

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 069**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2006 E 06760258 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 1888113**

54 Título: **Anticuerpos de unión a TWEAK**

30 Prioridad:

**27.05.2005 US 685149 P**

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

**14.10.2014**

73 Titular/es:

**BIAGEN IDEC MA INC. (100.0%)  
14 CAMBRIDGE CENTER  
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**BURKLY, LINDA C.;  
GARBER, ELLEN y  
LUGOVSKOY, ALEXEY**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 507 069 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de unión a TWEAK

## 5 ANTECEDENTES

[0001] Las citoquinas relacionadas con el factor de necrosis tumoral (TNF) son una superfamilia de proteínas que tienen una variedad de funciones, incluyendo las implicadas en la regulación del sistema inmunitario y la regulación de la apoptosis. TWEAK (inductor débil de la apoptosis del tipo TNF) es un miembro de esta superfamilia.

10

## DESCRIPCIÓN RESUMIDA

[0002] Los anticuerpos anti-TWEAK se pueden utilizar para tratar una variedad de afecciones y trastornos, por ejemplo, un trastorno inflamatorio, un trastorno neuronal u otro desorden descrito en el presente documento. Cuando se usan para tratar a un sujeto humano, el anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo humano, humanizado o, en cualquier caso, un anticuerpo con eficacia humana.

15

[0003] En base a la descripción contenida en el presente documento, la presente invención proporciona una proteína aislada que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una secuencia de dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que pueden formar un sitio de unión a antígeno que se une a TWEAK humano (inductor débil de la apoptosis del tipo TNF), en la que:

20

(a) la secuencia de dominio variable de cadena pesada de la proteína comprende las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):

25

CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos: GFTFSRYAMS (SEQ ID NO: 1);

CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos: EISSGGSYPYPDVTG (SEQ ID NO: 2); y

CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos: VLYYDYDGDRIEVM DY (SEQ ID NO: 3);

(b) la secuencia de dominio variable de cadena ligera de la proteína comprende las siguientes CDR:

30

CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos: RSSQSLVSSKGNTYLH (SEQ ID NO: 8);

CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos: KVS NRFS (SEQ ID NO: 9); y

35

CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos: SQSTHFPRT (SEQ ID NO: 10)

[0004] La presente invención y las realizaciones de la misma se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

35

[0005] La proteína también se denomina en el presente documento como un "anticuerpo anti-TWEAK".

40

[0006] En una realización, el anticuerpo es un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv o un fragmento Fv de cadena única. Habitualmente, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo mono-específico. Por ejemplo, el anticuerpo está en una composición que incluye menos de otras 20 especies de anticuerpos anti-TWEAK, por ejemplo, en una composición que no incluye otra especie de anticuerpo anti-TWEAK.

45

[0007] El anticuerpo puede ser efectivamente humano. Un anticuerpo "efectivamente humano" es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanos, de manera que el anticuerpo no provoca una respuesta inmunogénica en un ser humano normal. Preferiblemente, la proteína no evoca una respuesta de anticuerpos neutralizantes, por ejemplo, la respuesta de anticuerpos anti-murinos humanos (HAMA). Los HAMA pueden ser problemáticos en un conjunto de circunstancias, por ejemplo, si se desea administrar repetidamente los anticuerpos, por ejemplo, en el tratamiento de un estado de enfermedad crónica o recurrente. Una respuesta de HAMA puede hacer que la administración repetida de anticuerpos sea potencialmente ineficaz debido a un aumento de la depuración de anticuerpos del suero (véase, por ejemplo, Saleh et al., Cancer Immunol. Immunother, 32: 180-190 (1990)) y también debido a posibles reacciones alérgicas (véase, por ejemplo, LoBuglio et al (1986) Hybridoma, 5: 5.117-5.123).

50

[0008] Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, humanizado, injertado con CDR, quimérico, mutado, de afinidad madurada, desimmunizado, sintético o, en otro caso, generado in vitro, y combinaciones de los mismos. En una realización, el anticuerpo anti-TWEAK es un anticuerpo humanizado.

55

[0009] Las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-TWEAK pueden ser sustancialmente de longitud completa. La proteína puede incluir al menos uno, y preferiblemente dos, cadenas pesadas completas, y al menos uno, y preferiblemente dos, cadenas ligeras completas) o puede incluir un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv o un fragmento Fv de cadena única). En aún otras realizaciones, el anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada elegida entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE; en particular, elegida entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y, más particularmente, IgG1 (por ejemplo, IgG1 humano). Habitualmente, la región constante de cadena pesada es humana o es una forma modificada de una región constante humana. En otra realización, el anticuerpo tiene una región constante de cadena ligera elegida entre, por ejemplo, kappa o lambda, en particular, kappa (por ejemplo, kappa humana).

