptor (ver Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem., 262:4429-4432) se pueden utilizar para dirigir tipos celulares que expresan específicamente los receptores de interés. En la terapia génica ex vivo, un gen se transfiere a células in vitro utilizando un cultivo tisular y las células son

enviadas al paciente a través de varios métodos tales como inyección subcutánea, aplicación de células en un injerto de piel e inyección intravenosa de células sanguíneas recombinantes tales como células madre o progenitoras hematopoyéticas. Las células en las cuales se puede introducir un ácido nucleico de CSF-1, IL-34 o CSF-1R a los fines de la terapia génica incluyen, por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos y hematíes. Los hematíes que se pueden utilizar incluye, por ejemplo, T-linfocitos, B-linfocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, glanulocitos, células hematopoyéticas o células progenitoras, microglia y similares.

Un aspecto de la presente invención es el uso de un inhibidor de la actividad del CSF-1R para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas. Este uso y los siguientes usos más específicos del inhibidor de la actividad del CSF-1R de la presente invención comprenden, sin carácter limitativo, los inhibidores descritos anteriormente y a los cuales pertenecen todas las definiciones provistas por la descripción.

En una realización de la presente invención, el uso de un inhibidor para la fabricación de un medicamento para el

tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas comprende un ácido nucleico.

En otra realización de la presente invención, el uso de un inhibidor para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas pertenecen a un anticuerpo o fragmento o derivado de él funcionalmente activo. En consecuencia, el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él funcionalmente activo de la presente invención comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal. Además, el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él funcionalmente activo en la presente invención pertenece a un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización de la presente invención, el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él funcionalmente activo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas comprende un anticuerpo biespecífico o multiespecífico. En consecuencia, el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él funcionalmente activo de la presente invención pertenece a un anticuerpo seleccionado entre el grupo que comprende una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras enteras o un fragmento de ella seleccionado entre el grupo que comprende Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de un único dominio (por ejemplo,

VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bivalentes, trivalentes o tetravalentes, Bis-scFv, dicuerpos, tricuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores.

Otra realización de la presente invención brinda el uso de un inhibidor para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas que comprenden un inhibidor conjugado con una o más molécula(s) efectora(s).

En otra realización de la presente invención, se brinda el uso de un anticuerpo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, que es un anticuerpo que se une al CSF-1R.

La presente invención también brinda el uso de un inhibidor de la actividad del CSF-1R, que es un anticuerpo, donde el anticuerpo o fragmento o derivado de él cruza la barrera hematoencefálica (BHE) alcanzando en el cerebro una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para el tratamiento y/o profilaxis de un paciente que padece una enfermedad neurológica.

En otra realización de la presente invención, el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas comprende un

anticuerpo que tiene una cadena pesada y una cadena ligera, donde el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

Además, la presente invención brinda el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, donde el anticuerpo o fragmento o derivado de él comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de las CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para la CDR-L3.

En otra realización de la presente invención, el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas comprende un anticuerpo que tiene una cadena pesada y una cadena ligera, donde el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y una CDR que tiene la

secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-H3, y donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 para la CDR-L3.

En otra realización de la presente invención, el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas comprende un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9.

En otra realización de la presente invención, el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas comprende un anticuerpo que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7.

La presente invención también brinda el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas que tiene una cadena pesada que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7.

La presente invención también brinda el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, donde el anticuerpo o fragmento o derivado de él tiene una afinidad de unión [K_D] con el CSF-1R humano de 10 pM o menos de 10 pM.

La presente invención también brinda el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, donde el anticuerpo o fragmento o derivado de él lleva a cabo un bloqueo cruzado de la unión de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13 con una afinidad [K_D] de 100 pM o menos.

Otra realización de la presente invención es el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, donde el anticuerpo o fragmento o derivado de él lleva a cabo un bloqueo cruzado de la unión ligando el mismo epítipo que el anticuerpo que bloquea.

Otra realización de la presente invención es el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, donde el anticuerpo o fragmento o derivado de él compite con el

anticuerpo o fragmento o derivado de él para unirse a un dominio extracelular del CSF-1R humano (c-fms) de la Figura 2 (SEQ ID NO: 15).

Una realización de la presente invención es el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, que se une al epítipo del CSF-1R humano.

Otra realización de la presente invención brinda el uso de un anticuerpo o fragmento o derivado de él para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, que es una secuencia de ADN aislada que codifica la(s) cadena(s) pesada(s) y/o ligera(s) de un anticuerpo adecuado para la presente invención.

Tal como se describe en la presente, los inhibidores de la actividad del CSF-1R se pueden utilizar en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas. Para dicho uso, los agentes generalmente se administrarán en forma de composición farmacéutica. También se brinda una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la actividad del CSF-1R en combinación con un diluyente, excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención también puede comprender adicionalmente otros ingredientes activos.

El término "tratamiento" incluye la terapéutica y/o la terapia profiláctica. Cuando se hace referencia en la presente a un método para tratar y/o prevenir una enfermedad o condición neurológica utilizando un inhibidor particular o una combinación de inhibidores, se entiende que dicha referencia tiene como fin incluir el uso de ese inhibidor o combinación de inhibidores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad neurológica.

La composición habitualmente se presentará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede presentarse en cualquier forma (dependiendo del método deseado de administración a un paciente). Los inhibidores de uso en la invención se administran, preferentemente, a un sujeto por vía oral o intrarectal, pero también se puede administrar a través de una variedad de otras rutas tales como por vía transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa e intramuscular. La vía más adecuada para la administración en cualquier caso dado dependerá del inhibidor particular, del sujeto y de la naturaleza y gravedad de la enfermedad y de la condición física del paciente.

