

(11) Número de Publicação: **PT 1888113 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/28 (2014.01) **A61P 35/00** (2014.01)
A61K 39/395 (2014.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2006.05.25	(73) Titular(es): BIOGEN IDEC MA INC. 14 CAMBRIDGE CENTER CAMBRIDGE, MA 02142 US
(30) Prioridade(s): 2005.05.27 US 685149 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.02.20	
(45) Data e BPI da concessão: 2014.06.25 169/2014	(72) Inventor(es): ELLEN GARBER US LINDA C. BURKLY US ALEXEY LUGOVSKOY US
	(74) Mandatário: ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS DE LIGAÇÃO A TWEAK**

(57) Resumo:
SÃO DESCRITOS ANTICORPOS ANTI-TWEAK.

RESUMO

"ANTICORPOS DE LIGAÇÃO A *TWEAK*"

São descritos anticorpos anti-*Tweak*.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS DE LIGAÇÃO A *TWEAK*"

ANTECEDENTES

As citocinas relacionadas com o factor de necrose tumoral (TNF) são uma superfamília de proteínas que têm uma série de funções, incluindo aquelas envolvidas na regulação imune e regulação da apoptose. O *TWEAK* (indutor fraco da apoptose semelhante ao TNF) é um membro desta superfamília.

SUMÁRIO

Os anticorpos anti-*TWEAK* podem ser utilizados para tratar uma variedade de condições e distúrbios, e. g., um distúrbio inflamatório, um distúrbio neuronal ou outro distúrbio aqui descrito. Quando utilizado para tratar um indivíduo humano, o anticorpo é, de um modo preferido, um anticorpo humano, humanizado ou de outro modo eficazmente humano.

Com base na divulgação que está aqui contida, a presente invenção proporciona uma proteína isolada compreendendo uma sequência do domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina e uma sequência do domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina que pode formar um sítio de ligação de antigénio que se liga ao *TWEAK* (indutor fraco da apoptose semelhante ao TNF) humano, em que:

(a) a sequência do domínio variável da cadeia pesada da proteína compreende as seguintes regiões determinantes de complementaridade (CDR):

CDRH1 compreendendo a sequência de aminoácidos:
GFTFSRYAMS (SEQ ID N°: 1);

CDRH2 compreendendo a sequência de aminoácidos:
EISSGGSYPYYPDTVTG (SEQ ID N°: 2); e

CDRH3 compreendendo a sequência de aminoácidos:
VLYYDYDGDRIEVM DY (SEQ ID N°: 3);

(b) a sequência do domínio variável da cadeia leve da proteína compreende as seguintes CDR:

CDRL1 compreendendo a sequência de aminoácidos:
RSSQSLVSSKGNTILH (SEQ ID N°: 8);

CDRL2 compreendendo a sequência de aminoácidos:
KVSNRFS (SEQ ID N°: 9); e

CDRL3 compreendendo a sequência de aminoácidos:
SQSTHFPRT (SEQ ID N°: 10).

A presente invenção e as formas de realização da mesma são explicitadas nas reivindicações anexas.

A proteína é também aqui referida como "anticorpo anti-TWEAK".

Numa forma de realização, o anticorpo é um fragmento de ligação a antigénio de um anticorpo inteiro, e. g., um fragmento Fab, F(ab')₂, Fv ou Fv de cadeia simples. Tipicamente, o anticorpo é um anticorpo inteiro. O anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal ou um anticorpo mono-específico. Por exemplo, o anticorpo está numa composição que inclui menos de 20 outras espécies de anticorpos anti-TWEAK, e. g., numa composição que não inclui outras espécies de anticorpos anti-TWEAK.

O anticorpo pode ser eficazmente humano. Um anticorpo "eficazmente humano" é um anticorpo que inclui um número suficiente de posições de aminoácidos humanas de tal forma que o anticorpo não desencadeia uma resposta imunogénica num humano normal. De um modo preferido, a proteína não induz uma resposta de anticorpos de neutralização, e. g., a resposta de anticorpos humanos anti-murídeos (HAMA). A HAMA pode ser problemática num número de circunstâncias, e. g., se se pretende administrar os anticorpos repetidamente, e. g., no tratamento de uma condição patológica crónica ou recorrente. Uma resposta HAMA pode tornar a administração repetida de anticorpo potencialmente ineficaz devido a uma maior eliminação do anticorpo a partir do soro (ver, e. g., Saleh et al., Cancer Immunol. Immunother., 32:180-190 (1990)) e também devido a potenciais reacções alérgicas (ver, e. g., LoBuglio et al. (1986) Hybridoma, 5:5117-5123).

Por exemplo, o anticorpo pode ser um anticorpo humano, humanizado, enxertado em CDR, quimérico, mutado, amadurecido por afinidade, desimunizado, sintético ou gerado de outro modo *in vitro*, e suas combinações. Numa forma de realização, o anticorpo anti-TWEAK é um anticorpo humanizado.

As cadeias pesada e leve do anticorpo anti-*TWEAK* podem ser substancialmente inteiras. A proteína pode incluir pelo menos uma, e de um modo preferido duas, cadeias pesadas completas, e pelo menos uma e, de um modo preferido, duas cadeias leves completas) ou podem incluir um fragmento de ligação a antígeno (e. g., um fragmento Fab, F(ab')₂, Fv ou Fv de cadeia simples). Ainda noutras formas de realização, o anticorpo tem uma região constante da cadeia pesada escolhida de, e. g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE; particularmente, escolhida de, e. g., IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, mais particularmente, IgG1 (e. g., IgG1 humana). Tipicamente, a região constante da cadeia pesada é uma região constante humana ou uma forma modificada de uma região constante humana. Noutra forma de realização, o anticorpo tem uma região constante da cadeia leve escolhida de, e. g., kappa ou lambda, particularmente, kappa (e. g., kappa humana).

A proteína pode incluir uma das seguintes sequências:

- DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVSSKGNLYLHWYLQKPGQSP
QLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTH
FPRT (SEQ ID N^o: 17)
- DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVSSKGNLYLHWYLQKPGQSP
QLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTH
FPRT (SEQ ID N^o: 18)
- DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSSKGNLYLHWYQQRPGQSP
RRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTH
FPRT (SEQ ID N^o: 19)

- DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWFQQRPGQSP
RRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTH
FPRT (SEQ ID N°: 20)
- DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWYLQKPGQSP
QLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTH
FPRT (SEQ ID N°: 21)
- DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWYLQKPGQPP
QLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTH
FPRT (SEQ ID N°: 22)
- DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWYLQKPGQSP
QLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTH
FPRT (SEQ ID N°: 23)
- DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWYLQKPGQSP
QLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTH
FPRT (SEQ ID N°: 24)
- DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWLQQRPGQPP
RRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTH
FPRT (SEQ ID N°: 25)
- DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVSSKGNTYLHWYQQKPGKAP
KLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTH
FPRT (SEQ ID N°: 26)

ou uma sequência que tem menos do que oito, sete, seis, cinco, quatro, três ou duas alterações (e. g., substituições, inserções ou supressões, e. g., substituições conservadoras ou uma

substituição por um resíduo de aminoácido numa posição correspondente no P2D10, huP2D10-L1 ou huP2D10-L2). As substituições ilustrativas são numa das seguintes posições de Kabat: 2, 4, 6, 35, 36, 38, 44, 47, 49, 62, 64-69, 85, 87, 98, 99, 101 e 102. As substituições podem, por exemplo, substituir um ou mais aminoácidos do P2D10 pelas posições correspondentes de uma região estrutural, e. g., uma região estrutural humana, e. g., na FR2 (e. g., na posição 46 em relação a Phe de acordo com a numeração consecutiva) e na FR3 (e. g., na posição 87 em relação a Phe).

A proteína pode incluir uma das seguintes sequências no domínio variável da cadeia pesada:

- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFSRYAMSWVRQAPGQGLEWMG
EISSGGSYPPYPDTVTGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID Nº: 27)

- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFSRYAMSWVRQAPGQRLEWMG
EISSGGSYPPYPDTVTGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID Nº: 28)

- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFSRYAMSWVRQATGQGLEWMG
EISSGGSYPPYPDTVTGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID Nº: 29)

- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFSRYAMSWVRQAPGQGLEWMG
EISSGGSYPPYPDTVTGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID Nº: 30)

- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSQFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWMG
EISSGGSYPPYPDTVTGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 31)
- QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTFSRYAMSWVRQAPGQALEWMG
EISSGGSYPPYPDTVTGRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 32)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSRYAMSWVRQAPGQGLEWMG
EISSGGSYPPYPDTVTGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 33)
- QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFSRYAMSWVRQARGQRLEWIG
EISSGGSYPPYPDTVTGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAA
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 34)
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVA
EISSGGSYPPYPDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDVAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 35)
- EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVS
EISSGGSYPPYPDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDVAVYYCAK
DVLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 36)
- QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVS
EISSGGSYPPYPDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDVAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 37)
- EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVG
EISSGGSYPPYPDTVTGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDVAVYYCTT
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 38)

- EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVS
EISSGGSYPYYPDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 39)
- EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVS
EISSGGSYPYYPDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 40)

- EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVS
EISSGGSYPYYPDTVTGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 41)
- QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVA
EISSGGSYPYYPDTVTGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 42)

- QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVA
EISSGGSYPYYPDTVTGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 43)

- QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVA
EISSGGSYPYYPDTVTGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 44)

- QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVA
EISSGGSYPYYPDTVTGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 45)

- EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVS
EISSGGSYPYYPDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK
DVLVYDYDGDRIE (SEQ ID N°: 46)

- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVS
EISSGGSYPYPDTVTGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID Nº: 47)
-
- EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSRYAMSWFRQAPGKGLEWVG
EISSGGSYPYPDTVTGRFTISR DGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID Nº: 48)
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEIVS
EISSGGSYPYPDTVTGRFTISR DNSKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCAR
VLYYDYDGDRIE (SEQ ID Nº: 49)

ou uma sequência que tem menos do que oito, sete, seis, cinco, quatro, três ou duas alterações (e. g., substituições, inserções ou supressões, e. g., substituições conservadoras ou uma substituição por um resíduo de aminoácido numa posição correspondente no P2D10). As substituições ilustrativas são numa das seguintes posições de Kabat: 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94, 103, 104, 106 e 107. As substituições podem, por exemplo, substituir um ou mais aminoácidos do P2D10 pelas posições correspondentes de uma região estrutural, e. g., uma região estrutural humana.

Numa forma de realização, a região estrutural da cadeia pesada (e. g., FR1, FR2, FR3, individualmente, ou uma sequência abrangendo FR1, FR2, e FR3, mas excluindo as CDR) inclui uma sequência de aminoácidos, a qual é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à região estrutural da cadeia pesada de uma das seguintes sequências do segmento V da linha germinal: DP-25, DP-1, DP-12, DP-9, DP-7, DP-31, DP-32, DP-33, DP-58, DP-54, outra sequência da linha germinal do subgrupo VH I, outra sequência da linha germinal do subgrupo

VH III, ou outro gene V que é compatível com a estrutura canónica da classe 1-3 (ver, e. g., Chothia et al., (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817; Tomlinson et al., (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798). Outras regiões estruturais compatíveis com a estrutura canónica da classe 1-3 incluem regiões estruturais com um ou mais dos resíduos seguintes de acordo com a numeração de Kabat: Ala, Gly, Thr ou Val na posição 26; Gly na posição 26; Tyr, Phe ou Gly na posição 27; Phe, Val, Ile ou Leu na posição 29; Met, Ile, Leu, Val, Thr, Trp ou Ile na posição 34; Arg, Thr, Ala, Lys na posição 94; Gly, Ser, Asn ou Asp na posição 54; e Arg na posição 71.

Numa forma de realização, a região estrutural da cadeia leve (e. g., FR1, FR2, FR3, individualmente, ou uma sequência abrangendo as FR1, FR2 e FR3, mas excluindo as CDR) inclui uma sequência de aminoácidos, a qual é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à região estrutural da cadeia leve de uma sequência da linha germinal do subgrupo Vk II ou uma das seguintes sequências do segmento V da linha germinal: A17, A1, A18, A2, A19/A3, A23, uma sequência da linha germinal do subgrupo Vk I (e. g., uma sequência DPK9), ou outro gene V que é compatível com a estrutura canónica da classe 4-1 (ver, e. g., Tomlinson et al., (1995) EMBO J. 14:4628). Outras regiões estruturais compatíveis com a estrutura canónica da classe 4-1 incluem regiões estruturais com um ou mais dos resíduos seguintes de acordo com a numeração de Kabat: Val ou Leu ou Ile na posição 2; Ser ou Pro na posição 25; Ile ou Leu na posição 27b; Gly na posição 29; Phe ou Leu na posição 33; e Phe na posição 71. Além disso, de acordo com a numeração de Kabat, a posição 48 pode ser Ile ou Val.

Noutra forma de realização, a região estrutural da cadeia leve (e. g., FR1, FR2, FR3, individualmente, ou uma sequência abrangendo as FR1, FR2, e FR3, mas excluindo as CDR) inclui uma sequência de aminoácidos, a qual é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à região estrutural da cadeia leve de uma sequência da linha germinal do subgrupo V_k I, e. g., uma sequência DPK9.