60

65

## ES 2 507 069 T3

**[0010]** La proteína puede incluir una de las siguientes secuencias:

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL  
KISRVEAEDVGVYYCSQSTH FPRT (SEQ ID NO: 17)

5 DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL  
KISRVEAEDVGVYYCSQSTH FPRT (SEQ ID NO: 18)

DWMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL  
LKISRVEAEDVGVYYCSQSTH FPRT (SEQ ID NO: 19)

10 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF  
TLKISRVEAEDVGVYYCSQSTH FPRT (SEQ ID NO: 20)

15 QLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCSQSTHDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSL  
VSSKGNTYLHWYLQKPGQSPFPRT (SEQ ID NO: 21)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWYLQKPGQPPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL  
KISRVEAEDVGVYYCSQSTH FPRT (SEQ ID NO: 22)

20 DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL  
KISRVEAEDVGVYYCSQSTH FPRT (SEQ ID NO: 23)

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL  
KISRVEAEDVGVYYCSQSTH FPRT (SEQ ID NO: 24)

25 DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVSSKGNTYLHWLQQRPGQPPLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLK  
ISRVEAEDVGVYYCSQSTH FPRT (SEQ ID NO: 25)

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVSSKGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL  
LTISSLQPEDFATYYCSQSTH FPRT (SEQ ID NO: 26)

o una secuencia que tiene menos de ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres o dos alteraciones (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, por ejemplo, sustituciones conservadoras o una sustitución por un residuo de aminoácido en una posición correspondiente en P2D10, huP2D 10-L1, o huP2D10-L2). Las sustituciones de ejemplo están en una de las siguientes posiciones de Kabat: 2, 4, 6, 35, 36, 38, 44, 47, 49, 62, 64-69, 85, 87, 98, 99, 101, y 102. Las sustituciones pueden, por ejemplo, sustituir uno o más aminoácidos de P2D10 en las posiciones correspondientes en una región de armazón ("framework"), por ejemplo, una región armazón humana, por ejemplo, en FR2 (por ejemplo, en la posición 46 a Phe de acuerdo con la numeración consecutiva) y en FR3 (por ejemplo, en la posición 87 a Phe).

40 **[0011]** La proteína puede incluir una de las siguientes secuencias en el dominio variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSRYAMSWVRQAPGQGLEWMGEISSGGSYPYPDTVTGRVTMTRDTS  
ISTAYMELSRSLRSDDTAVYYCAR VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 27)

45 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSRYAMSWVRQAPGQRLEWMGEISSGGSYPYPDTVTGRVTITRDT  
ASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 28)

50 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSRYAMSWVRQATGQGLEWMGEISSGGSYPYPDTVTGRVTMTRNTS  
ISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 29)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSRYAMSWVRQAPGQGLEWMGEISSGGSYPYPDTVTGRVTMTDTS  
TSTAYMELSRSLRSDDTAVYYCARVLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 30)

55 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWMGEISSGGSYPYPDTVTGRVTMTEDTS  
TDTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 31)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTFSRYAMSWVRQAPGQALEWMGEISSGGSYPYPDTVTGRVTITRDRS  
MSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 32)

60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSRYAMSWVRQAPGQGLEWMGEISSGGSYPYPDTVTGRVTMTRDTS  
TSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARVLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 33)

65 QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFSRYAMSWVRQARGQRLEWIGEISSGGSYPYPDTVTGRVTITRDMST  
STAYMELSSLRSEDVAVYYCAA VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 34)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVAEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 35)

5 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK DVLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 36)

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWIRQAPGKGLEWVSEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 37)

10 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVGEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDDSK  
NTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTVLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 38)

EVQLVESGGGWRPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NSLYLQMNSLRAEDTALYHCAR VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 39)

15 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 40)

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 41)

QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVAEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 42)

25 QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVAEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 43)

QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVAEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 44)

30 QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVAEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 45)

35 EVQLVESGGWVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NSLYLQMNSLRTEEDTALYYCAK DVLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 46)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NSLYLQMNSLRDEEDTAVYYCAR VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 47)

40 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSRYAMSWFRQAPGKGLEWVGEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDSK  
SIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRVLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 48)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISSGGSYPPYPDTVTVTGRFTISRDNK  
NTLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR VLYYDYDGDRIE (SEQ ID NO: 49)

45 o una secuencia que tiene menos de ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o alteraciones (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, por ejemplo, sustituciones conservadoras o una sustitución por un residuo de aminoácido en una posición correspondiente en P2D10). Las sustituciones de ejemplo están en una de las siguientes posiciones de Kabat: 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94, 103, 104, 106, y 107. Las sustituciones pueden, por ejemplo, sustituir uno o más aminoácidos de P2D10 en las posiciones correspondientes en una región  
50 almacén, por ejemplo, una región de almacén humana.

[0012] En una realización, el almacén de cadena pesada (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, de forma individual, o una secuencia que comprende FR1, FR2, FR3, pero excluyendo las CDRs) incluye una secuencia de aminoácidos, que  
55 es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más idéntica al almacén de cadena pesada de una de las siguientes secuencias de segmento V de la línea germinal: DP-25, DP-1, DP-12, DP-9, DP-7, DP-31, DP-32, DP-33, DP-58, DP-54, otra secuencia del subgrupo I de VH de línea germinal, otra secuencia del subgrupo III de VH de la línea germinal, u otro gen V que es compatible con la clase 1-3 de la estructura canónica (véase, por ejemplo, Chothia et al. (1992) J. Mol. Biol. 227: 799-817; Tomlinson et al. (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798). Otros almacenes  
60 compatibles con la clase 1-3 de la estructura canónica incluyen almacenes con uno o más de los siguientes residuos de acuerdo con la numeración de Kabat: Ala, Gly, Thr, o Val en la posición 26; Gly en la posición 26; Tyr, Phe, o Gly en la posición 27; Phe, Val, Ile, o Leu en la posición 29; Met, Ile, Leu, Val, Thr, Trp, o Ile en la posición 34; Arg, Thr, Ala, Lys en la posición 94; Gly, Ser, Asn, o Asp en la posición 54; y Arg en la posición 71.