Los inhibidores de uso en la invención se pueden administrar, por ejemplo, en forma simultánea, secuencial o

separada, con uno o más compuestos terapéuticamente activos adicionales, lo cual puede ser, por ejemplo, una terapia antineurológica.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse, convenientemente, en formas de dosis unitaria que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis. Dicha unidad puede contener, por ejemplo, sin limitación alguna, de 1000 mg/kg a 0,01 mg/kg, por ejemplo, de 75 mg/kg a 0,1 mg/kg, como ser de 100 mg/kg a 1 mg/kg, dependiendo de la condición a tratar, la vía de administración y la edad, el peso y la condición del sujeto.

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

Las composiciones para la administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las preparaciones líquidas pueden presentarse en forma, por ejemplo, de suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Las preparaciones líquidas orales pueden contener agentes de suspensión conocidos en el arte. En el caso de las preparaciones sólidas orales tales como polvos,

cápsulas y comprimidos, se pueden incluir vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, agentes de granulado, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares. Dada la facilidad para ser administrados, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso generalmente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos.

Además de las formas de dosificación habituales establecidas anteriormente, también se pueden administrar agentes activos de la invención a través de medios de liberación controlada y/o dispositivos de administración. Los comprimidos y las cápsulas pueden comprender vehículos o excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para la formación de comprimidos, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o talco; desintegrantes, por ejemplo, almidón de papa; o agentes humectantes aceptables tales como lauril sulfato de sodio. Los comprimidos se pueden recubrir por medio de técnicas acuosas o no acuosas estándares de acuerdo con los métodos conocidos en la práctica farmacéutica normal.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, y cada uno de ellos contiene una cantidad predeterminada de agente activo, como polvo o gránulos, o como solución o suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión aceite en agua o una emulsión líquida agua en aceite. Dichas composiciones se pueden preparar a través de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen la etapa de asociar el agente activo con el vehículo, lo cual constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando uniforme e íntimamente el agente activo con los vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, de ser necesario, dándole forma al producto hasta lograr la presentación deseada. Por ejemplo, se puede preparar un comprimido mediante compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral se pueden preparar como soluciones o suspensiones de agentes activos de la invención en agua convenientemente mezcladas con un surfactante como ser hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y

mezclas de ellos en aceite. Bajo condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones estériles acuosas o no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos, los cuales tornan 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, dispersiones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en el arte. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición farmacéutica de la invención se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, como ser los dispositivos que se divulgan en los documentos US 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824, o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos conocidos útiles en la presente invención incluyen: el documento US 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; el documento US 4.486.194 que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a

través de la piel; el documento US 4.447.233 que divulga una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión precisa; el documento US 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármaco; el documento US 4.439.196, que divulga un sistema osmótico de suministro de fármacos que tiene compartimientos de múltiples cámaras; el documento US 4.475.196 que divulga un sistema osmótico de suministro de fármacos. Muchos otros tales como implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en el arte.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, vendas impregnadas, rocíos, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos y similares. Las composiciones se pueden preparar a través de métodos convencionales que contienen el agente activo. Por lo tanto, también pueden comprender vehículos y aditivos convencionales compatibles, tales como conservantes, solventes para facilitar la penetración de fármacos, emolientes en cremas o pomadas y etanol o alcohol oleílico para lociones. Dichos vehículos se pueden presentar entre aproximadamente 1% hasta 98% de la composición. Más

habitualmente, formarán hasta aproximadamente 80% de la composición. A modo de ilustración únicamente, una crema o pomada se prepara mezclando cantidades suficientes de material hidrofílico y agua, que contienen entre aproximadamente 5-109% en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o pomada con la consistencia deseada. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica se pueden presentar como parches discretos destinados a permanecer en contacto directo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, el agente activo se puede administrar desde un parche por iontoforesis. Para aplicaciones en tejidos externo, por ejemplo, la boca y la piel, las composiciones se aplican, preferentemente como pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el agente activo se puede emplear con una base de pomada parafínica o bien una base de pomada miscible en agua. Alternativamente, el agente activo se puede formular en una crema con una base de crema aceite en agua o una base agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen grageas, pastillas y enjuagues bucales. Las composiciones adaptadas para la administración tópica en los ojos incluyen gotas para los ojos donde el agente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, en especial, un solvente acuoso.

También incluyen pomadas o cremas tópicas tal como se ha indicado anteriormente. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal, donde el vehículo es un sólido, se presentan, con mayor preferencia, como supositorios de dosis unitaria. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao u otro glicérido o materiales comúnmente utilizados en el arte, y los supositorios se pueden formar, convenientemente, mezclando la combinación con excipiente(s) ablandado(s) o fundido(s) seguido de enfriamiento y moldeado. También se pueden administrar como enemas.