Numa forma de realização, a região estrutural variável da cadeia leve ou pesada (e. g., a região abrangendo pelo menos as FR1, FR2, FR3 e, opcionalmente, FR4) pode ser escolhida de: (a) uma região estrutural variável da cadeia leve ou pesada incluindo pelo menos 80%, 90%, 95% ou, de um modo preferido, 100% dos resíduos de aminoácidos de uma região estrutural variável da cadeia leve ou pesada humana, e. g., um resíduo estrutural variável da cadeia leve ou pesada de um anticorpo humano maduro, uma sequência da linha germinal humana, uma sequência consenso humana ou um anticorpo humano aqui descrito; (b) uma região estrutural variável da cadeia leve ou pesada incluindo desde 20% a 80%, 40% a 60%, 60% a 90%, ou 70% a 95% dos resíduos de aminoácidos de uma região estrutural variável da cadeia leve ou pesada humana, e. g., um resíduo estrutural variável da cadeia leve ou pesada de um anticorpo humano maduro, uma sequência da linha germinal humana, uma sequência consenso humana; (c) uma região estrutural não humana (e. g., uma região estrutural de roedor); ou (d) uma região estrutural não humana que foi modificada, e. g., para remover determinantes antigênicos ou citotóxicos, e. g., desimunizada ou parcialmente humanizada. Numa forma de realização, a sequência do domínio variável da cadeia pesada inclui resíduos humanos ou resíduos da sequência consenso humana em uma ou mais das seguintes posições (de um modo preferido pelo menos cinco, dez, doze ou todas): (na

FR do domínio variável da cadeia leve) 4L, 35L, 36L, 38L, 43L, 44L, 58L, 46L, 62L, 63L, 64L, 65L, 66L, 67L, 68L, 69L, 70L, 71L, 73L, 85L, 87L, 98L, e/ou (na FR do domínio variável da cadeia pesada) 2H, 4H, 24H, 36H, 37H, 39H, 43H, 45H, 49H, 58H, 60H, 67H, 68H, 69H, 70H, 73H, 74H, 75H, 78H, 91H, 92H, 93H e/ou 103H (de acordo com a numeração de Kabat).

Numa forma de realização, um ou ambos os domínios variáveis incluem posições de aminoácidos na região estrutural que são provenientes de várias maneiras de um anticorpo murídeo (e. g., P2D10) e um anticorpo humanizado (e. g., 56-84m e K107) ou sequência da linha germinal. Por exemplo, o domínio variável incluirá um número de posições nas quais o aminoácido é idêntico ao anticorpo murídeo e ao anticorpo humano (ou sequência da linha germinal) porque os dois são idênticos nessa posição. Nas restantes posições da região estrutural onde a murídea e humana diferem, pelo menos 50, 60, 70, 80 ou 90% das posições do domínio variável são, de um modo preferido, idênticas ao anticorpo humano (ou sequência da linha germinal), ao contrário do murídeo. Nenhuma, ou pelo menos uma, duas, três ou quatro dessas posições estruturais remanescentes podem ser idênticas ao anticorpo murídeo, ao contrário do anticorpo humano. Por exemplo, na FR1 da HC, uma ou duas dessas posições podem ser murídeas; na FR2 da HC, uma ou duas dessas posições podem ser murídeas; na FR3, uma, duas, três ou quatro dessas posições podem ser murídeas; na FR1 da LC, uma, duas, três ou quatro dessas posições podem ser murídeas; na FR2 da LC, uma ou duas dessas posições podem ser murídeas; na FR3 da LC, uma ou duas dessas posições podem ser murídeas.

O anticorpo anti-*TWEAK* pode ser derivatizado ou ligado a outra molécula funcional, e. g., outro péptido, proteína ou

composto. Por exemplo, o anticorpo pode ser funcionalmente ligado (e. g., por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais de outras entidades moleculares, tais como outro anticorpo (e. g., um anticorpo biespecífico ou multiespecífico), toxinas, radioisótopos, polímeros, agentes citotóxicos ou citostáticos, entre outros.

Noutro aspecto, a divulgação proporciona composições, e. g., composições farmacêuticas, que incluem um transportador farmacêuticamente aceitável e o anticorpo anti-*Tweak* aqui descrito.

O anticorpo anti-*TWEAK* (e. g., uma composição farmacêutica do mesmo) é para ser administrado a um indivíduo que necessita de uma terapia de anticorpo anti-*TWEAK* ou cuja condição seria melhorada pelo anticorpo. Por exemplo, o anticorpo anti-*TWEAK* pode ser administrado a um indivíduo que sofre ou está em risco de sofrer um distúrbio inflamatório, distúrbio imunológico, distúrbio auto-imune, distúrbio neuronal, um distúrbio neoplásico ou outro distúrbio aqui descrito. Numa forma de realização, um anticorpo anti-*TWEAK* aqui descrito é para ser utilizado no tratamento de um distúrbio inflamatório, distúrbio imunológico, distúrbio auto-imune, distúrbio neuronal, um distúrbio neoplásico ou outro distúrbio aqui descrito.

Noutro caso, a divulgação apresenta um método de tratamento de um distúrbio associado ao *TWEAK*, num indivíduo. O método inclui: administrar ao indivíduo um anticorpo anti-*TWEAK*, numa quantidade suficiente para tratar (e. g., melhorar ou prevenir) o distúrbio associado ao *TWEAK*. O anticorpo anti-*TWEAK* pode ser administrado ao indivíduo, sozinho ou em associação com outras

modalidades terapêuticas como aqui descritas. Num caso, o indivíduo é um mamífero, e. g., um humano, e. g., um humano possuindo um distúrbio associado ao *TWEAK*, e. g., um distúrbio aqui divulgado. O anticorpo pode ser utilizado para melhorar um ou mais sintomas desses distúrbios. O termo "tratar" refere-se à administração de uma terapia numa quantidade, maneira e/ou modo eficaz para melhorar ou prevenir uma condição, sintoma ou parâmetro associado a um distúrbio (e. g., um distúrbio aqui descrito) ou para prevenir o início, progressão ou exacerbação do distúrbio, num grau estatisticamente significativo ou num grau detectável para um especialista na técnica. Por conseguinte, o tratamento pode conseguir vantagens terapêuticas e/ou profiláticas. Uma quantidade, maneira ou modo eficaz pode variar dependendo do indivíduo e pode ser adaptada ao indivíduo. Num caso, um anticorpo anti-*TWEAK* aqui descrito é utilizado para a preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio associado ao *TWEAK*.

A divulgação apresenta um método de modulação da interacção entre o *TWEAK* e uma proteína receptora de *TWEAK*. Por exemplo, um anticorpo anti-*TWEAK* pode ser utilizado para reduzir ou inibir a ligação, entre o *TWEAK* e um receptor de *TWEAK*, tal como o Fn14. O método compreende pôr o *TWEAK* ou um complexo que contém *TWEAK* em contacto com o anticorpo. O método pode ser utilizado em células *in vitro* e. g., em cultura, e. g., *in vitro* ou *ex vivo*. Por exemplo, células que expressam o receptor de *TWEAK* podem ser cultivadas *in vitro* em meio de cultura e o passo de colocação em contacto pode ser efectuado adicionando um anticorpo anti-*TWEAK* ao meio de cultura. Alternativamente, o método pode ser realizado em células presentes num indivíduo, e. g., como parte de um protocolo *in vivo* (e. g., terapêutico ou profilático). Por exemplo, o anticorpo anti-*TWEAK* pode ser administrado por

via local ou sistémica. Num caso, um anticorpo anti-*TWEAK* aqui descrito é utilizado para a preparação de um medicamento para modular a interacção entre o *TWEAK* e uma proteína receptora de *TWEAK*.

O método pode incluir pôr o *TWEAK* em contacto com o complexo receptor de *TWEAK*, ou sua subunidade, sob condições que permitem uma interacção entre o *TWEAK* e o complexo receptor de *TWEAK*, ou sua subunidade, para desse modo formar uma mistura *TWEAK*/receptor de *TWEAK*. Em geral, o anticorpo anti-*TWEAK* é proporcionado numa quantidade eficaz, e. g., para que ao pôr a mistura *TWEAK*/receptor de *TWEAK* em contacto com o anticorpo anti-*TWEAK* module, e. g., interfira com (e. g., iniba, bloqueie ou, de outro modo, reduza) a interacção entre o *TWEAK* e a proteína receptora ou, pelo menos, uma função do *TWEAK*, e. g., sinalização mediada pelo *TWEAK*.

A divulgação também apresenta ácidos nucleicos compreendendo sequências de nucleótidos, os quais codificam regiões variáveis das cadeias pesada e leve dos anticorpos anti-*TWEAK*, e. g., como aqui descritos. Por exemplo, a divulgação apresenta um primeiro e segundo ácido nucleico que codifica regiões variáveis das cadeias pesada e leve, respectivamente, do P2D10. Noutro caso, a divulgação apresenta células hospedeiras e vectores contendo os ácidos nucleicos aqui descritos.

A divulgação também apresenta o epítipo de *TWEAK*, e. g., *TWEAK* humano, reconhecido pelo P2D10 e proteínas capazes de interagir com o epítipo. Por exemplo, as proteínas e péptidos que incluem o epítipo podem ser utilizados para gerar ou pesquisar outros compostos de ligação que interagem com o

epítopo, e. g., proteínas, tais como anticorpos ou moléculas pequenas. Por exemplo, um péptido que inclui o epítopo pode ser utilizado como um imunogénio ou como um alvo para pesquisar uma biblioteca de expressão. Também se pode avaliar os compostos quanto à sua aptidão para interagir com o péptido ou, por mapeamento ou determinação da estrutura, avaliar os compostos quanto à sua aptidão para interagir com o epítopo, e. g., no contexto de um *TWEAK* maduro. Uma avaliação ilustrativa inclui determinar se o composto pode interagir com o *TWEAK* na presença de um anticorpo P2D10 de competição.

São também divulgados métodos para administrar ou direccionar um agente, e. g., um agente terapêutico (incluindo um agente genético) ou citotóxico, com um anticorpo anti-*TWEAK* (e. g., P2D10 ou outro anticorpo aqui descrito) para uma célula ou estrutura que expressa *TWEAK in vivo*.

Como aqui utilizado, o termo "anticorpo" refere-se a uma proteína que inclui pelo menos uma região variável de imunoglobulina, e. g., uma sequência de aminoácidos que proporciona um domínio variável de imunoglobulina ou uma sequência do domínio variável de imunoglobulina. Por exemplo, um anticorpo pode incluir uma região variável da cadeia pesada (H) (aqui abreviada como VH), e uma região variável da cadeia leve (L) (aqui abreviada como VL). Noutro exemplo, um anticorpo inclui duas regiões variáveis da cadeia pesada (H) e duas regiões variáveis da cadeia leve (L). O termo "anticorpo" abrange fragmentos de ligação a antigénio dos anticorpos (e. g., anticorpos de cadeia simples, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv e fragmentos dAb) bem como anticorpos inteiros, e. g., imunoglobulinas inteiras dos tipos IgA, IgG (e. g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgM (bem

como subtipos das mesmas). A expressão "anticorpo inteiro" refere-se a um anticorpo possuindo pelo menos 96% do comprimento de um anticorpo natural que é processado para remover quaisquer sequências sinal. Um anticorpo inteiro pode incluir o comprimento total do anticorpo natural, e. g., os resíduos do resíduo amino terminal de um anticorpo natural (e. g., uma IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) até ao seu resíduo carboxilo terminal.

Uma "sequência do domínio variável de imunoglobulina" refere-se a uma sequência de aminoácidos que pode formar a estrutura de um domínio variável de imunoglobulina. Por exemplo, a sequência pode incluir a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos de um domínio variável natural. Por exemplo, a sequência pode, ou não, incluir um, dois ou mais aminoácidos N- ou C-terminais, ou pode incluir outras alterações que são compatíveis com a formação da estrutura da proteína.

Uma "composição isolada" refere-se a uma composição que é retirada de pelo menos 90% de, pelo menos, uma componente de uma amostra natural a partir da qual a composição isolada pode ser obtida. As composições produzidas artificial ou naturalmente podem ser "composições de pelo menos" um certo grau de pureza se a espécie ou população da espécie de interesse é pelo menos 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 95, 98 ou 99% pura numa base de peso-peso.

Um "epítopo" refere-se ao sítio num composto alvo que é ligado por um anticorpo. No caso de o composto alvo ser uma proteína, por exemplo, um epítopo pode referir-se aos aminoácidos (particularmente cadeias laterais de aminoácidos) que são ligados pelo anticorpo. Os epítopos sobrepostos incluem

pelo menos um resíduo de aminoácido comum, e. g., pelo menos 2, 3, 4 ou 5 resíduos de aminoácidos comuns.