65 [0013] En una realización, el almacén de la cadena ligera (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, de forma individual, o una secuencia que comprende FR1, FR2, FR3, pero excluyendo las CDR) incluye una secuencia de aminoácidos, que

es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más idéntica al armazón de cadena ligera de una secuencia del subgrupo II de  $V_{\kappa}$  de la línea germinal o una de las siguientes secuencias de segmento V de la línea germinal: A17, A1, A18, A2, A19/A3, A23, una secuencia del subgrupo I de  $V_{\kappa}$  de la línea germinal (por ejemplo, una secuencia de DPK9), u otro gen V que es compatible con la clase 4-1 de la estructura canónica (véase, por ejemplo, Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14: 4628). Otros armazones compatibles con la clase 4-1 de la estructura canónica incluyen armazones con uno o más de los siguientes residuos de acuerdo con la numeración de Kabat: Val o Leu o Ile en la posición 2; Ser o Pro en la posición 25; Ile o Leu en la posición 27b; Gly en la posición 29; Phe o Leu en la posición 33; y Phe en la posición 71. Además, de acuerdo con la numeración de Kabat, la posición 48 puede ser Ile o Val.

**[0014]** En otra realización, el armazón de cadena ligera (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, de forma individual, o una secuencia que comprende FR1, FR2, FR3, pero excluyendo las CDR) incluye una secuencia de aminoácidos, que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más idéntica al armazón de cadena ligera de una secuencia del subgrupo I de  $V_{\kappa}$  de la línea germinal, por ejemplo, una secuencia DPK9.

**[0015]** En una realización, el armazón variable de cadena pesada o el de cadena ligera (por ejemplo, la región que comprende al menos FR1, FR2, FR3 y opcionalmente FR4) se puede elegir entre: (a) un armazón variable de cadena ligera o pesada que incluye al menos el 80%, 90%, 95%, o preferiblemente 100% de los residuos de aminoácidos de un armazón variable de cadena ligera o pesada humana, por ejemplo, un residuo de un armazón variable de cadena ligera o pesada de un anticuerpo humano maduro, una secuencia de la línea germinal humana, una secuencia consenso humana, o un anticuerpo humano descrito en el presente documento; (b) un armazón variable de cadena ligera o pesada que incluye del 20% al 80%, del 40% al 60%, del 60% al 90%, o del 70% al 95% de los residuos de aminoácidos de un armazón variable de cadena ligera o pesada humana, por ejemplo, un residuo de un armazón variable de cadena ligera o pesada de un anticuerpo humano maduro, una secuencia de la línea germinal humana, una secuencia consenso humana; (c) un armazón no humano (por ejemplo, un armazón de roedor); o (d) un armazón no humano que ha sido modificado, por ejemplo, para eliminar determinantes antigénicos o citotóxicos, por ejemplo, desinmunizado, o parcialmente humanizado. En una realización, la secuencia del dominio variable de cadena pesada incluye residuos humanos o residuos de la secuencia consenso humana en una o más de las siguientes posiciones (preferiblemente al menos cinco, diez, doce, o todas): (en el FR del dominio variable de la cadena ligera) 4L, 35L, 36L, 38L, 43L, 44L, 58L, 46L, 62L, 63L, 64L, 65L, 66L, 67L, 68L, 69L, 70L, 71L, 73L, 85L, 87L, 98L, y/o (en el FR del dominio variable de la cadena pesada) 2H, 4H, 24H, 36H, 37H, 39H, 43H, 45H, 49H, 58H, 60H, 67H, 68H, 69H, 70H, 73H, 74H, 75H, 78H, 91H, 92H, 93H, y/o 103H (según la numeración de Kabat).

**[0016]** En una realización, uno o ambos de los dominios variables incluyen posiciones de aminoácidos en la región armazón que derivan de diversas formas tanto de un anticuerpo murino (por ejemplo, P2D10) como de un anticuerpo humanizado (por ejemplo, 56-84m y K107) o la secuencia de la línea germinal. Por ejemplo, el dominio variable incluirá un número de posiciones en las que el aminoácido es idéntico tanto para el anticuerpo murino como para el anticuerpo humano (o secuencia de la línea germinal), ya que los dos son idénticos en esa posición. De las posiciones restantes del armazón en que difieren el murino y el humano, al menos el 50, 60, 70, 80, ó 90% de las posiciones del dominio variable son preferiblemente idénticas a las del anticuerpo humano (o secuencia de la línea germinal) en lugar de las del murino. Ninguno, o al menos uno, dos, tres, o cuatro de tales posiciones restantes del armazón pueden ser idénticas a las del anticuerpo murino en lugar del anticuerpo humano. Por ejemplo, en FR1 de HC, una o dos de dichas posiciones pueden ser murinas; en FR2 de HC, una o dos de dichas posiciones pueden ser murinas; en FR3, una, dos, tres o cuatro de dichas posiciones pueden ser murinas; en FR1 de LC, una, dos, tres o cuatro de dichas posiciones pueden ser murinas; en FR2 de LC, una o dos de dichas posiciones pueden ser murinas; en FR3 de LC, una o dos de dichas posiciones pueden ser murinas.

**[0017]** El anticuerpo anti-TWEAK puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido, proteína o compuesto. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico), toxinas, radioisótopos, polímeros, agentes citotóxicos o citostáticos, entre otros.