La dosificación que se administrará de un inhibidor de actividad de CSF-1R variará de acuerdo con el inhibidor en particular, el tipo de enfermedad neurológica, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto, y la vía de administración seleccionada; la dosificación apropiada puede ser determinada fácilmente por el experto en el arte. Para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas en seres humanos y animales, las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos se pueden administrar a pacientes (por ejemplo, sujetos humanos) a dosificaciones terapéutica y profilácticamente efectivas (por ejemplo, dosificaciones que tienen como resultado la inhibición de enfermedades neurológicas y/o el alivio de los síntomas de enfermedades

neurológicas), utilizando cualquier vía de administración adecuada, como ser inyección y otras vías de administración conocidas en el arte para productos clínicos, tales como productos clínicos a base de anticuerpos. Las composiciones pueden contener al menos 0,05% en peso, por ejemplo, del 0,5 al 50% en peso como ser del 1 al 10% en peso, o más, en peso, del inhibidor de la invención, dependiendo del método de administración. El experto en el arte podrá reconocer que la cantidad y separación óptima de las dosificaciones individuales de un inhibidor de la invención serán determinadas por la naturaleza y el grado de la afección tratada, la forma, la vía y el sitio de administración, la edad y condición del sujeto particular tratado, y que el médico finalmente determinará la dosificación apropiada que se empleará. Esta dosificación puede repetirse con la frecuencia que sea apropiada. En caso de surgir efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosificación se puede alterar o reducir, de acuerdo con la práctica clínica normal.

En un aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención comprende un ácido nucleico de CSF-1, IL-34 o CSF-1R, y dicho ácido nucleico es parte de un vector de expresión que expresa un polipéptido de CSF-1, IL-34 o CSF-1R o proteína quimérica de él en un huésped adecuado. En particular, dicho ácido nucleico tiene un

promotor unido operativamente a la región codificadora del polipéptido, y dicho promotor es inducible o constitutivo (y, opcionalmente, específico del tejido).

Un aspecto de la presente invención brinda una composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad neurológica.

La presente invención también brinda un método para el tratamiento y/o profilaxis de un sujeto humano que padece o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad neurológica, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la actividad del CSF-1R. En una realización de la presente invención, el método para el tratamiento y/o profilaxis de un sujeto humano que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad neurológica comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de acuerdo con la presente invención, o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también brinda un método para el tratamiento y/o profilaxis de un sujeto humano que padece o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad neurológica, donde el inhibidor de la actividad del CSF-1R se administra en combinación con uno o más compuestos terapéuticamente activos adicionales. Otro aspecto de la presente invención brinda un método en el cual el compuesto

terapéuticamente activo adicional es otro agente terapéutico antiepiléptico.

La presente invención brinda un inhibidor de la actividad del CSF-1R para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, el uso de un inhibidor de la actividad del CSF-1R para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la actividad del CSF-1R para uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas, o un método para el tratamiento y/o profilaxis de un sujeto humano que padece o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad neurológica, donde la enfermedad neurológica se selecciona entre el grupo que comprende enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) síndrome de Angelman, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, espectro autista, trastorno bipolar, daño cerebral, lesión cerebral, tumor cerebral, síndrome de dolor central, atrofia central, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), dolor crónico, síndrome de dolor regional complejo, enfermedad de Creutzfeldt_Jakob, demencia, síndrome de Down, síndrome de Dravet, encefalitis, temblor esencial, ataxia de Friedreich, síndrome del cromosoma X frágil, síndrome de temblor/ataxia asociado al cromosoma X frágil

(FXTAS), lesión de cabeza, cefaleas, herpes zoster, enfermedad de Huntington, hipoxia, encefalomiелitis inmunomediada, espasmos infantiles, hipertensión intracraneal, enfermedad de Lafora, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Lennox-Gastaut, leucodistrofia, leucoencefalopatías con sustancia blanca evanescente, demencia de cuerpos de Lewy, lisencefalia, enfermedad de Lyme - secuelas neurológicas, megaloencefalia, meningitis, microencefalia, migraña, miniaccidente cerebrovascular (ataque isquémico transitorio), enfermedad neuronal motora - ver esclerosis lateral amiotrófica, demencia multiinfarto, esclerosis múltiple, encefalopatía mioclónica de infantes, mioclono, manifestaciones neurológicas de SIDA, secuelas neurológicas de lupus, lipofuscinosis neuronal ceroida, neuropatía, enfermedad de Niemann-Pick, síndrome de Ohtahara, enfermedad de Parkinson, enfermedades paraneoplásicas, esclerosis lateral primaria, enfermedades de Prion, leucoencefalopatía multifocal progresiva, parálisis supranuclear progresiva, encefalitis de Rasmussen, síndrome de piernas inquietas, síndrome de Rett, síndrome de persona rígida, apoplejía, ataque isquémico transitorio, lesión cerebral traumática, temblor, esclerosis tuberosa, enfermedad de Unverricht-Lundborg, epilepsia uncinada, síndrome de West, enfermedad de Wilson.

En realizaciones de la presente invención, la enfermedad neurológica se selecciona, preferentemente, entre el grupo que comprende síndrome de Angelman, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, espectro autista, lesión cerebral, tumor cerebral, enfermedad de Creutzfeldt_Jakob, demencia, síndrome de Down, síndrome de Dravet, encefalitis, síndrome del cromosoma X frágil, síndrome de temblor/ataxia asociado al cromosoma X frágil (FXTAS), lesión de cabeza, herpes zoster, hipoxia, encefalomielitis inmunomediada, espasmos infantiles, enfermedad de Lafora, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Lennox-Gastaut, leucodistrofia, leucoencefalopatías con sustancia blanca evanescente, lisencefalia, enfermedad de Lyme - secuelas neurológicas, meningitis, esclerosis múltiple, encefalopatía mioclónica de infantes, mioclono, secuelas neurológicas de lupus, síndrome de Ohtahara, enfermedades de Prion, encefalitis de Rasmussen, síndrome de Rett, lesión cerebral traumática, esclerosis tuberosa, enfermedad de Unverricht-Lundborg, epilepsia uncinada o síndrome de West.