Como aqui utilizado, a expressão "hibridiza sob condições de baixa estringência, estringência média, alta estringência, ou estringência muito alta" descreve condições de hibridização e lavagem. Orientações para realizar reacções de hibridização podem ser encontradas em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.I. (1989), 6.3.1-6.3.6. A esse respeito encontram-se descritos, e podem ser utilizados, métodos aquosos e não aquosos. As condições de hibridização específicas aqui referidas são como se segue: 1) condições de hibridização de baixa estringência em cloreto de sódio/citrato de sódio 6X (SSC), a cerca de 45 °C, seguida de duas lavagens em SSC 0,2X, 0,1 % de SDS pelo menos a 50 °C (a temperatura das lavagens pode ser aumentada até 55 °C para condições de baixa estringência); 2) condições de hibridização de estringência média em SSC 6X, a cerca de 45 °C, seguida de uma ou mais lavagens em SSC 0,2X, 0,1 % de SDS a 60 °C; 3) condições de hibridização de alta estringência em SSC 6X, a cerca de 45 °C, seguida de uma ou mais lavagens em SSC 0,2X, 0,1% de SDS, a 65 °C; e de um modo preferido 4) condições de hibridização de estringência muito alta são fosfato de sódio 0,5M, 7% de SDS, a 65 °C, seguida de uma ou mais lavagens a SSC 0,2X, 1% de SDS, a 65 °C. As condições de alta estringência (3) são as condições preferidas e aquelas que devem ser utilizadas, salvo especificação em contrário.

Um "distúrbio associado a *TWEAK*" é qualquer distúrbio no qual o *TWEAK* contribui para a etiologia ou um distúrbio cuja condição, sintomas ou risco de início é modificado pelo fornecimento de um agente bloqueador de *TWEAK*.

Salvo indicação em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que geralmente entendidos por um técnico médio na matéria à qual pertence esta invenção. Embora possam ser utilizados métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos na prática ou testes aqui descritos, os métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Além disso, as formas de realização da invenção descritas em relação às CDR de Chothia podem ser também implementadas utilizando CDR de Kabat.

No caso de conflito, a presente descrição, incluindo definições, prevalece. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não pretendem ser limitativos.

DESCRIÇÃO DETALHADA

O P2D10 é um anticorpo murídeo ilustrativo que se liga especificamente ao *TWEAK* humano e inibe a função do *TWEAK*. São também divulgadas variantes do anticorpo P2D10, incluindo variantes humanizadas ilustrativas. Estes anticorpos, outros anticorpos anti-*TWEAK* e outros agentes bloqueadores de *TWEAK* podem ser utilizados para tratar ou prevenir distúrbios mediados por *TWEAK*, e. g., distúrbios inflamatórios e outros distúrbios aqui divulgados.

Anticorpos Anti-TWEAK

Esta divulgação inclui as sequências de exemplos específicos de anticorpos anti-TWEAK, tais como P2D10, huP2D10-1 e huP2D10-2. Os anticorpos particulares, tais como estes, podem ser produzidos, por exemplo, preparando e expressando genes sintéticos que codificam as sequências de aminoácidos especificadas ou mutando genes da linha germinal humana para proporcionar um gene que codifica as sequências de aminoácidos especificadas. Além do mais, estes anticorpos e outros anticorpos anti-TWEAK podem ser produzidos, e. g., utilizando um ou mais dos seguintes métodos.

Estão disponíveis numerosos métodos para obter anticorpos, particularmente anticorpos humanos. Um método ilustrativo inclui a pesquisa de bibliotecas de expressão de proteínas, e. g., bibliotecas de apresentação em fago ou ribossoma. A apresentação em fagos é descrita, por exemplo, nos documentos U.S. 5223409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; documentos WO92/18619; WO91/17271; WO92/20791; WO92/15679; WO93/01288; WO92/01047; WO92/09690; e WO90/02809. A apresentação de Fab em fagos é descrita, e. g., nas Pat. U.S. nº 5658727; 5667988; e 5885793.

Além da utilização de bibliotecas de apresentação podem ser utilizados outros métodos para obter um anticorpo de ligação a TWEAK. Por exemplo, a proteína TWEAK ou um péptido da mesma pode ser utilizada como um antigénio num animal não humano, e. g., um roedor, e. g., um ratinho, hamster ou rato.

O animal não humano inclui pelo menos uma parte de um gene da imunoglobulina humana. Por exemplo, é possível manipular estirpes de ratinhos deficientes em termos de produção de

anticorpos de ratinho com fragmentos grandes dos *loci* de Ig humana. Utilizando a tecnologia de hibridoma podem ser produzidos e seleccionados anticorpos monoclonais específicos para antigénios derivados dos genes com a especificidade desejada. Ver, e. g., XENOMOUSE™, Green et al., (1994) Nature Genetics 7:13-21, documentos U.S. 2003-0070185, WO96/34096 e WO96/33735.

Noutro caso, um anticorpo monoclonal é obtido do animal não humano e, em seguida, modificado, e. g., humanizado ou desimmunizado. Winter descreve um método de enxerto de CDR ilustrativo que pode ser utilizado para preparar os anticorpos humanizados aqui descritos (documento U.S. 5225539). Todas ou algumas das CDR de um anticorpo particular humano podem estar substituídas com pelo menos uma porção de um anticorpo não humano. Pode ser apenas necessário substituir as CDR necessárias para ligação ou os determinantes de ligação dessas CDR para chegar a um anticorpo humanizado útil que se liga a *TWEAK*.

Os anticorpos humanizados podem ser gerados substituindo sequências da região variável de Fv que não estão directamente envolvidas na ligação ao antigénio por sequências equivalentes de regiões variáveis de Fv humano. Os métodos gerais para gerar anticorpos humanizados são proporcionados por Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207, por Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214, e pelos documentos US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 5859205; e US 6407213. Aquelles métodos incluem o isolamento, manipulação e expressão das sequências de ácidos nucleicos que codificam a totalidade ou parte das regiões variáveis de Fv de imunoglobulina de pelo menos uma de uma cadeia pesada ou leve. As fontes de tais ácidos nucleicos são bem conhecidas dos especialistas na técnica e, por exemplo, podem ser obtidas a

partir de um hibridoma que produz um anticorpo contra um alvo predeterminado, como descrito acima, a partir de genes de imunoglobulina da linha germinal ou de construções sintéticas. O ADN recombinante que codifica o anticorpo humanizado pode ser depois clonado num vector de expressão apropriado.

As sequências das linhas germinais humanas são divulgadas, por exemplo, em Tomlinson, I.A. *et al.*, (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G. P. *et al.*, (1995) *Immunol. Today* 16:237-242; Chothia, D. *et al.*, (1992) *J. Mol. Bio.* 227:799-817; e Tomlinson *et al.* (1995) *EMBO J* 14:4628-4638. O directório V BASE proporciona uma lista compreensiva de sequências de regiões variáveis de imunoglobulina humana (compilada por Tomlinson, I.A. *et al.*, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Estas sequências podem ser utilizadas como uma fonte de sequências humanas, e. g., para regiões estruturais e CDR. Podem ser também utilizadas regiões estruturais humanas consenso, e. g., como descritas na Pat. U.S. nº 6300064.

Um anticorpo de ligação a *TWEAK* não humano pode ser também modificado por supressão específica de epítomos de células T humanas ou "desimunização" pelos métodos divulgados nos documentos W098/52976 e W000/34317. Resumidamente, as regiões variáveis das cadeias pesada e leve de um anticorpo podem ser analisadas em relação a péptidos que se ligam ao MHC de Classe II; estes péptidos representam epítomos potenciais de células T (como definido nos documentos W098/52976 e W000/34317). Para detecção dos epítomos potenciais de células T pode ser aplicada uma abordagem de modelação por computador designada "atravessamento de péptidos" e, além disso, pode pesquisar-se uma base de dados de péptidos de ligação de MHC de classe II humanos em relação a motivos presentes nas sequências

V_H e V_L, como descrito nos documentos W098/52976 e W000/34317. Estes motivos ligam-se a qualquer um dos 18 alótipos DR principais do MHC de classe II, e, desse modo, constituem epítomos potenciais de células T. Os epítomos potenciais de células T detectados podem ser eliminados substituindo um pequeno número de resíduos de aminoácidos das regiões variáveis ou, de um modo preferido, por substituições de aminoácidos simples. Tanto quanto possível são feitas substituições conservadoras. Frequentemente, mas não exclusivamente, pode ser utilizado um aminoácido comum a uma posição nas sequências de anticorpos da linha germinal humana. Depois de terem sido identificadas as alterações de desimunização, os ácidos nucleicos que codificam V_H e V_L podem ser construídos por mutagênese ou outros métodos de síntese (e. g., síntese de novo, substituição de cassete, e assim por diante). Uma sequência variável mutada pode ser, opcionalmente, fundida com uma região constante humana, e. g., regiões constantes da IgG1 humana ou kappa.

Nalguns casos, um epítomo potencial de células T incluirá resíduos que são conhecidos como sendo, ou que se prevê que sejam, importantes para o funcionamento do anticorpo. Por exemplo, os epítomos potenciais de células T apresentam geralmente desvios na direcção das CDR. Além disso, os epítomos potenciais de células T podem ocorrer em resíduos estruturais importantes para a estrutura e ligação de anticorpos. Nalguns casos, as alterações para eliminar estes epítomos potenciais exigirão mais estudos, e. g., preparando e testando cadeias com e sem a alteração. Quando possível, os epítomos potenciais de células T que se sobrepõem com CDR podem ser eliminados por substituições fora das CDR. Nalguns casos, uma alteração dentro de uma CDR é a única opção e, desse modo, podem ser testadas

variantes com e sem esta substituição. Noutros casos, a substituição necessária para remover um epítopo potencial de células T está numa posição de resíduo dentro da região estrutural que pode ser crítica para ligação do anticorpo. Nestes casos são testadas variantes com e sem esta substituição. Assim, nalguns casos são concebidas várias variantes desimunizadas das regiões variáveis das cadeias pesada e leve e são testadas várias combinações da cadeia pesada/leve para identificar o anticorpo desimunizado óptimo. A escolha do anticorpo desimunizado final pode ser depois feita considerando a afinidade de ligação das várias variantes em conjunto com o grau de desimunização, em particular, o número de epítopos potenciais de células T que permanecem na região variável. A desimunização pode ser utilizada para modificar qualquer anticorpo, e. g., um anticorpo que inclui uma sequência não humana, e. g., um anticorpo sintético, um anticorpo murídeo outro anticorpo monoclonal não humano ou um anticorpo isolado de uma biblioteca de apresentação.

Podem ser também utilizados outros métodos para humanizar anticorpos. Por exemplo, outros métodos podem contribuir para a estrutura tridimensional do anticorpo, posições estruturais que estão em proximidade tridimensional com os determinantes de ligação e sequências peptídicas imunogénicas. Ver, e. g., o documento W090/07861; Pat. U.S. nº 5693762; 5 693761; 5585 089; 5530101; e 6407213; Tempest *et al.*, (1991) *Biotechnology* 9:266-271. Ainda outro método é designado "engenharia de humanização" e é descrito, por exemplo, no documento U.S. 2005-008625.

O anticorpo pode incluir uma região Fc humana, e. g., uma região Fc de tipo selvagem ou uma região Fc que inclui uma ou

mais alterações. Numa forma de realização, a região constante é alterada, e. g., mutada, para modificar as propriedades do anticorpo (e. g., para aumentar ou diminuir uma ou mais de: ligação ao receptor de Fc, glicosilação do anticorpo, o número de resíduos de cisteína, função efectora celular ou função do complemento). Por exemplo, a região constante de IgG1 humana pode ser mutada em um ou mais resíduos, e. g., um ou mais dos resíduos 234 e 237. Os anticorpos podem ter mutações na região CH2 da cadeia pesada que reduzem ou alteram a função efectora, e. g., ligação ao receptor de Fc e activação do complemento. Por exemplo, os anticorpos podem ter mutações, tais como aquelas descritas na Patente U.S. nº 5624821 e 5648260. Os anticorpos podem ter também mutações que estabilizam a ligação dissulfureto entre as duas cadeias pesadas de uma imunoglobulina, tais como mutações na região charneira de IgG4, como divulgadas na técnica (e. g., Angal et al., (1993) Mol. Immunol. 30:105-08). Ver também, e. g., documento U.S. 2005-0037000.

Maturação por Afinidade. Num caso, um anticorpo anti-TWEAK é modificado, e. g., por mutagénesis, para proporcionar um conjunto de anticorpos modificados. Os anticorpos modificados são, em seguida, avaliados para identificar um ou mais anticorpos que têm propriedades funcionais alteradas (e. g., melhor ligação, melhor estabilidade, menor antigenicidade ou maior estabilidade *in vivo*). Numa implementação é utilizada tecnologia de bibliotecas de apresentação para seleccionar ou pesquisar o conjunto de anticorpos modificados. Os anticorpos de maior afinidade são, em seguida, identificados a partir de uma segunda biblioteca, e. g., utilizando maior estringência ou condições de ligação e lavagem mais competitivas. Podem ser também utilizadas outras técnicas de pesquisa.