**[0018]** En otro aspecto, la descripción proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que incluyen un portador farmacéuticamente aceptable y el anticuerpo anti-TWEAK descrito en el presente documento.

**[0019]** El anticuerpo anti-TWEAK (por ejemplo, una composición farmacéutica del mismo) se administra a un sujeto que necesita una terapia con anticuerpos anti-TWEAK o cuyo estado se mejora por el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-TWEAK se puede administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno inflamatorio, trastorno inmune, trastorno autoinmune, trastorno neuronal, un trastorno neoplásico, u otro trastorno descrito en este documento. En una realización, un anticuerpo anti-TWEAK descrito en este documento se utiliza en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, trastorno inmune, trastorno autoinmune, trastorno neuronal, un trastorno neoplásico, u otro trastorno descrito en este documento.

**[0020]** En otro caso, la descripción presenta un método para tratar un trastorno asociado a TWEAK, en un sujeto. El método incluye: administrar al sujeto un anticuerpo anti-TWEAK, en una cantidad suficiente para tratar (por ejemplo,

mejorar o prevenir) el trastorno asociado con TWEAK. El anticuerpo anti-TWEAK se puede administrar al sujeto, solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas tal como se describe en este documento. En un caso, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano, por ejemplo, un humano que tiene un trastorno asociado a TWEAK, por ejemplo, un trastorno descritos en este documento. El anticuerpo se puede utilizar para mejorar uno o más síntomas de tales trastornos. El término "tratar" se refiere a la administración de una terapia en una cantidad, manera, y/o modo eficaz para mejorar o prevenir una afección, síntoma o parámetro asociado con un trastorno (por ejemplo, un trastorno descrito en este documento) o para prevenir la aparición, progresión, o exacerbación del trastorno, ya sea en un grado estadísticamente significativo o en un grado detectable para un experto en la materia. Por consiguiente, el tratamiento puede lograr beneficios terapéuticos y/o profilácticos. Una cantidad, manera o modo eficaz pueden variar dependiendo del sujeto y pueden adaptarse al sujeto. En un caso, se utiliza un anticuerpo anti-TWEAK descrito en este documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con TWEAK.

**[0021]** La descripción presenta un método para modular la interacción entre TWEAK y una proteína receptora de TWEAK. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo anti-TWEAK para reducir o inhibir la unión, entre TWEAK y un receptor de TWEAK, tal como Fn14. El método comprende poner en contacto TWEAK o un complejo que contiene TWEAK con el anticuerpo. El método se puede utilizar en células in vitro, por ejemplo, en cultivo, por ejemplo in vitro o ex vivo. Por ejemplo, las células que expresan el receptor de TWEAK se pueden cultivar in vitro en medio de cultivo y se puede realizar la etapa de contacto mediante la adición de un anticuerpo anti-TWEAK al medio de cultivo. Alternativamente, el método puede realizarse en células presentes en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo in vivo (por ejemplo, terapéutico o profiláctico). Por ejemplo, el anticuerpo anti-TWEAK se puede liberar localmente o sistémicamente. En un caso, se utiliza un anticuerpo anti-TWEAK descrito en este documento para la preparación de un medicamento para modular la interacción entre TWEAK y una proteína receptora de TWEAK.

**[0022]** El método puede incluir poner en contacto TWEAK con el complejo receptor de TWEAK, o una subunidad del mismo, bajo condiciones que permiten que tenga lugar la interacción entre TWEAK y el complejo receptor de TWEAK, o una subunidad del mismo, para formar así una mezcla receptor de TWEAK/TWEAK. Generalmente, se dispone el anticuerpo anti-TWEAK en una cantidad eficaz, por ejemplo, de manera que el contacto de la mezcla receptor de TWEAK/TWEAK con el anticuerpo anti-TWEAK modula por ejemplo, interfiere con (por ejemplo, inhibe, bloquea o, en cualquier caso, reduce) la interacción entre TWEAK y la proteína receptora o al menos una función de TWEAK, por ejemplo, la señalización mediada por TWEAK.

**[0023]** La descripción también presente ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos, que codifican regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos anti-TWEAK, por ejemplo, tal como se describe en este documento. Por ejemplo, la descripción presenta un primer y un segundo ácido nucleico que codifica regiones variables de cadena pesada y ligera, respectivamente, de P2D10. En otro caso, la memoria presenta células huésped y vectores que contienen los ácidos nucleicos descritos en este documento.

**[0024]** La descripción también presenta el epítipo de TWEAK, por ejemplo, TWEAK humano, reconocido por P2D10 y proteínas capaces de interactuar con el epítipo. Por ejemplo, se pueden utilizar las proteínas y péptidos que incluyen el epítipo para generar o cribar otros compuestos de unión que interactúan con el epítipo, por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos o moléculas pequeñas. Por ejemplo, se puede utilizar un péptido que incluye el epítipo como inmunógeno o como una diana para el cribado de una biblioteca de expresión. También es posible evaluar compuestos por su capacidad de interactuar con el péptido, o, mediante el mapeo o determinación de la estructura, para evaluar compuestos por su capacidad para interactuar con el epítipo, por ejemplo, en el contexto de un TWEAK maduro. Una evaluación de ejemplo incluye la determinación de si el compuesto puede interactuar con TWEAK en presencia de un anticuerpo P2D10 competidor.