En otra realización de la presente invención, la enfermedad neurológica se selecciona entre el grupo que comprende epilepsia, epileptogénesis, crisis epilépticas o convulsiones. En otra realización de la presente invención, el tipo de epilepsia se selecciona entre el grupo que

comprende crisis generalizadas, crisis focales y crisis de origen desconocido. En otra realización de la presente invención, la enfermedad neurológica es epilepsia de lóbulo temporal (TLE).

Como una realización de mayor preferencia, el anticuerpo anti-CSF_1R que se divulga en el documento WO 15/028455 se incorpora a la presente como referencia.

A continuación, se describirá la invención con referencia a los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y que de ningún modo deben ser interpretados como limitativos del alcance de la presente invención.

FIGURAS

La **Figura 1** presenta ciertas secuencias de aminoácidos y polinucleótidos (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 14).

La **Figura 2** presenta la secuencia del dominio extracelular del CSF-1R humano codificada por un polinucleótido adecuado para la expresión sobre la superficie celular (SEQ ID NO: 15).

La **Figura 3** presenta los datos de la citometría de flujo que confirman que el CSF-1 unido al receptor en células M-NFS-60 fue detectado por este método.

La **Figura 4** muestra que Ab535, ya sea inmovilizado sobre la superficie de la cavidad de cultivo tisular o libre en

solución, no permitió la proliferación de células M-NFS-60 en ausencia de CSF-1 a las concentraciones empleadas.

La **Figura 5** presenta el acoplamiento objetivo transcripcional de CSF-1R en ratones después del tratamiento (s.c.) con anticuerpo anti-CSF-1R. La expresión de los cuatro genes objetivo transcripcionales de CSF-1R, por ejemplo, *Aif1* (paneles A, B), *Ctse* (paneles C, D), *Emr1* (paneles E, F) e *Irf8* (paneles G, H), se midió mediante qPCR en hipocampos de ratones epilépticos (paneles izquierdos) y animales sin tratamiento previo (paneles derechos) después de las inyecciones s.c. de anticuerpo anti-CSF-1R o IgG control como control negativo.

La **Figura 6** presenta los resultados de experimentos de inmunohistoquímica llevados a cabo en cortes de cerebro de ratón (giro dentado del hipocampo) después del tratamiento (s.c.) con anticuerpo anti-CSF-1R. La proteína *Iba1*, que es un marcador de la microglia activada se marcó en rojo, los núcleos de glóbulos blancos se tiñeron de azul con DAPI (paneles A-C). Se cuantificó la densidad de las células microgliales que expresan *Iba1* por mm² en el panel D.

La **Figura 7** presenta el efecto protector de un anticuerpo anti-CSF-1R en la frecuencia de las crisis epilépticas en un modelo de ratón con pilocarpina.

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

Dos conejos recibieron 5 inmunizaciones con células que expresan transitoriamente los residuos 1-5122 de CSF-1R de ratón (**Registro en Uniprot p09581**). Se monitoreó la respuesta al anticuerpo en un ELISA que utilizaba placas Nunc Maxisorp recubiertas con 2 µg/ml de CSF-1R de ratón-Fc de conejo. Se observaron los títulos de suero hasta una dilución 1:100.000 con ambos conejos. También se determinó la unión del suero con las células M-NFS-60 (Metcalf et al., 1970) mediante FACS. Se graficó la FL1 media en comparación con la dilución de anticuerpos. Se observó una unión hasta una dilución de 1:10.000.

A través del uso de una línea celular M-NFS-60 dependiente del CSF-1 (Metcalf et al., 1970), se demostró que los sueros de ambos conejos pueden bloquear la sobrevida de células dependientes del CSF-1R hasta una dilución de 1:100 (no se muestran los datos).

Se sembraron cien placas de 96 cavidades con 1000-5000 PBMCs de conejo por cavidad y se cultivó durante 1 semana a 37 °C en presencia de células de timoma de ratón EL4-B5 y un medio acondicionado de células T de conejo (TSN). Luego, se seleccionaron los sobrenadantes que contenían anticuerpo en un ensayo FMAT utilizando células M-NFS-60 y conjugado Cy5 específico de anti-Fc de conejo. Se identificaron 678

aglutinantes de CSF-1R. De ellos, aproximadamente el 3% bloqueó la proliferación de M-NFS-60 dependiente del CSF-1 en un ensayo celular. Los aglutinantes también se seleccionaron con un conjugado anti-F(ab')₂ de conejo-HRP. Los aglutinantes también se seleccionaron en un ensayo de bloqueo de fase sólida a base de ELISA. Para este ensayo, las placas de 384 cavidades Nunc Maxisorp se recubrieron con 0,5 µg/ml de Fc de conejo-CSF-1R y posteriormente se bloquearon en PBS/0,1% de Tween-20/1% de PEG20000. Las placas se lavaron antes y posteriormente se agregó el sobrenadante de cultivo a las placas y se incubaron 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 otra hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y luego se incubaron con 0,5 µg/ml de anticuerpo anti-CSF-1R de ratón de cabra biotinilado (R&D Systems). La unión del CSF-1 al receptor se reveló utilizando estreptavidina-HRP. Se seleccionaron ocho cavidades para su progresión. Todas demostraron unión con las células y la proteína y se bloquearon en el ensayo con M-NFS-60 y en el ELISA.