Nalgumas implementações, a mutagénese é dirigida a regiões que se sabe que estão, ou estão provavelmente, na interface de ligação. Se, por exemplo, as proteínas de ligação identificadas são anticorpos, então a mutagénese pode ser dirigida para as regiões CDR das cadeias pesadas ou leves como aqui descrito. Além disso, a mutagénese pode ser dirigida a regiões estruturais próximas ou adjacentes às CDR, *e. g.*, regiões estruturais, particularmente dentro de 10, 5 ou 3 aminoácidos de uma união de CDR. No caso de anticorpos, a mutagénese pode ser também limitada a uma ou algumas das CDR, *e. g.*, para introduzir melhorias passo a passo.

Num caso, a mutagénese é utilizada para tornar um anticorpo mais semelhante a uma ou mais sequências da linha germinal. Um método de linha germinal ilustrativo pode incluir: identificar uma ou mais sequências da linha germinal que são semelhantes (*e. g.*, muito semelhantes numa base de dados particular) à sequência do anticorpo isolado. Em seguida podem ser feitas mutações (ao nível dos aminoácidos) no anticorpo isolado, incrementalmente, em combinação, ou ambos. Por exemplo, é preparada uma biblioteca de ácidos nucleicos que inclui sequências que codificam algumas ou todas as mutações possíveis da linha germinal. Os anticorpos mutados são depois avaliados, *e. g.*, para identificar um anticorpo que tem um ou mais resíduos de linha germinal adicionais relativamente ao anticorpo isolado e que ainda é útil (*e. g.*, tem uma actividade funcional). Num caso, num anticorpo isolado são introduzidos tantos resíduos de linha germinal quanto possível.

Num caso, a mutagénese é utilizada para substituir ou inserir um ou mais resíduos de linha germinal numa região CDR. Por exemplo, o resíduo de CDR da linha germinal pode ser de uma

sequência da linha germinal que é semelhante (e. g., muito semelhante) à região variável a ser modificada. Após mutagénese, a actividade (e. g., ligação ou outra actividade funcional) do anticorpo pode ser avaliada para determinar se o resíduo ou resíduos de linha germinal são tolerados. Pode realizar-se mutagénese semelhante nas regiões estruturais.

A selecção de uma sequência da linha germinal pode ser realizada de vários modos. Por exemplo, uma sequência da linha germinal pode ser seleccionada se preencher critérios predeterminados quanto à selectividade ou semelhança, e. g., pelo menos uma certa percentagem identidade, e. g., pelo menos 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 99,5% de identidade, relativamente ao anticorpo não humano dador. A selecção pode ser realizada utilizando pelo menos 2, 3, 5 ou 10 sequências da linha germinal. No caso das CDR1 e CDR2, a identificação de uma sequência de linha germinal semelhante pode incluir a selecção de uma tal sequência. No caso da CDR3, a identificação de uma sequência de linha germinal semelhante pode incluir a selecção de uma tal sequência, mas pode incluir a utilização de duas sequências da linha germinal que contribuem separadamente para a porção amino-terminal e para a porção carboxi-terminal. Noutras implementações são utilizados mais do que uma ou duas sequências da linha germinal, e. g., para formar uma sequência consenso.

Noutros casos, o anticorpo pode ser modificado para ter um padrão de glicosilação alterado (i. e., alterado em relação ao padrão de glicosilação original ou nativo). Como utilizado neste contexto, "alterado" significa possuir uma ou mais unidades de hidrato de carbono suprimidas e/ou possuir um ou mais sítios de glicosilação adicionados ao anticorpo original. A adição de

sítios de glicosilação aos anticorpos presentemente divulgados pode ser conseguida alterando a sequência de aminoácidos para conter sequências consenso de sítio de glicosilação; estas técnicas são bem conhecidas na matéria. Outros meios para aumentar o número de unidades de hidrato de carbono nos anticorpos são por acoplamento químico ou enzimático de glicósidos aos resíduos de aminoácidos do anticorpo. Estes métodos são descritos, *e. g.*, no documento W087/05330, e Aplin e Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22:259-306. A remoção de quaisquer unidades de hidrato de carbono presentes nos anticorpos pode ser conseguida química ou enzimaticamente como descrito na técnica (Hakimuddin *et al.*, (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52; Edge *et al.*, (1981) *Anal. Biochem.* 118:131; e Thotakura *et al.*, (1987) *Meth. Enzymol.* 138:350). Ver, *e. g.*, Pat. U.S. nº 5869046 para uma modificação que aumenta a semivida *in vivo* proporcionando um epítopo de ligação ao receptor de salvamento.

Num caso, um anticorpo tem sequências de CDR que diferem apenas insubstancialmente daquelas do P2D10. As diferenças insubstanciais incluem alterações menores de aminoácidos, tais como substituições de 1 ou 2 de qualquer um de, tipicamente, 5-7 aminoácidos na sequência de uma CDR, *e. g.*, uma CDR de Chothia ou Kabat. Tipicamente, um aminoácido é substituído por um aminoácido relacionado que tem características de carga, hidrófobas ou estereoquímicas semelhantes. Tais substituições estariam dentro da perícia de um especialista. Ao contrário das CDR, podem ser feitas alterações mais substanciais nas regiões estruturais (FR) sem afectar desfavoravelmente as propriedades de ligação de um anticorpo. As alterações às FR incluem, mas não estão limitadas à, humanização de uma região estrutural de origem não humana ou manipulação de certos resíduos estruturais

que são importantes para contacto com o antigénio ou para estabilização do sítio de ligação, e. g., mudando a classe ou subclasse da região constante, mudando resíduos de aminoácidos específicos que podem alterar uma função efectora, tal como a ligação ao receptor de Fc (Lund et al., (1991) J. Immun. 147:2657-62; Morgan et al., (1995) Immunology 86:319-24), ou mudando a espécie da qual a região constante é proveniente.

Os anticorpos anti-TWEAK podem estar na forma de anticorpos inteiros, ou na forma de fragmentos de anticorpos, e. g., fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd, dAb e scFv. As formas adicionais incluem uma proteína que inclui um único domínio variável, e. g., um domínio de camelo ou camelizado. Ver, e. g., documento U.S. 2005-0079574 e Davies et al., (1996) Protein Eng. 9(6):531-7.

Produção do Anticorpo. Alguns anticorpos, e. g., Fab, podem ser produzidos em células bacterianas, e. g., células de *E. coli*. Os anticorpos podem ser também produzidos em células eucarióticas. Numa forma de realização, os anticorpos (e. g., scFv) são expressos numa célula de levedura, tal como *Pichia* (ver, e. g., Powers et al., (2001) J Immunol Methods. 251:123-35), *Hansenula* ou *Saccharomyces*.

Numa forma de realização preferida, os anticorpos são produzidos em células de mamíferos. As células hospedeiras de mamífero ilustrativas para expressar um anticorpo incluem Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo as células CHO *dhfr*⁻, descritas em Urlaub e Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas com um marcador seleccionável DHFR, e. g., como descrito em Kaufman e Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), linhas de células linfocíticas, e. g., células de

mieloma NS0 e células SP2, células COS e uma célula de um animal transgênico, e. g., um mamífero transgênico. Por exemplo, a célula é uma célula epitelial mamária.

Além da sequência de ácido nucleico que codifica o domínio de imunoglobulina diversificado, os vectores de expressão recombinantes podem ter sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vector nas células hospedeiras (e. g., origens de replicação) e genes marcadores seleccionáveis. O gene marcador seleccionável facilita a selecção das células hospedeiras no qual foi introduzido o vector (ver e. g., Pat. U.S. nº 4399216, 4634665 e 5179017). Por exemplo, tipicamente o gene marcador seleccionável confere resistência a fármacos, tal como G418, higromicina ou metotrexato, numa célula hospedeira na qual foi inserido o vector.

Num sistema ilustrativo para expressão do anticorpo, um vector de expressão recombinante que codifica a cadeia pesada do anticorpo e a cadeia leve do anticorpo é introduzido nas células CHO *dhfr*⁻ por transfecção mediada com fosfato de cálcio. No vector de expressão recombinante, os genes da cadeia pesada e leve do anticorpo são, cada, operacionalmente ligados a elementos reguladores intensificadores/promotores (e. g., derivados de SV40, CMV, adenovírus e semelhantes, tal como um elemento regulador intensificador de CMV/promotor de AdMLP ou um elemento regulador intensificador de SV40/promotor de AdMLP) para estimular níveis altos de transcrição dos genes. O vector de expressão recombinante tem também um gene de DHFR, o qual permite a selecção de células CHO que foram transfectadas com o vector utilizando selecção/amplificação de metotrexato. As células hospedeiras transformantes seleccionadas são cultivadas

para permitir a expressão das cadeias pesada e leve do anticorpo e o anticorpo é recuperado a partir do meio de cultura. São utilizadas técnicas de biologia molecular padrão para preparar o vector de expressão recombinante, transfectar as células hospedeiras, seleccionar os transformantes, cultivar as células hospedeiras e recuperar o anticorpo do meio de cultura. Por exemplo, alguns anticorpos podem ser isolados por cromatografia de afinidade com uma matriz acoplada a proteína A ou Proteína G.

Para os anticorpos que incluem um domínio Fc, o sistema de produção de anticorpo sintetiza, de um modo preferido, anticorpos nos quais a região Fc está glicosilada. Por exemplo, o domínio Fc de moléculas de IgG está glicosilado na asparagina 297 no domínio CH2. Esta asparagina é o sítio para modificar com oligossacáridos de tipo biantenal. Foi demonstrado que esta glicosilação é necessária para as funções efectoras mediadas pelos receptores Fc γ e complemento C1q (Burton e Woof (1992) *Adv. Immunol.* 51:1-84; Jefferis *et al.*, (1998) *Immunol. Rev.* 163:59-76). Numa forma de realização, o domínio Fc é produzido num sistema de expressão mamífero que glicosila apropriadamente o resíduo correspondente à asparagina 297. O domínio Fc ou outra região do anticorpo pode incluir também outras modificações pós-tradução eucarióticas.

Os anticorpos podem ser também produzidos por um animal transgénico. Por exemplo, a Pat. U.S. n° 5849992 descreve um método de expressão de um anticorpo na glândula mamária de um mamífero transgénico. É construído um transgene que inclui um promotor específico para o leite e ácidos nucleicos que codificam o anticorpo de interesse e uma sequência sinal para secreção. O leite produzido pelas fêmeas desses mamíferos transgénicos inclui, segregado no mesmo, o anticorpo de

interesse. O anticorpo pode ser purificado do leite, ou para algumas aplicações, utilizado directamente.

Caracterização

As propriedades de ligação de um anticorpo podem ser medidas por qualquer método corrente, e. g., um dos seguintes métodos: análise BIACORE™, Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência (FRET), cristalografia de raios X, análise de sequência e mutagénese de varrimento. A aptidão de uma proteína para inibir uma ou mais actividades do *TWEAK* pode ser avaliada *in vitro* ou num modelo animal de um distúrbio, e. g., um distúrbio aqui descrito. De um modo preferido, o anticorpo tem um efeito estatisticamente significativo que indica que o anticorpo inibe uma ou mais actividades do *TWEAK*.

Num caso, um anticorpo é avaliado quanto à inibição da aptidão do *TWEAK* para estimular a produção de IL-8, MMP-1, PGE2, IL-6, IP-10 e RANTES em fibroblastos dérmicos. Ver Chicheportiche *et al.*, (2002) *Arthritis Res.* 4(2):126-133 para condições de ensaio adequadas.

Noutro caso, um anticorpo é avaliado quanto à sua aptidão para inibir o *TWEAK* de estimular a proliferação de uma célula endotelial. Ver, e. g., documento U.S. 2003-0211993 o qual descreve um ensaio de proliferação (bem como outros ensaios úteis) como se segue: HVEC são aplicadas em placas microtítulo de 96 poços à subconfluência (4000 células por poço) e cultivadas de um dia para o outro em Meio CS-C sem adição dos suplementos de crescimento do fornecedor. O meio é substituído

por meio completo ou por meio basal. As células são cultivadas em meio basal com ou sem *TWEAK* (100 ng/mL), bFGF utilizando uma diluição 1/500 a 1/1000 de suplemento de crescimento bFGF (Clonetics) ou 1 ng/mL (R&D Systems), VEGF (10 ng/mL) ou combinações destes factores. Quando indicado, são também adicionados 10 µg/mL do anticorpo a ser testado ou um anticorpo de controlo. As células são incubadas, a 37 °C, com 5% de CO₂ durante três dias e a proliferação foi medida por pulsação com ³H-Timidina durante as últimas 10 horas de cultura. A radioactividade ligada às células pode ser medida com um BETAPLATE™ (EG&G Wallac, Gaithersburg, Md.). Uma diminuição na proliferação mediada por *TWEAK* ou a combinação de *TWEAK* e bFGF pode indicar que o anticorpo é eficaz no bloqueio da actividade do *TWEAK*.