**[0025]** También se describen métodos para la liberación o direccionamiento de un agente, por ejemplo, un agente terapéutico (que incluye un agente genético) o un agente citotóxico, con un anticuerpo anti-TWEAK (por ejemplo, P2D10 u otro anticuerpo descrito en el presente documento) a una célula que expresa TWEAK o una estructura in vivo.

**[0026]** Tal como se utiliza en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que proporciona un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de cadena pesada (H) (abreviada en este documento como VH), y una región variable de cadena ligera (L) (abreviada en este documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de cadena pesada (H) y dos regiones variables de cadena ligera (L). El término "anticuerpo" comprende fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fd, fragmentos Fv y fragmentos dAb), así como anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, inmunoglobulinas de longitud completa de los tipos IgA, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgM (así como subtipos de los mismos). El término "anticuerpo de longitud completa" se refiere a un anticuerpo que tiene al menos el 96% de la longitud de un anticuerpo natural que se procesa para eliminar cualquier secuencia señal. Un anticuerpo de longitud completa puede incluir la longitud completa del anticuerpo natural, por

ejemplo, residuos desde residuo amino terminal de un anticuerpo natural (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) hasta su residuo carboxi terminal.

[0027] Una "secuencia del dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede formar la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la secuencia puede incluir toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable natural. Por ejemplo, la secuencia puede incluir o no uno, dos o más aminoácidos N o C terminal, o puede incluir otras alteraciones que son compatibles con la formación de la estructura de la proteína.

[0028] Una "composición aislada" se refiere a una composición que se extrae de al menos el 90% de al menos un componente de una muestra natural de la que se puede obtener la composición aislada. Las composiciones producidas artificialmente o de forma natural puede ser "composiciones de al menos" un cierto grado de pureza si la especie o población de especies de interés es al menos 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 95, 98, o 99 % pura sobre una base de peso con peso.

[0029] Un "epítipo" se refiere al sitio en un compuesto diana que está unido por un anticuerpo. En el caso en el que el compuesto diana es una proteína, por ejemplo, un epítipo puede referirse a los aminoácidos (en particular las cadenas laterales de aminoácidos) que están unidos por el anticuerpo. La superposición de epítipos incluye al menos un residuo de aminoácido común, por ejemplo, en al menos 2, 3, 4 ó 5 residuos de aminoácidos comunes.

[0030] Tal como se utiliza en este documento, el término "hibrida en condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad media, alta rigurosidad o muy alta rigurosidad" describe condiciones para hibridación y lavado. Puede encontrarse una orientación para la realización de las reacciones de hibridación en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1989), 6.3.1-6.3.6. Los métodos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia y se pueden utilizar cualquiera. Las condiciones de hibridación específicas referidas en este documento son las siguientes: 1) condiciones de hibridación de baja rigurosidad en 6X cloruro sódico/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de dos lavados en 0,2 X SSC, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55°C para condiciones de baja rigurosidad); 2) condiciones de hibridación de media rigurosidad en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2 X SSC, SDS al 0,1% a 60°C; 3) condiciones de hibridación de alta rigurosidad en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2 X SSC, SDS al 0,1% a 65°C; y preferiblemente 4) las condiciones de hibridación de rigurosidad muy alta son fosfato sódico 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido de uno o más lavados en 0,2 X SSC, SDS al 1% a 65°C. Las condiciones de alta rigurosidad (3) son las condiciones preferidas y las que deben utilizarse a menos que se especifique lo contrario.

[0031] Un "trastorno asociado con TWEAK" es cualquier trastorno en el que TWEAK contribuye a la etiología o un trastorno cuya condición, síntomas, o el riesgo de aparición se ve alterado por el suministro de un agente bloqueante de TWEAK.

[0032] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o pruebas descritas en este documento, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Además, las realizaciones de la invención descritas con respecto a CDR de Chothia también se pueden implementar usando CDR de Kabat.

[0033] En caso de conflicto, la presente memoria, incluyendo definiciones, controles. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos únicamente y no pretenden ser limitantes.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0034] P2D10 es un anticuerpo murino de ejemplo que se une específicamente a TWEAK humano e inhibe la función de TWEAK. También se describen las variantes del anticuerpo P2D10, incluyendo variantes humanizadas de ejemplo. Se pueden usar estos anticuerpos, otros anticuerpos anti-TWEAK, y otros agentes de bloqueo de TWEAK para tratar o prevenir trastornos mediados por TWEAK, por ejemplo, trastornos inflamatorios y otros trastornos descritos en este documento.

### Anticuerpos anti-TWEAK

[0035] Esta descripción incluye las secuencias de ejemplos específicos de anticuerpos anti-TWEAK, tales como P2D10, huP2D10-1, y huP2D10-2. Se pueden fabricar anticuerpos particulares, tales como estos, por ejemplo, mediante la preparación y la expresión de genes sintéticos que codifican las secuencias de aminoácidos citadas o mediante la mutación de genes de la línea germinal humana para proporcionar un gen que codifica las secuencias de aminoácidos citadas. Además, se pueden producir estos anticuerpos y otros anticuerpos anti-TWEAK, por ejemplo, usando uno o más de los métodos siguientes.

**[0036]** Existen numerosos métodos disponibles para la obtención de anticuerpos, en particular anticuerpos humanos. Un método de ejemplo incluye cribar bibliotecas de expresión de proteínas, por ejemplo, bibliotecas de expresión en fagos o ribosomas. La expresión en fagos se describe, por ejemplo, en US 5.223.409; Smith (1985) Science 228: 1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; y WO 90/02809. La expresión de Fab en fagos se describe, por ejemplo, en las patentes US. Nos 5.658.727; 5.667.988; y 5.885.793.