Se empleó un método a base de fluorescencia para identificar las células B específicas del antígeno desde una cavidad positiva. Las células B secretoras de inmunoglobulina desde una cavidad positiva se mezclaron con

perlas de estreptavidina recubiertas con Fc de conejo-CSF-1R de ratón biotinilado y un conjugado FITC específico del fragmento F(ab')₂ anti-ratón F(ab')₂ de cabra (Jackson ImmunoResearch). Después de la incubación a 37 °C durante 1 hora, el anticuerpo secretado de las células B específicas del antígeno fue capturado en perlas en las cercanías de esa célula B. La presencia del conjugado FITC tuvo como resultado el marcado de las perlas recubiertas con anticuerpo y la formación de focos fluorescentes alrededor de las células B específicas del antígeno. Estas células B individuales, identificadas utilizando un microscopio fluorescente, luego se recolectaron con un micromanipulador y se depositaron en un tubo de PCR. Los genes de la región variable se recuperaron de células individuales mediante transcripción inversa (RT)-PCR. Las regiones V de conejo luego se expresaron como anticuerpos quiméricos de IgG4 humano o Fabs en un sistema de expresión transitorio de CHO. Cuatro de las 8 cavidades produjeron anticuerpos anti-CSF-1R recombinante. La actividad de neutralización con anticuerpos recombinantes luego se confirmó en el ensayo con M-NFS-60. También se realizó un BIAcore utilizando las moléculas Fab para determinar la afinidad con Fc de conejo CSF-1R (Tabla 1). En base a la actividad de neutralización y afinidad. Se seleccionó Ab535 como reactivo anti-CSF-1R de ratón. Este anticuerpo posteriormente se murinizó, se

expresó en un sistema mamífero como IgG1 murina de longitud completa y se purificó.

Método BIAcore

Los anticuerpos se sometieron a prueba para determinar su capacidad para ligar CSF-1R en un ensayo BIAcore mediante la medición de la cinética de unión con una proteína de fusión CSF-1R/Fc recombinante purificada.

El formato del ensayo fue la captura de los anticuerpos anti-CSF-1R por anti-IgG humana, $F(ab')_2$, luego una titulación de hCSF-1R/Fc sobre la superficie capturada. Se realizó un BIA (análisis de interacción molecular) utilizando BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C. Se inmovilizó anti-IgG humana de cabra del fragmento $F(ab')_2$ Affinipure, específico para $F(ab')_2$ (Jackson ImmunoResearch) en un CM5 Sensor Chip (GE Healthcare Bio-Sciences AB) por medio de química de acoplamiento de amina hasta un nivel de ~6000 unidades de respuesta (RU). Se empleó tampón HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% Surfactante P20, GE Healthcare Bio-Sciences AB) como tampón de corrida con un caudal de 10 μ l/min. Se realizó una inyección de un anticuerpo anti-CSF-1R para obtener un nivel de captura de aproximadamente 100 RU en anti-IgG, $F(ab)_2$ humana inmovilizada.

El CSF-1R/Fc humano recombinante se sometió a titulación (R&D Systems), duplicando la dilución, de 2,5 nM a 78 pM sobre el anticuerpo anti-CSF-1R capturado a un caudal de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 3 minutos, seguido de una fase de disociación de 8 minutos. Estos sensogramas se utilizaron para generar el índice de asociación. La superficie se regeneró a un caudal de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ mediante dos inyecciones de 10 μl secuenciales de 40 mM HCl seguido de una inyección de 5 μl de 10 mM NaOH. Se analizaron las curvas de unión sin fondo de referencia dobles utilizando el software BIAevaluation (versión 4.1) siguiendo los procedimientos estándares. Se determinaron los parámetros cinéticos a partir del algoritmo de ajuste.

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

Tabla 1

REF. ANTICUERPO:	Constante de asociación k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Constante de disociación k_d (s^{-1})	Constante de Afinidad K_D
Ab 535	$8,05 \pm 0,01 \times 10^6$	$1,21 \pm 0,15 \times 10^{-5}$	1,50 pM

Ejemplo 2: Análisis in vitro de Ab535

Ab535 BLOQUEA LA UNIÓN DE CSF-1 MURINO CON EL RECEPTOR DE CSF-1-LÍNEAS CELULARES POSITIVAS IN VITRO

Se investigó la capacidad de Ab535 unido al receptor para prevenir que el CSF-1 se una al CSF-1R. Se utilizó una línea celular positiva de CSF-1R murino, M-NFS-60, en el ensayo en el cual las células se incubaron previamente con Ab535 o un anticuerpo control antes de la exposición al CSF-1. Luego, se detectó el CSF-1 unido al receptor utilizando un anticuerpo marcado con fluorescencia y citometría de flujo. La disminución dependiente del Ab535 en la intensidad de la fluorescencia se interpretó como indicadora de una capacidad de 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 un medio RPMI basal (Invitrogen) complementado con 10% de suero bovino fetal (PAA), Hepes (Invitrogen, concentración final 10 mM), Piruvato de Sodio (Invitrogen, concentración final 1 mM), glucosa (Sigma-Aldrich, concentración final 4,5 g/l), bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, concentración final 1,5%), beta-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, concentración final 0,05 mM), CSF-1 murino recombinante (Preprotech, concentración final 3,3 ng/l).