Ressonância Plasmónica Superficial (SPR). A interacção de ligação de uma proteína de interesse e um alvo (e. g., *TWEAK*) pode ser analisada utilizando SPR. A SPR ou a Análise de Interação Biomolecular (BIA) detecta interacções bioespecíficas em tempo real, sem marcar qualquer um dos agentes de interacção. As alterações na massa na superfície de ligação (indicativas de uma evento de ligação) da placa de BIA resultam em alterações do índice de refração da luz próximo da superfície (o fenómeno óptico de ressonância plasmónica superficial (SPR)). As alterações na refractividade geram um sinal detectável, as quais são medidas como uma indicação das reacções em tempo real entre moléculas biológicas. Os métodos de utilização de SPR são descritos, por exemplo, na Pat. U.S. nº 5641640; Raether (1988) *Surface Plasmons* Springer Verlag; Sjolander e Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345; Szabo *et al.*, (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705 e recursos em linha proporcionados por BIAcore International AB (Uppsala, Suécia). A informação da SPR

pode ser utilizada para proporcionar uma medição exacta e quantitativa da constante de dissociação de equilíbrio (K_d), e parâmetros cinéticos, incluindo $K_{\text{associação}}$ e $K_{\text{dissociação}}$, para a ligação de um biomolécula a um alvo.

Os epítomos podem ser também mapeados directamente avaliando a aptidão de anticorpos diferentes para competir uns com os outros para ligação ao *TWEAK* (e. g., *TWEAK* humano, em particular *TWEAK* humano solúvel) utilizando técnicas cromatográficas BIAcore (Pharmacia BIAtechnology Handbook, "Epitope Mapping", Secção 6.3.2, (Maio de 1994); ver também Johne *et al.*, (1993) *J. Immunol. Methods*, 160:191-198). Orientação geral adicional para avaliar anticorpos, e. g., em ensaios de transferências de Western e imunoprecipitação, pode ser encontrada em *Antibodies: A Laboratory Manual*, ed. por Harlow e Lane, Cold Spring Harbor press (1988)).

Distúrbios Associados ao *TWEAK*

Um anticorpo anti-*TWEAK* (tal como um anticorpo aqui descrito) pode ser utilizado para tratar uma variedade de distúrbios, tal como um distúrbio associado ao *TWEAK*. Por exemplo, o anticorpo pode ser utilizado para tratar distúrbios inflamatórios, imunes ou auto-imunes em doentes, bem como distúrbios neoplásicos. Os exemplos de distúrbios inflamatórios associados ao *TWEAK* incluem artrite reumatóide, artrite psoriática, espondilite anquilosante, doença inflamatória do intestino (incluindo colite ulcerosa e doença de Crohn), psoríase ou miosite inflamatória. Ainda outros exemplos de distúrbios inflamatórios que podem ser tratados incluem histiocitose de células de Langerhans, síndrome de insuficiência

respiratória do adulto/bronquiolite obliterante, granulomatose de Wegener, vasculite, caquexia, estomatite, fibrose pulmonar idiopática, dermatomiosite ou polimiosite, esclerite não infecciosa, sarcoidose crónica com envolvimento pulmonar, síndromes mielodisplásicas/anemia refractária com excesso de blastos, colite ulcerosa, doença pulmonar obstrutiva crónica moderada a grave e arterite de células gigantes.

Um indivíduo que está em risco de ter, que foi diagnosticado ou que tem um destes distúrbios, pode ser administrado com um anticorpo anti-*TWEAK* numa quantidade e durante um período de tempo para proporcionar um efeito terapêutico global. O anticorpo anti-*TWEAK* pode ser administrado sozinho ou em associação com outros agentes. Foram descritos métodos para administrar um agente bloqueador de *TWEAK* em associação com um agente bloqueador de TNF- α . No caso de uma terapia de associação, as quantidades e tempos de administração podem ser aqueles que proporcionam, e. g., um efeito terapêutico sinérgico. Além disso, a administração do agente bloqueador de *TWEAK* (com ou sem o segundo agente) pode ser utilizada como um tratamento primário, e. g., tratamento de primeira linha ou como um tratamento secundário, e. g., para indivíduos que têm uma resposta inadequada a uma terapia anteriormente administrada (i. e., uma terapia diferente daquela com um agente bloqueador de *TWEAK*).

Artrite Reumatóide (RA)

Um anticorpo anti-*TWEAK* (tal como um anticorpo aqui descrito) pode ser utilizado para tratar artrite reumatóide e distúrbios relacionados. A artrite reumatóide ("RA") é uma

doença inflamatória crónica que provoca dor, tumefacção, rigidez e perda de função, principalmente nas articulações. A RA começa frequentemente na sinóvia, a membrana que circunda uma articulação criando um saco de protecção. Em muitos indivíduos que sofrem de RA, os leucócitos infiltram-se da circulação para a sinóvia originando inflamação anormal contínua (e. g., sinovite). Consequentemente, a sinóvia torna-se inflamada, originando calor, vermelhidão, tumefacção e dor. O colagénio na cartilagem é gradualmente destruído, estreitando o espaço articular e, eventualmente, danificando o osso. A inflamação provoca deterioração óssea erosiva na área afectada. Durante este processo, as células da sinóvia crescem e dividem-se anormalmente, tornando a sinóvia, normalmente fina, espessa e que resulta numa articulação que está dilatada e inchada ao toque.

À medida que a RA progride, as células sinoviais anormais podem invadir e destruir a cartilagem e osso da articulação. Os músculos, ligamentos e tendões circundantes que suportam e estabilizam a articulação podem tornar-se fracos e incapazes de funcionar normalmente. A RA pode também provocar perda óssea mais generalizada que pode levar à osteoporose, tornando os ossos frágeis e mais susceptíveis a fractura. Todos estes efeitos provocam a dor, deficiência e deformidades associadas à RA. As regiões que podem ser afectadas incluem os pulsos, articulação dos dedos, joelhos e bola do pé. Frequentemente podem estar envolvidas muitas articulações, e até mesmo a coluna vertebral pode ser afectada. Em cerca de 25% das pessoas com RA, a inflamação de pequenos vasos sanguíneos pode provocar nódulos, ou caroços, reumatóides sob a pele, que se formam frequentemente próximo das articulações. À medida que a doença progride, também se pode acumular líquido, particularmente nos tornozelos. Muitos

doentes com RA também desenvolvem anemia ou uma diminuição no número normal de glóbulos vermelhos.

A RA abrange um número de subtipos de doenças, tais como a síndrome de Felty, RA seronegativa, RA "clássica", RA progressiva e/ou recidivante, e RA com vasculite. Alguns especialistas classificam a doença em tipo 1 ou tipo 2. A de tipo 1, a forma menos comum, dura alguns meses, no máximo, e não deixa incapacidade permanente. A de tipo 2 é crónica e dura anos, por vezes durante toda a vida. A RA pode também manifestar-se como nódulos reumatóides subcutâneos, nódulos viscerais, vasculite que origina úlceras nas pernas ou mononeuropatia múltipla, derrames pleurais ou pericárdicos, linfadenopatia, síndrome de Felty, síndrome de Sjogren e episclerite. Estes subtipos de doença e também os indivíduos que apresentam um ou mais dos sintomas acima podem ser tratados utilizando os anticorpos aqui descritos.

A RA pode ser avaliada por uma variedade de medições clínicas. Alguns indícios ilustrativos incluem a pontuação total de Sharp (TSS), pontuação de erosão de Sharp e o índice de incapacidade HAQ. Os métodos aqui podem ser utilizados para conseguir uma melhoria de pelo menos um destes indícios. As propriedades terapêuticas de um anticorpo anti-TWEAK para o tratamento de RA podem ser avaliadas num modelo animal, e. g., utilizando o modelo de artrite induzida com colagénio (mCIA) em ratinho (ver e. g., Stuart et al., J. Clin. Invest. 69:673-683 (1982)).

Esclerose Múltipla

Um anticorpo anti-*TWEAK* (tal como um anticorpo aqui descrito) pode ser utilizado para tratar esclerose múltipla (EM) e distúrbios relacionados. A EM é uma doença do sistema nervoso central que se caracteriza por inflamação e perda de capas de mielina.

Os doentes possuindo EM podem ser identificados por critérios que estabelecem um diagnóstico de EM clinicamente definida como definidos pelo workshop sobre o diagnóstico da EM (Poser *et al.*, Ann. Neurol. (1983) 13:227). Resumidamente, um indivíduo com EM clinicamente definida teve dois ataques e evidência clínica de duas lesões ou evidência clínica de uma lesão e evidência paraclínica de outra lesão separada. A EM definida pode ser também diagnosticada pela evidência de dois ataques e bandas oligoclonais de IgG no líquido cefalorraquidiano ou por combinação de um ataque, evidência clínica de duas lesões e banda oligoclonal de IgG no líquido cefalorraquidiano.

O tratamento eficaz da esclerose múltipla pode ser examinado de vários modos diferentes. Podem ser utilizados os seguintes parâmetros para medir a eficácia do tratamento. São utilizados três critérios principais: EDSS (escala de estado de incapacidade prolongada), aspecto das exacerbações ou MRI (imagiologia por ressonância magnética). A EDSS é um meio para classificar a deficiência clínica devido a EM (Kurtzke (1983) Neurology 33:1444). São avaliados oito sistemas funcionais quanto ao tipo e gravidade da deficiência neurológica. Resumidamente, antes do tratamento, os doentes são avaliados quanto à deficiência nos seguintes sistemas: piramidal,

cerebelos, tronco cerebral, sensorial, intestino e bexiga, visual, cerebral e outros. São realizados acompanhamentos em intervalos definidos. A escala vai desde 0 (normal) até 10 (morte devido a EM). Uma diminuição na EDSS indica um tratamento eficaz (Kurtzke (1994) Ann. Neurol. 36:573-79).

Um modelo animal ilustrativo para a esclerose múltipla é o modelo experimental de encefalite auto-imune (EAE) em ratinho, e. g., como descrito em Tuohy *et al.*, (J. Immunol. (1988) 141: 1126-1130), Sobel *et al.*, (J. Immunol. (1984) 132: 2393-2401), e Traugott (Cell Immunol. (1989) 119: 114-129). Os ratinhos podem ser administrados com um anticorpo aqui descrito antes da indução de EAE. Os ratinhos são avaliados em relação a critérios característicos para determinar a eficácia do anticorpo.

Acidente Vascular Cerebral

Um anticorpo anti-*TWEAK* (tal como um anticorpo aqui descrito) pode ser utilizado para tratar um indivíduo que sofreu um acidente vascular cerebral, e. g., um acidente vascular cerebral tromboembólico ou hemorrágico (e. g., nas últimas 48, 24, 12, 8 ou 2 horas), ou para prevenir um acidente vascular cerebral, e. g., num indivíduo em risco de sofrer um acidente vascular cerebral. Acidente vascular cerebral é um termo geral para lesão cerebral aguda resultante de doença dos vasos sanguíneos. O acidente vascular cerebral pode ser classificado em pelo menos duas categorias principais: acidente vascular cerebral hemorrágico (resultante do derrame de sangue para fora dos vasos sanguíneos normais) e acidente vascular cerebral isquêmico (isquemia cerebral devido a falta de fornecimento de sangue). Alguns eventos que podem provocar acidente vascular

cerebral isquémico incluem trombose, embolia e hipoperfusão sistémica (com isquemia e hipoxia resultantes).

O acidente vascular cerebral provoca, geralmente, morte neuronal e lesão no cérebro por privação de oxigénio e eventos secundários. A área do cérebro que morre em consequência da falta de fornecimento de sangue ou outro dano é chamada um enfarte. Nalguns casos, os tratamentos aqui descritos podem ser utilizados para reduzir ou minimizar o tamanho de um enfarte, e. g., reduzir os eventos secundários que provocam a morte ou lesão neuronal.

A obstrução de uma artéria cerebral resultante de um trombo que se acumulou na parede de uma artéria cerebral é geralmente chamada trombose cerebral. Na embolia cerebral, o material oclusivo que bloqueia a artéria cerebral surge a jusante na circulação (e. g. um êmbolo é transportado para a artéria cerebral a partir do coração). Uma vez que é difícil de discernir se um acidente vascular cerebral é provocado por trombose ou embolia, o termo tromboembolismo é utilizado para cobrir ambos estes tipos de acidente vascular cerebral. A hipoperfusão sistémica pode surgir como uma consequência de menores níveis sanguíneos, hematócrito reduzido, tensão arterial baixa ou incapacidade do coração para bombear adequadamente sangue.

Além do mais, um anticorpo anti-*TWEAK* pode ser administrado como uma terapia profiláctica para o acidente vascular cerebral, ou como uma componente da mesma, e. g., a um indivíduo que sofreu um ataque isquémico transitório (TIA) ou que apresenta sintomas de TIA.

Distúrbios neuronais

Um anticorpo anti-*TWEAK* (tal como um anticorpo aqui descrito) pode ser utilizado para tratar ou prevenir distúrbios neuronais, tais como traumatismos neuronais mecânicos e distúrbios neurodegenerativos. Os exemplos de traumatismos neuronais mecânicos incluem lesão da medula espinal (SCI) e lesão traumática cerebral (TBI). Os exemplos de distúrbios neurodegenerativos incluem esclerose lateral amiotrófica (ALS), paralisia bulbar progressiva (PBP), esclerose lateral primária (PLS), atrofia muscular progressiva (PMA), doença de Parkinson, doença de Huntington (HD) e doença de Alzheimer. Num caso, o distúrbio neuronal é caracterizado principalmente pela destruição ou morte de células nervosas, e. g., de neurónios motores (e. g., ALS), de neurónios estriatais dos gânglios basais e/ou neurónios corticais (e. g., doença de Huntington), de neurónios da substância nigra (e. g., doença de Parkinson).