**[0037]** Además de la utilización de bibliotecas de expresión, se pueden utilizar otros métodos para obtener un anticuerpo de unión a TWEAK. Por ejemplo, la proteína TWEAK o un péptido de la misma pueden usarse como un antígeno en un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, hámster o rata.

**[0038]** El animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible diseñar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humana. Usando la tecnología de hibridoma, pueden producirse y seleccionarse anticuerpos monoclonales específicos de antígenos derivados de los genes con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, XENOMOUSE™, Green et al. (1994) Nature Genetics 7: 13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096, y WO 96/33735.

**[0039]** En otro caso, se obtiene un anticuerpo monoclonal a partir del animal no humano, y a continuación se modifica, por ejemplo, se humaniza o desinmuniza. Winter describe un método de injerto de CDR de ejemplo que puede usarse para preparar los anticuerpos humanizados descritos en este documento (US 5.225.539). Todas o algunas de las CDR de un anticuerpo humano particular pueden ser reemplazados por al menos una parte de un anticuerpo no humano. Puede que sólo sea necesario sustituir las CDR requeridas para la unión o determinantes de unión de dichas CDRs para llegar a un anticuerpo humanizado útil que se une a TWEAK.

**[0040]** Los anticuerpos humanizados pueden generarse reemplazando secuencias de la región variable Fv que no están implicadas directamente en la unión al antígeno por secuencias equivalentes de regiones variables Fv humanas. Los métodos generales para generar anticuerpos humanizados se proporcionan por Morrison, SL (1985) Science 229: 1202-1207, por Oi et al. (1986) BioTechniques 4: 214, y en US 5.585.089; US 5.693.761; US 5.693.762; US 5.859.205; y US 6.407.213. Esos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácidos nucleicos que codifican toda o parte de las regiones variables Fv de inmunoglobulina de al menos una de una cadena pesada o ligera. Las fuentes de dichos ácidos nucleicos son bien conocidas por los expertos en la materia y, por ejemplo, se pueden obtener a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, tal como se describe anteriormente, a partir de genes de inmunoglobulina de la línea germinal, o a partir de construcciones sintéticas. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado puede a continuación clonarse en un vector de expresión apropiado.

**[0041]** Las secuencias de la línea germinal humana, por ejemplo, se describen en Tomlinson, I.A. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798; Cook, GP et al. (1995) Immunol. Today 16: 237- 242; Chothia, D. et al. (1992) J. Mol. Bio. 227: 799-817; y Tomlinson et al. (1995) EMBO J 14: 4628 a 4.638. El directorio V BASE ofrece un amplio directorio de secuencias de región variable de inmunoglobulina humana (compiladas por Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido). Estas secuencias se pueden utilizar como una fuente de secuencia humana, por ejemplo, para las regiones de armazón y CDR. También se pueden utilizar regiones de armazón humano de consenso, por ejemplo, tal como se describe en la patente US. No. 6.300.064.

**[0042]** Un anticuerpo de unión a TWEAK no humano también puede modificarse mediante delección específica de epítomos de células T humanas o "desinmunización" mediante los métodos descritos en WO 98/52976 y WO 00/34317. Brevemente, pueden analizarse las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo para los péptidos que se unen a MHC de clase II; estos péptidos representan epítomos potenciales de células T (tal como se definen en WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de epítomos potenciales de células T, se puede aplicar una estrategia de modelado por ordenador denominada "peptide threading", y, además, se pueden buscar en una base de datos de péptidos humanos que se unen a MHC de clase II motivos presentes en las secuencias VH y VL, tal como se describe en WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de las 18 alotipos principales de DR de MHC de clase II, y por lo tanto constituyen epítomos potenciales de células T. Los epítomos potenciales de células T detectados se pueden eliminar mediante la sustitución de un pequeño número de residuos de aminoácidos en las regiones variables, o preferiblemente, mediante sustituciones de aminoácidos individuales. En la medida de lo posible, se hacen sustituciones conservadoras. A menudo, pero no exclusivamente, se puede utilizar un aminoácido común a una posición en secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana. Después de identificar los cambios de desinmunización, se pueden construir ácidos nucleicos que codifican V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> mediante mutagénesis u otros métodos sintéticos (por ejemplo, la síntesis de novo, la sustitución de casete, y así sucesivamente). Una secuencia variable mutagenizada puede, opcionalmente, estar fusionado a una región constante humana, por ejemplo, IgG1 o regiones constantes kappa humana.