Las células M-NFS-60 se prepararon en un tampón de flujo (PBS (Invitrogen) complementado con 0,2% BSA (Sigma-Aldrich), 0,09% de azida de sodio (Sigma-Aldrich)) a una concentración de 1×10^6 células/ml. Se prepararon

diluciones seriales de Ab535 o un anticuerpo control isotipo IgG1 murino en un tampón de flujo y se agregó a partes de 100 μ l de células para lograr concentraciones finales de 20, 5, 1,25, 0,32, 0,08 μ g/ml en un volumen de 200 μ l y se incubaron en hielo durante 1 hora. Luego, las células se lavaron dos veces en un tampón de flujo, se incubaron con 0,5 μ g/ml de CSF-1 murino recombinante durante 30 min 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 anti-CSF-1 murino biotinilado (R&D Systems, 5 μ g/ml) durante 30 minutos en hielo, se lavaron dos veces en tampón de flujo y el anticuerpo unido se marcó por incubación con estreptavidina conjugada con Alexafluor 488 (Invitrogen, dilución 1:200) en hielo durante 15 minutos antes de una etapa de lavado final y resuspensión de las células en 500 μ l de tampón de flujo. Se determinó la fluorescencia de las células mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACSCaliber (Becton Dickinson) y los datos se analizaron utilizando el software WinMDI.

Los datos del análisis de citometría de flujo confirmaron que a través de este método se detectó el CSF-1 unido al receptor en células M-NFS-60 (**Figura 3a**). La incubación de células con Ab535 en cualquiera de las concentraciones utilizadas, antes de la adición de CSF-1

impidió la unión del CSF-1 al CSF-1R (**Figura 3b**). La incubación de las células con un anticuerpo control de isotipo en cualquiera de las concentraciones utilizadas no tuvo efecto en la unión y detección de CSF-1 (**Figura 3c**).

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

Se investigó la capacidad del Ab535 para sustituir al CSF-1 para permitir la supervivencia y proliferación de células dependientes del CSF-1, utilizando células M-NFS-60 en un ensayo de proliferación celular que incluyó células expuestas a Ab535 libres en solución e inmovilizadas en plástico.

Para determinar la capacidad del Ab535 inmovilizado para soportar las células dependientes del CSF-1, se recubrieron previamente las cavidades de una placa de cultivo tisular de base redonda de 96 cavidades con Ab535 o un anticuerpo control de isotipo irrelevante durante 24 horas antes de iniciar en ensayo de proliferación celular por adición de 50 μ l por cavidad de una solución que contiene 10 μ g/ml o 1 μ g/ml de anticuerpo en PBS e incubación a 4°C. Las cavidades se aspiraron y se removió el anticuerpo no ligado lavando cada cavidad dos veces con 100 μ l de PBS.

Las células M-NFS-60 proliferantes, mantenidas tal como se ha descrito anteriormente, se sembraron en placas de cultivo tisular de base redonda de 96 cavidades a una densidad de 10.000 células por cavidad en 50 µl de medio de crecimiento sin CSF-1. Se agregaron a las cavidades apropiadas otros 50 µl de medio de crecimiento, complementado con CSF_1 murino recombinante, Ab535 o sin complementos. Las placas se incubaron durante 72 horas y se determinó el número de células utilizando el kit CellTiter Glo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega) para generar una lectura luminiscente medible proporcional a los niveles de ATP y, por lo tanto, al número de células, para cada una de las condiciones sometidas a prueba. Todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado.

El análisis de los datos confirmó que las M-NFS-60 eran dependientes del CSF-1 para la proliferación, tal como se ve reflejado por el número de células significativamente mayor en las placas complementadas con CSF-1 en comparación con aquellas mantenidas en el medio de crecimiento sin CSF-1. Además, Ab535, ya sea inmovilizado sobre la cavidad de cultivo tisular o bien libre en solución, no permitió la proliferación de células M-NFS-60 en ausencia de CSF-1 en las concentraciones utilizadas (**Figura 4**).

Figura 3: Modelo de epilepsia de lóbulo temporal en ratón inducida por pilocarpina

El modelo de epilepsia de lóbulo temporal y epileptogénesis inducidas por pilocarpina se llevó a cabo tal como se describe en Mazzuferi et al., 2012. A los ratones sin tratamiento previo o ratones epilépticos (n = 8-10) 19 semanas después de la inducción de la epilepsia de lóbulo temporal por pilocarpina se les administró 100 mg/kg (s.c.) anti-CSF-1R (Ab535) o vehículo el día 1 y el día 4 del experimento. El día 8, se sacrificaron los animales y se retiraron los cerebros del cráneo.

La epilepsia de lóbulo temporal inducida por pilocarpina está asociada a cambios simétricos en ambos hemisferios del cerebro (Mazzuferi et al., 2012). El hipocampo se diseccionó rápidamente del hemisferio derecho y se congeló a -80 °C para realizar una extracción de ARN por qRT-PCR. El hemisferio izquierdo se fijó por inmersión en 4% de PFA a fin de realizar estudios histológicos (inmunohistoquímica).

Para mostrar las consecuencias moleculares del bloqueo del receptor por el anticuerpo, se identificaron genes objetivo transcripcionales corriente abajo de CSF-1R utilizando Thomson-Reuters Metabase (<http://lsresearch.thomsonreuters.com/pages/solutions/10/metabase>), una base de datos manualmente curada de rutas

biológicas y regulación de genes. Entre los genes de CSF-1R objetivo, se seleccionaron los genes *Aif1*, *Irf8*, *Ctse1* y *Emr1* porque, según se conoce, se expresan en el hipocampo. Su expresión se midió y se comparó mediante qRT-PCR.