Cancro

O *TWEAK* e os seus receptores podem estar envolvidos no desenvolvimento de pelo menos alguns tipos de cancro, e. g., um cancro pancreático. Um anticorpo anti-*TWEAK* (tal como um anticorpo aqui descrito) pode ser utilizado para tratar ou prevenir cancros (e. g., adenocarcinomas) e outros distúrbios neoplásicos.

Composições Farmacêuticas

Um anticorpo anti-*TWEAK* (tal como um anticorpo aqui descrito) pode ser formulado como uma composição farmacêutica para administração a um indivíduo, *e. g.*, para tratar um distúrbio aqui descrito. Tipicamente, uma composição farmacêutica inclui um veículo farmacêuticamente aceitável. Como aqui utilizado, "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento da absorção, e semelhantes que são fisiologicamente compatíveis. A composição pode incluir um sal farmacêuticamente aceitável, *e. g.*, um sal de adição de ácido ou um sal de adição de base (ver *e. g.*, Berge, S.M., *et al.*, (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19).

A formulação farmacêutica é uma técnica bem estabelecida e encontra-se descrita em pormenor, *e. g.*, em Gennaro (ed.), Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^a ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7^a Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); e Kibbe (ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients* American Pharmaceutical Association, 3^a ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

As composições farmacêuticas podem estar numa variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, formas de dosagem líquidas, semi-sólidas e sólidas, tais como soluções líquidas (*e. g.*, soluções injectáveis e infusíveis), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. A forma preferida pode depender do modo de administração e aplicação

terapêutica pretendidos. Tipicamente, as composições para os agentes aqui descritos estão na forma de soluções injectáveis ou infusíveis.

Numa forma de realização, o anticorpo anti-*TWEAK* é formulado com materiais excipientes, tais como cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado, fosfato de sódio monobásico e um estabilizante. Aquele pode ser proporcionado, por exemplo, numa solução tamponada a uma concentração adequada e pode ser conservado a 2-8 °C.

Tais composições podem ser administradas por um modo parentérico (e. g., injeção intravenosa, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular). As frases "administração parentérica" e "administrado por via parentérica" como aqui utilizadas, significam modos de administração diferentes da administração entérica e tópica, geralmente por injeção, e incluem, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnóide, intraespinal, epidural e intraesternal.

A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para conservação estável a concentração alta. As soluções injectáveis estéreis podem ser preparadas incorporando um agente aqui descrito na quantidade necessária num solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, consoante necessário, seguido de esterilização por filtração. Em geral, as dispersões são preparadas incorporando

um agente aqui descrito num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem em vácuo e secagem por congelação que produzem um pó de um agente aqui descrito com qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma sua solução, previamente esterilizada por filtração. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, pela utilização de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pela utilização de tensioactivos. A absorção prolongada de composições injectáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que atrasa a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Em certas formas de realização, o anticorpo anti-*TWEAK* pode ser preparado com um veículo que protegerá o composto contra libertação rápida, tal como uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes e sistemas de administração microencapsulados. Podem ser utilizados polímeros biocompatíveis, biodegradáveis, tais como etileno acetato de vinilo, polianidridos, poli(ácido glicólico), colagénio, poliortoésteres e poli(ácido láctico). Muitos métodos para a preparação de tais formulações estão patenteados ou são geralmente conhecidos. Ver, e. g., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque (1978).

Um anticorpo anti-*TWEAK* pode ser modificado, e. g., com uma unidade que melhora a sua estabilização e/ou retenção em circulação, e. g., no sangue, soro ou outros tecidos, e. g., em

pelo menos 1,5, 2, 5, 10 ou 50 vezes. O anticorpo modificado pode ser avaliado para determinar se pode chegar aos sítios da inflamação, e. g., articulações.

Por exemplo, o anticorpo anti-*TWEAK* pode estar associado a (e. g., conjugado com) um polímero, e. g., um polímero substancialmente não antigénico, tal como um poli(óxido de alquilenos) ou um poli(óxido de etileno). Os polímeros adequados variarão substancialmente em peso. Podem ser utilizados polímeros com pesos moleculares médios numéricos que vão desde cerca de 200 até cerca de 35000 Daltons (ou cerca de 1000 até cerca de 15000 e 2000 até cerca de 12500).

Por exemplo, o anticorpo anti-*TWEAK* pode ser conjugado com um polímero solúvel em água, e. g., um polímero de polivinilo hidrófilo, e. g., poli(álcool vinílico) ou polivinilpirrolidona. Os exemplos de tais polímeros incluem homopolímeros de poli(óxido de alquilenos), tais como polietilenoglicol (PEG) ou polipropileno glicóis, polióis polioxietilenados, seus copolímeros e seus copolímeros de bloco, na condição de que seja mantida a solubilidade em água dos copolímeros de bloco. Outros polímeros úteis incluem polioxialquilenos, tais como polioxietileno, polioxipropileno, e copolímeros de bloco de polioxietileno e polioxipropileno; polimetacrilatos; carbómeros; e polissacáridos ramificados ou não ramificados.

Nalgumas implementações, o anticorpo anti-*TWEAK* pode ser também acoplado ou associado de outro modo a um marcador ou outro agente, e. g., outro agente terapêutico, tal como um agente citotóxico ou citostático, embora, em muitas formas de realização, esta configuração não seja necessária. Os exemplos de agentes citotóxicos e quimioterapêuticos incluem taxol,

citocalasina B, gramicidina D, vinblastina, doxorubicina, daunorrubicina, um maitansinóide (e. g., maitansinol ou o maitansinóide DM1, um derivado de maitansina contendo sulfidrilo), mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glucocorticóides, procaína, taxano, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina, e análogos ou seus homólogos.

Quando o anticorpo anti-*TWEAK* é utilizado em associação com um segundo agente (e. g., um anticorpo anti-TNF- α ou outro agente), os dois agentes podem ser formulados separadamente ou em conjunto. Os agentes podem ser formulados ou, de outro modo, utilizados numa quantidade sinergicamente eficaz. Pode-se também utilizar um ou ambos os agentes em quantidades inferiores àquelas que seriam utilizadas em monoterapia. Por exemplo, as respectivas composições farmacêuticas podem ser misturadas, e. g., imediatamente antes da administração e administradas em conjunto ou podem ser administradas separadamente, e. g., em tempos iguais ou diferentes.

Pode-se também utilizar outros agentes bloqueadores de *TWEAK*. O agente pode ser qualquer tipo de composto (e. g., molécula orgânica ou inorgânica pequena, ácido nucleico, proteína ou mimético peptídico) que possa ser administrado a um indivíduo. Numa forma de realização, o agente bloqueador é um produto biológico, e. g., uma proteína possuindo um peso molecular entre 5-300 kDa. Por exemplo, um agente bloqueador de *TWEAK* pode inibir a ligação de *TWEAK* a um receptor de *TWEAK*. Os agentes bloqueadores de *TWEAK* ilustrativos, que não os anticorpos que se ligam a *TWEAK*, incluem anticorpos que se ligam a *TWEAK*-R e formas solúveis do *TWEAK*-R (e. g., Fn14) que competem com o *TWEAK*-R da superfície celular para se ligar ao

TWEAK. Os outros agentes terapêuticos aqui descritos podem ser também proporcionados como uma composição farmacêutica, e. g., por métodos correntes ou o método aqui descrito.

Administração

O anticorpo anti-*TWEAK* pode ser administrado a um indivíduo, e. g., um indivíduo humano, por uma variedade de métodos. Para muitas aplicações, a via de administração é uma de: injeção ou infusão intravenosa (IV), injeção subcutânea (SC), por via intraperitoneal (IP) ou injeção intramuscular. Pode-se também utilizar a administração intra-articular. Podem ser também utilizados outros modos de administração parentérica. Os exemplos de tais modos incluem: injeção intra-arterial, intratecal, intracapsular, intra-orbital, intracardiaca, intradérmica, transtraqueal, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnóide, intraespinal, e epidural e intraesternal. Nalguns casos, a administração pode ser directamente num sítio de inflamação, e. g., uma articulação ou outro sítio inflamado.

A via e/ou modo de administração do anticorpo pode ser também adaptada ao caso particular, e. g., monitorizando o indivíduo, e. g., utilizando imagiologia tomográfica, exame neurológico e parâmetros padrão associados ao distúrbio particular, e. g., os critérios para avaliar a artrite reumatóide.

O anticorpo pode ser administrado como uma dose fixa ou numa dose de mg/kg. A dose pode ser também escolhida para reduzir ou evitar a produção de anticorpos contra o anticorpo

anti-*TWEAK*. Os regimes de dosagem são ajustados para proporcionar a resposta desejada, e. g., uma resposta terapêutica ou um efeito terapêutico combinatório. Em geral, podem ser utilizadas doses do anticorpo anti-*TWEAK* (e opcionalmente um segundo agente) que proporcionem o agente em quantidades biodisponíveis num indivíduo. Por exemplo, podem ser administradas doses na gama de 0,1-100 mg/kg, 0,5-100 mg/kg, 1 mg/kg-100 mg/kg, 0,5-20 mg/kg, 0,1-10 mg/kg ou 1-10 mg/kg. Podem ser também utilizadas outras doses.

A forma unitária de dosagem ou "dose fixa" como aqui utilizada refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto activo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico necessário e, opcionalmente, em associação com o outro agente. Podem ser dadas dosagens simples ou múltiplas. Alternativamente, ou adicionalmente, o anticorpo pode ser administrado por infusão contínua.

Uma dose de anticorpo anti-*TWEAK* pode ser administrada, e. g., num intervalo periódico ao longo de um intervalo de tempo (um curso de tratamento) suficiente para abranger pelo menos 2 doses, 3 doses, 5 doses, 10 doses ou mais, e. g., uma vez ou duas vezes por dia, ou cerca de uma a quatro vezes por semana, ou de um modo preferido semanalmente, quinzenalmente, mensalmente, e. g., durante entre cerca de 1 a 12 semanas, de um modo preferido entre 2 a 8 semanas, de um modo mais preferido entre cerca de 3 a 7 semanas, e de um modo ainda mais preferido durante cerca de 4, 5 ou 6 semanas. Os factores que podem influenciar a dosagem e tempo necessário para tratar eficazmente

um indivíduo, incluem, *e. g.*, a gravidade da doença ou distúrbio, formulação, via de administração, tratamentos prévios, a saúde geral e/ou idade do indivíduo, e outras doenças presentes. Além do mais, o tratamento de um indivíduo com uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto pode incluir um único tratamento ou, de um modo preferido, pode incluir uma série de tratamentos. Podem ser também utilizados modelos animais para determinar uma dose útil, *e. g.*, uma dose inicial ou um regime.

Se um indivíduo está em risco de desenvolver um distúrbio inflamatório ou outro distúrbio aqui descrito, o anticorpo pode ser administrado antes o início declarado do distúrbio, *e. g.*, como uma medida preventiva. A duração desse tratamento preventivo pode ser uma única dosagem do anticorpo ou o tratamento pode prosseguir (*e. g.*, dosagens múltiplas). Por exemplo, um indivíduo em risco de sofrer do distúrbio ou que tem uma predisposição para o distúrbio pode ser tratado com o anticorpo durante dias, semanas, meses ou até mesmo anos de forma a prevenir que o distúrbio ocorra ou fulmine.

Uma composição farmacêutica pode incluir uma "quantidade terapêuticamente eficaz" de um agente aqui descrito. Essas quantidades eficazes podem ser determinadas com base no efeito do agente administrado ou no efeito combinatório dos agentes, se for utilizado mais do que um agente. Uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente pode também variar de acordo com factores tais como o estado patológico, idade, género e peso do indivíduo, e a aptidão do composto para desencadear uma resposta desejada no indivíduo, *e. g.*, melhoria de pelo menos um parâmetro do distúrbio ou melhoria de pelo menos um sintoma do distúrbio. Uma quantidade terapêuticamente eficaz é

também aquela à qual quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais da composição são ultrapassados pelos efeitos terapêuticamente benéficos.

Dispositivos e Kits para Terapia

As composições farmacêuticas que incluem o anticorpo anti-*TWEAK* podem ser administradas com um dispositivo médico. O dispositivo pode ser concebido com características tais como portabilidade, conservação à temperatura ambiente e facilidade de utilização para que possa ser utilizado em situações de emergência, e. g., por um indivíduo inexperiente ou por pessoal de emergência no campo, afastado de instalações médicas e outro equipamento médico. O dispositivo pode incluir, e. g., um ou mais suportes para armazenar preparações farmacêuticas que incluem o anticorpo anti-*TWEAK*, e pode ser configurado para administrar uma ou mais doses unitárias do anticorpo. O dispositivo pode ser ainda configurado para administrar um segundo agente, e. g., um anticorpo anti-TNF- α , como uma única composição farmacêutica que inclui também o anticorpo anti-*TWEAK* ou como duas composições farmacêuticas separadas.