**[0043]** En algunos casos, un epítomo potencial de célula T incluirá residuos que se sabe o se predice que son importantes para la función del anticuerpo. Por ejemplo, los epítomos potenciales de células T generalmente se inclinan por las CDR. Además, los epítomos potenciales de células T pueden aparecer en los residuos del armazón importantes para la estructura y unión al anticuerpo. Los cambios para eliminar estos posibles epítomos requerirán

en algunos casos un mayor escrutinio, por ejemplo, fabricando y probando cadenas con y sin el cambio. Cuando sea posible, los epítomos potenciales de células T que se superponen con las CDR pueden eliminarse mediante sustituciones fuera de las CDR. En algunos casos, una alteración dentro de una CDR es la única opción, y por lo tanto, pueden probarse variantes con y sin esta sustitución. En otros casos, la sustitución requerida para eliminar un epítomo potencial de célula T se encuentra en una posición de residuo en el armazón que podría ser crítica para la unión a anticuerpos. En estos casos, se prueban las variantes con y sin esta sustitución. Por lo tanto, en algunos casos, se diseñan varias variantes de regiones variables de cadena pesada y ligera des inmunizadas y se prueban diversas combinaciones de cadenas pesada/ligera para identificar el anticuerpo des inmunizado óptimo. La elección del anticuerpo des inmunizado final puede hacerse teniendo en cuenta la afinidad de unión de las diferentes variantes conjuntamente con el grado de des inmunización, en particular, el número de epítomos posibles de células T restantes en la región variable. La des inmunización se puede utilizar para modificar cualquier anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo que incluye una secuencia no humana, por ejemplo, un anticuerpo sintético, un anticuerpo murino, otro anticuerpo monoclonal no humano, o un anticuerpo aislado de una biblioteca de expresión.

**[0044]** Se pueden usar también otros métodos para humanizar anticuerpos. Por ejemplo, otros métodos pueden justificar la estructura tridimensional del anticuerpo, las posiciones del armazón que están en la proximidad de tres dimensiones a los determinantes de unión, y secuencias de péptidos inmunogénicos. Véase, por ejemplo, el documento WO 90/07861; Patente de Estados Unidos. Nos 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; 5.530.101; y 6.407.213; Tempest et al. (1991) *Biotechnology* 9: 266-271. Todavía otro método se denomina "humanización" y se describe, por ejemplo, en el documento US 2005-008625.

**[0045]** El anticuerpo puede incluir una región Fc humana, por ejemplo, una región Fc de tipo salvaje o una región Fc que incluye una o más alteraciones. En una realización, la región constante se altera, por ejemplo, se muta, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o disminuir uno o más de: unión al receptor Fc, glicosilación de los anticuerpos, el número de residuos de cisteína, la función celular efectora, o la función de complemento). Por ejemplo, la región constante IgG1 humana se puede mutar en uno o más residuos, por ejemplo, uno o más de los residuos 234 y 237. Los anticuerpos pueden tener mutaciones en la región CH2 de la cadena pesada que reducen o alteran la función efectora, por ejemplo, la unión al receptor Fc y la activación del complemento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden tener mutaciones, tales como las descritos en la patente de Estados Unidos Nos. 5.624.821 y 5.648.260. Los anticuerpos también pueden tener mutaciones que estabilizan el enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas de una inmunoglobulina, tales como mutaciones en la región bisagra de IgG4, tal como se describe en la técnica (por ejemplo, Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30: 105-08). Véase también, por ejemplo, US 2005-0037000.

**[0046] Maduración de afinidad.** En un caso, se modifica un anticuerpo anti-TWEAK, por ejemplo, mediante mutagénesis, para proporcionar un conjunto de anticuerpos modificados. Los anticuerpos modificados se evalúan a continuación para identificar uno o más anticuerpos que tienen propiedades funcionales alteradas (por ejemplo, unión mejorada, estabilidad mejorada, antigenicidad reducida, o estabilidad aumentada *in vivo*). En una implementación, la tecnología de bibliotecas de expresión se utiliza para seleccionar o cribar el conjunto de anticuerpos modificados. Los anticuerpos con mayor afinidad se identifican a continuación a partir de la segunda biblioteca, por ejemplo, mediante el uso de mayor rigurosidad o condiciones de unión y lavado más competitivas. También pueden utilizarse otras técnicas de cribado.

**[0047]** En algunas implementaciones, la mutagénesis se dirige a regiones conocidas o que pueden estar en la interfase de unión. Si, por ejemplo, las proteínas de unión identificadas son anticuerpos, entonces la mutagénesis puede dirigirse a las regiones CDR de las cadenas pesadas o ligeras, tal como se describe en este documento. Además, la mutagénesis puede dirigirse a regiones de armazón cerca o adyacentes a las CDR, por ejemplo, regiones de armazón, en particular dentro de 10, 5, ó 3 aminoácidos de una unión de CDR. En el caso de anticuerpos, la mutagénesis también puede limitarse a uno o unos pocos de los CDRs, por ejemplo, para hacer mejoras graduales.

**[0048]** En una realización, la mutagénesis se utiliza para fabricar un anticuerpo más similar a una o más secuencias de la línea germinal. Un método para la línea germinal de ejemplo puede incluir: la identificación de una o más secuencias de la línea germinal que son similares (por ejemplo, más similar en una base de datos en particular) a la secuencia del anticuerpo aislado. A continuación, se pueden realizar mutaciones (a nivel de aminoácido) en el anticuerpo aislado, ya sea de forma incremental, en combinación, o ambos. Por ejemplo, se fabrica una biblioteca de ácidos nucleicos que incluye secuencias que codifican algunas o todas las posibles mutaciones de la línea germinal. Los anticuerpos mutados se evalúan a continuación, por ejemplo, para identificar un anticuerpo que tiene uno o más residuos adicionales de línea germinal en relación con el anticuerpo aislado y que todavía es útil (por ejemplo, tiene una actividad funcional). En un caso, se introducen tantos residuos de la línea germinal en un anticuerpo aislado como sea posible.