Uno de los genes objetivo anteriormente mencionados de CSF-1R, *Aif1*, es la proteína *Iba1* codificadora, que es un marcador ampliamente establecido de activación de la microglia. La expresión de *Iba1* aumenta uniformemente en células microgliales halladas en la epilepsia humana y en modelos de epilepsia en ratón, tales como el modelo con pilocarpina (Vezzani et al., 2013). Por lo tanto, hemos llevado a cabo una evaluación inmunohistoquímica de su expresión en el hipocampo de ratones epilépticos con pilocarpina tratados con anticuerpo anti-CSF-1R. Se utilizaron los anticuerpos específicos que reconocen *Iba1* (marcador de microglia) y DAPI (marcador nuclear) y se cuantificó el número de células positivas a *Iba1* (células/mm²) en el giro dentado del hipocampo después de la adquisición de la imagen con una lente x40 (NanoZoomer).

Resultados

La expresión de cuatro genes objetivo transcripcionales de CSF-1R, por ejemplo, *Aif1* (Figura 5 paneles A, B), *Ctse* (paneles C, D), *Emr1* (paneles E, F) e *Irf8* (paneles G, H), se midió mediante qPCR en hipocampos

de ratones epilépticos (paneles izquierdos) y animales sin tratamiento previo (paneles derechos) después de las inyecciones s.c. de anticuerpo anti-CSF-1R o IgG control como control negativo.

En ratones con pilocarpina, el tratamiento con anticuerpo anti-CSF-1R (s.c.) disminuyó significativamente la expresión de los 4 genes objetivo seleccionados (Aif1, Ctse, Emr1 y Irf8) en comparación con el control (Figura 5 - paneles A, C, E y G). Esto demuestra que el CSF-1R es inhibido eficazmente en el hipocampo de ratones epilépticos tratados con anticuerpo anti-CSF-1R.

La expresión de los genes Aif1, Ctse y Irf8 en animales no tratados previamente no se ve afectada por el anticuerpo anti-CSF-1R (Figura 5 - paneles B, D y H). Esto sugiere que el estado de enfermedad (epilepsia) es requerido para que el anti-CSF-1R tenga efecto en el cerebro. Sin embargo, la expresión de Emr1 también se ve afectada en ratones sin tratamiento previo (Figura 1 - panel F), lo cual sugiere que algunos genes objetivo de CSF-1R pueden depender de los antecedentes de la enfermedad mientras que otros no.

En ratones epilépticos, el anti-CSF-1R restaura, al menos parcialmente, los niveles de expresión de los 4 genes a los niveles de expresión observados en animales sin tratamiento previo (paneles A, C, E y G), lo cual indica un

acoplamiento objetivo en el cerebro de ratones con epilepsia. En animales sin tratamiento previo, este efecto sólo se puede observar en los genes objetivo *Irf8* (panel F), pero no con los otros 3 genes objetivo (paneles B, D y H), lo cual indica un acoplamiento objetivo diferente de exposición a anti-CSF-1R en animales sin tratamiento previo en comparación con animales epilépticos inducidos con pilocarpina.

Ejemplo 4: Experimentos de inmunohistoquímica llevados a cabo en cortes de cerebro de ratón

Las observaciones descriptas en el Ejemplo 3 basadas en los datos de expresión génica fueron confirmados por la histología del cerebro. La Figura 6 muestra los resultados de inmunohistoquímica llevados a cabo en cortes de cerebro de ratón (giro dentado del hipocampo) después del tratamiento (s.c.) con anticuerpo anti-CSF-1R para el marcador *Iba1* (en rojo), que es un marcador de células microgliales activadas; los núcleos de las células se tiñeron de azul con DAPI. La densidad de las células microgliales que expresan *Iba1* por mm² se cuantificó en el panel D.

La proteína *Iba1* es codificada por el gen *Aif1* mencionado en el Ejemplo 3, un gen objetivo corriente abajo directo de CSF-1R. Tal como podemos observar claramente

(Figura 6 - panel B y cuantificación en panel D) hay un fuerte incremento de la activación de la microglia y tinción para células positivas a Iba1 en los ratones epilépticos con pilocarpina, en comparación con los ratones sin tratamiento previo (Figura 6 - panel A y cuantificación en el panel D). Las inyecciones (s.c.) con el anticuerpo anti-CSF-1R produjo una fuerte disminución de las células positivas a Iba1 en animales epilépticos (Figura 6 panel C), que concuerda con una disminución de la actividad de la microglia. Por lo tanto, el tratamiento con anticuerpo anti-CSF-1R indujo una normalización de la tinción de Iba1 (Figura 6 - panel C y cuantificación en el panel D) al nivel del control.