Por exemplo, a composição farmacêutica pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tais como os dispositivos divulgados nos documentos US 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824; ou 4596556. Os exemplos de implantes e módulos bem conhecidos incluem: documento US 4487603, o qual divulga uma bomba de microinfusão implantável para fornecer medicação a uma taxa controlada; documento US 4486194, o qual divulga um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele;

documento US 4447233, o qual divulga uma bomba de infusão de medicação para administração de medicação a uma taxa de infusão exacta; documento US 4447224, o qual divulga um aparelho de infusão implantável de caudal variável para administração contínua de fármaco; documento US 4439196, o qual divulga um sistema osmótico de administração de fármacos possuindo compartimentos multi-câmara; e documento US 4475196, o qual divulga um sistema osmótico de administração de fármacos. São ainda conhecidos muitos outros dispositivos, implantes, sistemas de administração e módulos.

Um anticorpo anti-*TWEAK* pode ser proporcionado num kit. Num caso, o kit inclui (a) um recipiente que contém uma composição que inclui o anticorpo anti-*TWEAK* e, opcionalmente, (b) material informativo. O material informativo pode ser descritivo, instrucional, comercial ou outro material relacionado com os métodos aqui descritos e/ou a utilização dos agentes para benefício terapêutico.

Num caso, o kit inclui também um segundo agente para o tratamento de um distúrbio inflamatório, e. g., um anticorpo anti-TNF- α . Por exemplo, o kit inclui um primeiro recipiente que contém uma composição que inclui o anticorpo anti-*TWEAK*, e um segundo recipiente que inclui o segundo agente.

O material informativo dos kits não está limitado na sua forma. Num caso, o material informativo pode incluir informação sobre a produção do composto, peso molecular do composto, concentração, data de expiração, informação sobre o lote ou sítio de produção, e assim por diante. Num caso, o material informativo refere-se a métodos de administração do anticorpo anti-*TWEAK*, e. g., numa dose, forma de dosagem ou modo de

administração adequado (e. g., uma dose, forma de dosagem ou modo de administração aqui descrito), para tratar um indivíduo que sofre ou que está em risco de sofrer de um distúrbio inflamatório ou outro distúrbio aqui descrito. A informação pode ser proporcionada numa variedade de formatos, incluindo texto impresso, material legível por computador, registo de vídeo ou registo áudio, ou informação que proporciona uma ligação ou endereço para material permanente, e. g., na internet.

Além do anticorpo, a composição no kit pode incluir outros ingredientes, tal como um solvente ou tampão, um estabilizante, ou um conservante. O anticorpo pode ser proporcionado em qualquer forma, e. g., forma líquida, seca ou liofilizada, de um modo preferido substancialmente pura e/ou estéril. Quando os agentes são proporcionados numa solução líquida, a solução líquida é, de um modo preferido, uma solução aquosa. Quando os agentes são proporcionados como uma forma seca, a reconstituição é geralmente pela adição de um solvente adequado. O solvente, e. g., água estéril ou tampão, pode ser opcionalmente proporcionado no kit.

O kit pode incluir um ou mais recipientes para a composição ou composições contendo os agentes. Nalguns casos, o kit contém recipientes, divisões ou compartimentos separados para a composição e material informativo. Por exemplo, a composição pode estar contida num frasco, frasquinho ou seringa, e o material informativo pode estar contido numa manga ou embalagem plástica. Noutros casos, os elementos separados do kit estão contidos num único recipiente não dividido. Por exemplo, a composição está contida num frasco, frasquinho ou seringa que tem junto ao mesmo o material informativo na forma de um marcador. Nalguns casos, o kit inclui uma multiplicidade (e. g.,

um pacote) de recipientes individuais, contendo cada uma ou mais formas de dosagem unitárias (e. g., uma forma de dosagem aqui descrita) dos agentes. Os recipientes podem incluir uma dosagem unitária de associação, e. g., uma unidade que inclui o anticorpo anti-*TWEAK* e o segundo agente, e. g., numa proporção desejada. Por exemplo, o kit inclui uma multiplicidade de seringas, ampolas, pacotes de folha metálica, embalagens blister ou dispositivos médicos, e. g., contendo cada uma única dose unitária de associação. Os recipientes dos kits podem ser à prova de ar, prova de água (e. g., impermeáveis a alterações na humidade ou evaporação) e/ou à prova de luz.

O kit inclui opcionalmente um dispositivo adequado para administração da composição, e. g., uma seringa ou outro dispositivo de administração adequado. O dispositivo pode ser proporcionado pré-carregado com um ou ambos os agentes ou pode estar vazio, mas adequado para ser carregado.

Direccionamento para células que expressam *TWEAK*

Os anticorpos anti-*TWEAK* aqui descritos podem ser utilizados para direccionar uma carga para uma célula que expressa *TWEAK* ou para um tecido ou outra estrutura associada a *TWEAK*. Por exemplo, os anticorpos podem ser ligados a um vírus ou partículas semelhantes a vírus que podem administrar um gene exógeno (e. g., para terapia de genes) ou a um lipossoma, e. g., um lipossoma que encapsula um agente terapêutico ou gene exógeno. Um método ilustrativo para utilizar um anticorpo para visar um vírus é descrito em Roux et al., (1989) Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86:9079-9083. Ver também, e. g., Curr Gene Ther. (2005) 5:63-70 e Hum Gene Ther. (2004) 15:1034-1044.

Os Ab anti-*TWEAK* desta invenção podem ser também ligados a lipossomas contendo um agente terapêutico, tal como um agente quimioterapêutico. A ligação dos anticorpos aos lipossomas pode ser conseguida por qualquer agente de reticulação conhecido, tais como os agentes de reticulação heterobifuncionais que têm sido amplamente utilizados para acoplar toxinas ou agentes quimioterapêuticos a anticorpos para administração direccionada. Por exemplo, a conjugação a lipossomas pode ser conseguida utilizando o reagente de reticulação orientado para hidratos de carbono, hidrazida do ácido 4-(4-maleimidofenil)butírico (MPBH) (Duzgunes *et al.*, (1992) J. Cell. Biochem. Abst. Suppl. 16E 77). Os lipossomas contendo anticorpos podem ser também preparados por métodos bem conhecidos (ver, *e. g.*, documento DE 3218121; Epstein *et al.*, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-92; Hwang *et al.*, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-34; documentos U.S. 4485045 e 4544545).

Utilizações em Diagnóstico

Os anticorpos anti-*TWEAK* podem ser utilizados num método de diagnóstico para detectar a presença de um *TWEAK*, *in vitro* (*e. g.*, uma amostra biológica, tal como tecido, biopsia) ou *in vivo* (*e. g.*, imagiologia *in vivo* num indivíduo). Por exemplo, anticorpos anti-*TWEAK* humanos ou eficazmente humanos podem ser administrados a um indivíduo para detectar o *TWEAK* no indivíduo. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado, *e. g.*, com um marcador detectável por MRI ou um marcador radioactivo. O indivíduo pode ser avaliado utilizando um meio para detectar o marcador detectável. Por exemplo, o indivíduo pode ser sujeito a varrimento para determinar a localização do anticorpo no

indivíduo. Por exemplo, o indivíduo é sujeito a imagiologia, e. g., por RMN ou outros meios tomográficos.

Os exemplos de marcadores úteis para imagens de diagnóstico incluem marcadores radioactivos tais como ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C e ^{188}Ph , marcadores fluorescentes, tais como fluoresceína e rodamina, marcadores activos para ressonância magnética nuclear, isótopos emissores de positrões detectáveis por um leitor de tomografia por emissão de positrões ("PET"), substância quimioluminescentes, tal como a luciferina, e marcadores enzimáticos, tal como peroxidase ou fosfatase. Podem ser também utilizados emissores de radiação de curto alcance, tais como os isótopos detectáveis por sondas detectoras de curto alcance. O ligando de proteína pode ser marcado com esses reagentes utilizando técnicas conhecidas. Por exemplo, ver Wensel e Meares (1983) *Radioimmunoimaging e Radioimmunotherapy*, Elsevier, Nova Iorque para técnicas relacionadas com a marcação radioactiva de anticorpos e Colcher *et al.* (1986) *Meth. Enzymol.* 121: 802-816.

O indivíduo pode ser "analisado por imagiologia" *in vivo* utilizando técnicas conhecidas tal como varrimento radionuclear utilizando e. g., uma câmara gama ou tomografia de emissão. Ver e. g., A.R. Bradwell *et al.*, "Developments in Antibody Imaging", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin *et al.*, (eds.), p. 65-85 (Academic Press 1985). Alternativamente, pode ser utilizado um detector de tomografia transaxial de emissão de positrões, tal como o Pet VI localizado no Brookhaven National Laboratory, onde o marcador radioactivo emite positrões (e. g., ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O e ^{13}N).

Agentes de Contraste para MRI. A Imagiologia de Ressonância Magnética (MRI) utiliza RMN para visualizar características internas de indivíduos vivos e é útil para prognóstico, diagnóstico, tratamento e cirurgia. A MRI pode ser utilizada sem compostos marcadores radioactivos com vantagens óbvias. Algumas técnicas de MRI estão resumidas no documento EPO 502814 A. Em geral, as diferenças relacionadas com as constantes de tempo de relaxação T1 e T2 dos prótons da água em meios diferentes são utilizadas para gerar uma imagem. No entanto, estas diferenças podem ser insuficientes para proporcionar imagens de alta resolução.

As diferenças nestas constantes de tempo de relaxação podem ser intensificadas com agentes de contraste. Os exemplos de tais agentes de contraste incluem um número de agentes magnéticos, agentes paramagnéticos (os quais alteram principalmente T1) e agentes ferromagnéticos ou superparamagnéticos (os quais alteram principalmente a resposta T2). Podem ser utilizados quelatos (e. g., quelatos de EDTA, DTPA e NTA) para ligar (e reduzir a toxicidade) de algumas substâncias paramagnéticas (e. g., Fe^{3+} , Mn^{2+} , Gd^{3+}). Outros agentes podem estar na forma de partículas, e. g., com menos de 10 μm até cerca de 10 nm de diâmetro). As partículas podem ter propriedades ferromagnéticas, anti-ferromagnéticas ou superparamagnéticas. As partículas podem incluir, e. g., magnetite (Fe_3O_4), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ferrites e outros compostos de minerais magnéticos dos elementos de transição. As partículas magnéticas podem incluir um ou mais cristais magnéticos com e sem material não magnético. O material não magnético pode incluir polímeros sintéticos ou naturais (tais como sepharose, dextrano, dextrina, amido e semelhantes).

Os anticorpos anti-*TWEAK* podem ser também marcados com um grupo indicador contendo o átomo de ^{19}F activo em RMN, ou uma multiplicidade de tais átomos na medida em que (i) substancialmente todos os átomos de flúor naturalmente abundantes são o isótopo ^{19}F e, desse modo, substancialmente todos os compostos contendo flúor são activos em RMN; (ii) muitos compostos polifluorados quimicamente activos, tal como o anidrido trifluoracético estão comercialmente disponíveis a custo relativamente baixo e (iii) se tem determinado que muitos compostos fluorados são medicamente aceitáveis para serem utilizados em humanos, tais como os poliéteres perfluorados utilizados para transportar oxigénio como substituintes da hemoglobina. Depois de proporcionar o tempo para incubação, é realizada um MRI de corpo inteiro utilizando um aparelho tal como um dos descritos por Pykett (1982) *Scientific American*, 246:78-88 para localizar e obter uma imagem da distribuição do *TWEAK*.

Noutro caso, a divulgação proporciona um método para detectar a presença de *TWEAK* numa amostra *in vitro* (e. g., uma amostra biológica, tal como soro, plasma, tecido, biopsia). O método particular pode ser utilizado para diagnosticar um distúrbio, e. g., um distúrbio associado às células imunitárias. O método inclui: (i) pôr a amostra ou uma amostra de controlo em contacto com o anticorpo anti-*TWEAK*; e (ii) avaliar a amostra quanto à presença de *TWEAK*, e. g., detectar a formação de um complexo entre o anticorpo anti-*TWEAK* e o *TWEAK*, ou detectar a presença do anticorpo ou do *TWEAK*. Por exemplo, o anticorpo pode ser imobilizado, e. g., num suporte, e é detectada a retenção do antigénio no suporte, e/ou vice-versa. Pode ser incluída uma amostra de controlo. Uma alteração estatisticamente significativa na formação do complexo na amostra relativamente à

amostra de controlo pode ser indicativa da presença de *TWEAK* na amostra. Em geral, um anticorpo anti-*TWEAK* pode ser utilizado em aplicações que incluem polarização de fluorescência, microscopia, ELISA, centrifugação, cromatografia e triagem celular (e. g., triagem celular activada por fluorescência).

Exemplo 1

A sequência do domínio variável da cadeia pesada do P2D10 murídeo, com as CDR sublinhadas, é:

```
1  EVQLVESGGG LVRPGGSLKL FCAASGFTFS RYAMSWVRQS PEKRLEWVAE
51  ISSGGSYPYY PDTVTGRFTI SRDNAKNTLY LEMSSLKSED TAMYYCARVL
101 YYDYDGDRIE VMDYWGQGTA VIVSS (SEQ ID Nº: 50)
```

Este é um domínio variável da cadeia pesada do subgrupo 3D de murídeo.

A sequência do domínio variável da cadeia leve do P2D10 murídeo, com as CDR sublinhadas, é:

```
1  DVVMTQSPLS LSVSLGDQAS ISCRSSQSLV SSKGNTYLHW YLQKPGQSPK
51  FLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVAAEDLGV YFCSQSTHFP
101 RTFGGTTLK IK (SEQ ID Nº: 51)
```

Esta é uma cadeia leve kappa do subgrupo 2 murídeo.

As seguintes regiões estruturais aceitadoras humanas foram escolhidas para o huP2D10: domínio variável da cadeia pesada do subgrupo 3 do 56-84m humano (base de dados NCBI, número de

acesso GI:33318898, Scamurra *et al.*, submissão directa). A sequência com as CDR sublinhadas é como se segue.:

```

1  EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMSWVRQA PGKGLEWVAN
51  IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP
101 MTTVVKPSLA TNDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID Nº: 52)

```

A sequência do domínio variável da cadeia leve do subgrupo 2 do K107 humano (base de dados NCBI, número de acesso GI: 21669075, Akahori *et al.*, submissão directa), com as CDR sublinhadas é:

```

1  DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ
51  LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQALQTP
101 LTFGGGTKVE IK (SEQ ID Nº: 53)

```

Nas sequências aceitadoras humanas mostradas, as CDR (as quais estão sublinhadas) são do mesmo comprimento e classes canónicas que aquelas nos domínios variáveis do muP2D10.

A seguir é mostrado o alinhamento dos domínios variáveis da cadeia pesada do P2D10 murídeo (cimo) e 56-84m aceitador humano (fundo) (68,8% idênticos):

```

1  EVQLVESGGGLVLRPGGSLKLFCAASGFTFSRYAMSWVRQSPEKRLEWVAE 50
   |||||:| |||||:| |||||:| |||||:| |||||:| |||||:| |||||:|
1  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSWVRQAPGKGLEWVAN 50

51  ISSGGSYPYYPDVTVGRFTISRDNKNTLYLEMSSLKSEDTAMYYCARVL 100
   || || || |. | |||||:| |||||:| |||||:| |||||:| |||||:|
51  IKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP 100

101 YYDYDGDRIEVMDYWGQGTAVIVSS 125 (SEQ ID Nº: 54)
     : ||||| | |||
101 MTTVVKPSLATNDYWGQGTLVTVSS 125 (SEQ ID Nº: 55)

```


Esta é uma sequência de aminoácidos ilustrativa da cadeia pesada do huP2D10 H1 IgG1 maduro:

```

1  EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYAMSWVRQA PGKGLEWVAE
51  ISSGGSYPY PDTVTRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVL
101 YYDYDGDRIE VMDYWGQGTI VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL
151 GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSST
201 LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL
251 FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
301 EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
351 PREPQVYTL PDRDELTKNQ VSLTCLVKG FYSYDIAVEWE SNGQPENNYK
401 TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL
451 LSPG (SEQ ID Nº: 64)

```

A numeração de Kabat para o segmento V_H do domínio variável da cadeia pesada (SED ID Nº: 65) é mostrada abaixo:

Nº Kabat	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
hp2D10	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYAMSWVRQA	PGKGLEWVAE
Nº Kabat	12a3456789	0123456789	0123456789	012abc3456	78901234
hp2D10	ISSGGSYPY	PDTVTRFTI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAR

Esta é uma sequência de aminoácidos ilustrativa da cadeia leve L1 do huP2D10 maduro:

```

1  DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV SSKGNTYLHW YLQKPGQSPQ
51  FLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YFCSQSTHFP
101 RTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SEQ ID Nº: 66)

```

A numeração de Kabat para este segmento V_L é mostrada abaixo (SEQ ID N°: 67):

N° Kabat 1234567890 1234567890 1234567abc de89012345 6789012345
hP2D10 DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV SSKGNTYLHW YLQKPGQSPQ

N° Kabat 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345
hP2D10 FLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YFCSQSTHFP

Esta é uma sequência de aminoácidos ilustrativa da cadeia leve L2 do huP2D10 maduro:

1	DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV SSKGNTYLHW YLQKPGQSPQ
51	LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YFCSQSTHFP
101	RTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151	VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201	VTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SEQ ID N°: 68)

A numeração de Kabat para este segmento V_L é mostrada abaixo (SEQ ID N°: 69):

N° Kabat 1234567890 1234567890 1234567abc de89012345 6789012345
hP2D10 DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV SSKGNTYLHW YLQKPGQSPQ

N° Kabat 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345
hP2D10 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YFCSQSTHFP

Exemplo 2

O anticorpo monoclonal de bloqueio para o *TWEAK*, mP2D10, reduziu significativamente a gravidade clínica em modelos de esclerose múltipla, acidente vascular cerebral e artrite

reumática. Foi modelada a farmacocinética (PK) do anticorpo monoclonal anti-*TWEAK*, mP2D10, após administração intravenosa (IV).

O mP2D10 foi administrado em ratinhos a 1, 10 ou 100 mg/kg via injeção IV. Foram determinadas as concentrações de mP2D10 no soro utilizando ELISA. O perfil PK concentração-tempo foi analisado utilizando um modelo de dois compartimentos com eliminação de primeira ordem ou eliminação de Michaelis-Menten do compartimento central com um volume de V_1 . As constantes de velocidade entre os dois compartimentos foram K_{12} (saída do compartimento 1 para o 2) e K_{21} (saída do compartimento 2 para o 1). Para o modelo de eliminação de primeira ordem, a constante da velocidade de eliminação foi K_{10} . Para o modelo de eliminação de Michaelis-Menten, o fármaco foi eliminado à velocidade de $V_m \cdot C_1 / (K_m + C_1)$, em que, C_1 foi o mP2D10 à concentração no compartimento central, V_m e K_m foram constantes. Os dados foram adaptados com o software ADAPT II (D'Argenio, D.Z. e A. Schumitzky. ADAPT II User's Guide: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software. Biomedical Simulations Resource, Los Angeles, 1997.) utilizando o procedimento de estimativa de Máxima Probabilidade.

Para o modelo de eliminação linear de dois compartimentos, V_1 foi 23,2 mL/kg, K_{10} foi 0,0096 h⁻¹, o K_{12} foi 2,501 e K_{21} foi 1,053. O valor da área sob a curva (AIC) foi 298 e o valor de Schwarz foi 304,2. Para o modelo de eliminação não linear de dois compartimentos, o V_1 foi 0,0235. O V_m foi 9,22 mg/kg/h, o K_m foi 484,2 µg/mL. O K_{12} foi 2,348 h⁻¹ e o K_{21} foi 0,966 h⁻¹. O valor da AIC foi 269 e o valor de Schwarz foi 276. A PK do mP2D10 foi melhor prevista por um modelo não linear do que por um modelo linear.

Os perfis concentração-tempo do mP2D10 foram melhor previstos por um modelo de dois compartimentos com eliminação de Michaelis-Menten do que com eliminação de primeira ordem.

Os especialistas na técnica reconhecerão ou serão capazes de averiguar muitos equivalentes das formas de realização específicas aqui descritas, utilizando não mais do que experimentação de rotina.

Lisboa, 25 de Agosto de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína isolada compreendendo uma sequência do domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina e uma sequência do domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina que pode formar um sítio de ligação de antígeno que se liga ao *TWEAK* humano (indutor fraco da apoptose semelhante ao TNF), em que:

(a) a sequência do domínio variável da cadeia pesada da proteína compreende as seguintes regiões determinantes de complementaridade (CDR):

CDRH1 compreendendo a sequência de aminoácidos:
GFTFSRYAMS (SEQ ID N°: 1);

CDRH2 compreendendo a sequência de aminoácidos:
EISSGGSYPYYPDTVTG (SEQ ID N°: 2); e

CDRH3 compreendendo a sequência de aminoácidos:
VLYYDYDGDRIEVM DY (SEQ ID N°: 3); e

(b) a sequência do domínio variável da cadeia leve da proteína compreende as seguintes CDR:

CDRL1 compreendendo a sequência de aminoácidos:
RSSQSLVSSKGNTILH (SEQ ID N°: 8);

CDRL2 compreendendo a sequência de aminoácidos:
KVS NRFS (SEQ ID N°: 9); e

CDRL3 compreendendo a sequência de aminoácidos:
SQSTHFPRT (SEQ ID N°: 10).

2. Proteína da Reivindicação 1, em que a proteína é uma IgG inteira, recombinante.
3. Proteína da Reivindicação 1, em que a proteína compreende uma região Fc humana.
4. Proteína da Reivindicação 1, em que a proteína compreende uma região Fc humana com uma ou mais substituições de aminoácidos na sequência de aminoácidos de tipo selvagem da região Fc.
5. Proteína da Reivindicação 1, em que a proteína é um Fab ou scFv.
6. Proteína da Reivindicação 1, em que a proteína compreende regiões estruturais que são pelo menos 90% idênticas às regiões estruturais da linha germinal humana.
7. Proteína da Reivindicação 1, em que a sequência do domínio variável da cadeia leve da proteína compreende regiões estruturais que são pelo menos 95% idênticas a uma sequência da linha germinal do subgrupo Vk1.
8. Proteína da Reivindicação 1, em que a sequência do domínio variável da cadeia leve da proteína compreende regiões estruturais que são pelo menos 95% idênticas à sequência DPK9.

9. Proteína da Reivindicação 1, em que a sequência do domínio variável da cadeia leve da proteína compreende regiões estruturais que são pelo menos 95% idênticas a uma sequência seleccionada das sequências definidas nas SEQ ID N°: 17, 19, 22, 23, 25, 26, 51, 61 e 63.
10. Proteína da Reivindicação 1, em que a sequência do domínio variável da cadeia leve da proteína compreende regiões estruturais que são idênticas a uma sequência seleccionada das sequências definidas nas SEQ ID N°: 17, 19, 22, 23, 25, 26, 51, 61 e 63.
11. Proteína da Reivindicação 1, em que a sequência do domínio variável da cadeia pesada da proteína compreende regiões estruturais que são pelo menos 95% idênticas a uma sequência da linha germinal do subgrupo VH I.
12. Proteína da Reivindicação 1, em que a sequência do domínio variável da cadeia pesada da proteína compreende regiões estruturais que são pelo menos 95% idênticas à sequência da linha germinal DP-54.
13. Proteína da Reivindicação 1, em que a sequência do domínio variável da cadeia pesada da proteína compreende regiões estruturais que são pelo menos 95% idênticas a uma sequência seleccionada das sequências definidas nas SEQ ID N°: 27-43, 46-50 e 59.
14. Proteína da Reivindicação 1, em que a sequência do domínio variável da cadeia pesada da proteína compreende regiões estruturais que são idênticas a uma sequência seleccionada das sequências definidas nas SEQ ID N°: 27-43, 46-50 e 59.

15. Proteína da Reivindicação 1, em que a sequência da cadeia pesada da proteína compreende a sequência definida na SEQ ID N°: 64 e a sequência da cadeia leve da proteína compreende a sequência definida na SEQ ID N°: 66 ou SEQ ID N°: 68.
16. Proteína da Reivindicação 15, em que a sequência da cadeia leve da proteína compreende a sequência definida na SEQ ID N°: 68.
17. Proteína da Reivindicação 1, em que a proteína está funcionalmente ligada a uma ou mais outras entidades moleculares.
18. Proteína da Reivindicação 17, em que a uma ou mais outras entidades moleculares são seus anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno.
19. Composição farmacêutica compreendendo uma proteína de acordo com qualquer reivindicação anterior e um veículo farmacêuticamente aceitável.
20. Método para proporcionar a proteína de qualquer uma das reivindicações 1-18, em que o método compreende:
 - (i) proporcionar uma célula hospedeira que contém sequências de ácidos nucleicos recombinantes para expressar a proteína; e
 - (ii) manter a célula em condições nas quais a proteína é expressa.

21. Método da Reivindicação 20 compreendendo ainda isolar a proteína e formular a proteína com um veículo farmacêuticamente aceitável.
22. Proteína de qualquer uma das Reivindicações 1-18 ou a composição farmacêutica da reivindicação 19, para ser utilizada no tratamento de um distúrbio auto-imune.
23. Proteína de qualquer uma das Reivindicações 1-18 ou a composição farmacêutica da reivindicação 19, para ser utilizada no tratamento de artrite reumatóide.
24. Proteína de qualquer uma das Reivindicações 1-18 ou a composição farmacêutica da reivindicação 19, para ser utilizada no tratamento de esclerose múltipla.
25. Proteína de qualquer uma das Reivindicações 1-18 ou a composição farmacêutica da reivindicação 19, para ser utilizada no tratamento de acidente vascular cerebral.

Lisboa, 25 de Agosto de 2014