Ejemplo 5: Modelo de enfermedad de Parkinson en ratón inducida por MPTP

La degeneración aguda selectiva de las células dopaminérgicas, que es una característica de la enfermedad de Parkinson, se puede inducir, por ejemplo, en ratones, por medio de toxinas tales como 1-metil-1,4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Después de la inyección de MPTP, las células dopaminérgicas se degeneran durante un período de unos cuantos días y esto es acompañado de la activación de la microglia (Depboylu et al., 2012). A dos grupos de ratones sin tratamiento previo (n=8-10) se les administró

100 mg/kg (s.c.) de anti-CSF-1R (Ab535) o vehículo el día 1 y el día 4 del experimento. El día 8 ambos grupos de ratones recibieron una inyección de MPTP (12,5 mg/kg; s.c.). La inyección sistémica de MPTP induce rápidamente cambios simétricos en ambos hemisferios del cerebro, por lo tanto, los ratones fueron sacrificados 10-12 horas después de la inyección de toxina. Rápidamente se diseccionó el cuerpo estriado del hemisferio derecho y se lo congeló a -80 °C para realizar una extracción de ARN mediante qRT-PCR. El hemisferio izquierdo se fijó por inmersión en PFA al 4% a fin de realizar estudios histológicos (inmunohistoquímica).

Para mostrar las consecuencias moleculares del bloqueo del receptor por el anticuerpo anti-CSF-1R, se midió la expresión de los genes objetivo transcripcionales corriente abajo *Aif1*, *Irf8*, *Ctsel* y *Emr1* y se la comparó mediante qRT-PCR. *Ibal*, un marcador de células microgliales activadas y los núcleos celulares (DAPI) fueron teñidos por anticuerpos selectivos. La densidad de las células microgliales que expresan *Ibal* por mm² se cuantificó en el cuerpo estriado.

Ejemplo 6: Prueba de los compuestos en el modelo de ratón con fibrillas alfa-sinucleínas preformadas en la enfermedad de Parkinson

Las FPFs alfa-sinucleína de tipo silvestre de ratón recombinantes purificadas se centrifugaron a alta velocidad y se recolectó el sobrenadante. Las FPFs se juntaron en tubos de microcentrífuga y se agitaron durante 5 días (1.000 RPM). Las alícuotas se congelaron sobre hielo y se almacenaron a -80°C . Las FPFs se descongelaron a temperatura ambiente y sonicaron. La concentración de la suspensión antes del uso fue $2,5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína en PBS. Posteriormente, se anestesiaron ratones machos y/o hembras de 10 semanas de edad C57Bl/6J con ketamina/medetomidina y las FPFs se inyectaron en el cuerpo estriado derecho en las siguientes coordenadas AP $+0,2\text{ mm}$, ML $-2,0\text{ mm}$, DV $-3,0\text{ mm}$ (volumen total de $2\text{ }\mu\text{L}$ a $0,1\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$). El anticuerpo anti-CSF-1R (Ab 535; $100\text{ mg}/\text{kg}$; s.c.) se administró una vez a la semana durante un mes a partir del día posterior a la inyección de FPFs. Después de este tiempo, se evaluaron los animales en el rango de pruebas conductuales tales como Rotarod, prueba en haz [*beam test*], prueba de colgarse del alambre y análisis de la marcha. Después de las pruebas conductuales, los animales son sacrificados y sus cerebros removidos. El hemisferio derecho se fija por inmersión en 4% de PFA a fin de realizar estudios histológicos (inmunohistoquímica).

Para mostrar las consecuencias moleculares del bloqueo del receptor por el anticuerpo anti-CSF-1R, se mide la

expresión de la proteína de microglia Iba1 mediante inmunohistoquímica cuantitativa (como en el Ejemplo 4). Finalmente, también se realiza la distribución a través del cerebro de pS129 alfa-sinucleína, una medición de la alfa-sinucleína total, recuento de las neuronas dopaminérgicas en el cuerpo estriado y sustancia negra.

Ejemplo 7: Efecto protector de un anticuerpo anti-CSF-1R en las crisis epilépticas en un modelo de ratón con pilocarpina

Un grupo de ratones epilépticos con pilocarpina (preparado tal como se describe en los métodos) se sometió a un monitoreo continuo para confirmar que presentan crisis espontáneas y recurrentes antes de ingresar en el estudio de eficacia. El monitoreo de las crisis se llevó a cabo con un sistema patentado (UCB Pharma) utilizando el registro simultáneo de la actividad locomotora con acelerómetro 3D y videocámaras. Este sistema permite la detección automatizada de crisis conductuales mediante el análisis de la señal del acelerómetro. Todas las crisis conductuales identificadas por el algoritmo de detección luego fueron clasificadas por personal técnico experimentado durante una revisión cuidadosa de las secuencias de video correspondientes. Después de confirmar la presencia de crisis espontáneas y recurrentes, los ratones (n=64) se

sometieron a un monitoreo continuo durante 14 días con el mismo sistema para establecer la frecuencia inicial de las crisis antes de comenzar el tratamiento. Posteriormente, los ratones (n=32 por grupo) se trataron con IgG control o bien con anticuerpos anti-CSF-1R (100 mg/kg), dos veces por semana (4 inyecciones en total) durante otros 14 días de monitoreo continuo de las crisis. Luego, se calculó el porcentaje de cambio en la frecuencia de las crisis de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cambio de la frecuencia de las crisis} = (\text{frecuencia de las crisis durante el tratamiento} / \text{frecuencia de las crisis al inicio del estudio}) \times 100$$

La inyección con el anticuerpo de IgG control condujo a un aumento de la frecuencia de las crisis vs. al inicio del estudio, mientras que no se observó dicho incremento después del tratamiento con anticuerpo anti-CSF-1R. En consecuencia, se observó una diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias de las crisis durante la fase de tratamiento al comparar los grupos control y de anticuerpo activo (Figura 7).