**[0049]** En un caso, la mutagénesis se utiliza para sustituir o insertar uno o más residuos de la línea germinal en una región CDR. Por ejemplo, el residuo CDR de la línea germinal puede ser de una secuencia de línea germinal que es similar (por ejemplo, más similar) a la región variable que está siendo modificada. Después de la mutagénesis, se

puede evaluar la actividad (por ejemplo, unión u otra actividad funcional) del anticuerpo para determinar si se toleran el residuo o residuos de la línea germinal. Se pueden realizar mutagénesis similares en las regiones armazón.

5 [0050] La selección de una secuencia de la línea germinal se puede realizar de diferentes maneras. Por ejemplo, se puede seleccionar una secuencia de la línea germinal si cumple unos criterios predeterminados para la selectividad o similitud, por ejemplo, al menos un cierto porcentaje de identidad, por ejemplo, al menos 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 99,5% de identidad, con respecto al anticuerpo donante no humano. La selección puede realizarse utilizando al menos 2, 3, 5, ó 10 secuencias de la línea germinal. En el caso de CDR1 y CDR2, la identificación de una secuencia de la línea germinal similar puede incluir la selección de una de dichas secuencias. 10 En el caso de CDR3, la identificación de una secuencia de la línea germinal similar puede incluir la selección de una de dichas secuencias, pero puede incluir el uso de dos secuencias de la línea germinal que contribuyen por separado a la parte amino-terminal y la parte carboxi-terminal. En otras implementaciones, se utilizan más de una o dos secuencias de la línea germinal, por ejemplo, para formar una secuencia de consenso.

15 [0051] En otros casos, el anticuerpo puede modificarse para tener un patrón de glicosilación alterado (es decir, alterado a partir del patrón de glicosilación original o nativo). Tal como se usa en este contexto, "alterado" significa que tiene uno o más grupos carbohidrato eliminados, y/o que tiene uno o más sitios de glicosilación añadidos al anticuerpo original. La adición de sitios de glicosilación a los anticuerpos descritos en el presente documento puede llevarse a cabo mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos para que contenga secuencias de consenso 20 en el sitio de glicosilación; dichas técnicas son bien conocidas en el sector. Otro medio para aumentar el número de grupos carbohidrato en los anticuerpos es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a los residuos de aminoácidos del anticuerpo. Estos métodos se describen en, por ejemplo, el documento WO 87/05330, y Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. 22: 259-306. La eliminación de cualquier grupo carbohidrato presentes en los anticuerpos puede conseguirse química o enzimáticamente tal como se describe en la técnica (Hakimuddin et al. 25 (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259: 52; Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118: 131; y Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138: 350). Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.869.046 para una modificación que aumenta la vida media in vivo al proporcionar un epítipo de unión a receptor de rescate.

30 [0052] En un caso, un anticuerpo tiene secuencias CDR que difieren sólo insustancialmente de las de P2D10. Las diferencias insustanciales incluyen cambios de aminoácidos menores, tales como sustituciones de 1 ó 2 de cualquiera de habitualmente 5-7 aminoácidos en la secuencia de una CDR, por ejemplo, CDR de Chothia o Kabat. Habitualmente se sustituye un aminoácido por un aminoácido relacionado que tienen características de carga, hidrofobicidad, o estereoquímicas similares. Dichas sustituciones estarían dentro de las habilidades del experto en la materia. A diferencia de las CDR, los cambios más sustanciales en regiones de armazón de estructura (FR) se 35 pueden hacer sin afectar adversamente las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en las FR incluyen, pero sin limitación, la humanización de un armazón derivado no humano o el diseño de ciertos residuos de armazón que son importantes para el contacto con el antígeno o para estabilizar el sitio de unión, por ejemplo, cambiando la clase o subclase de la región constante, cambiando residuos de aminoácidos específicos que puedan alterar una función efectora, tal como la unión al receptor Fc (Lund et al. (1991) J. Immun. 147: 2657-62; Morgan et al. (1995) 40 Immunology 86: 319-24), o cambiando la especie de la que deriva la región constante.

[0053] Los anticuerpos anti-TWEAK pueden estar en forma de anticuerpos de longitud completa, o en forma de fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, dAb, y scFv. Las formas adicionales incluyen una proteína que incluye un dominio variable sencillo, por ejemplo, un dominio de camello o camélidos. Véase, por 45 ejemplo, US 2005-0079574 y Davies et al. (1996) Protein Eng. 9 (6): 531-7.

[0054] **Producción de anticuerpos.** Algunos anticuerpos, por ejemplo, Fab, se pueden producir en células bacterianas, por ejemplo, células de E. coli. Los anticuerpos también se pueden producir en células eucariotas. En una realización, los anticuerpos (por ejemplo, scFv) se expresan en una célula de levadura, tal como *Pichia* (véase, 50 por ejemplo, Powers et al. (2001) J. Immunol. Methods. 251: 123-35), *Hanseula*, o *Saccharomyces*.

[0055] En una realización preferida, los anticuerpos se producen en células de mamífero. Los ejemplos de células huésped de mamífero para expresar un anticuerpo incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO *dhfr*, descritas en Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 4216-4220, usadas con un 55 marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, tal como se describe en Kaufman y Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, y una célula de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial mamaria.

[0056] Además de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de inmunoglobulina diversificado, los 60 vectores de expresión recombinantes pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, habitualmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o 65 metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector.

**[0057]** En un sistema de ejemplo para la expresión de anticuerpos, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células CHO *dhfr* mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno operativamente unidos a elementos reguladores potenciadores/promotores (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento regulador potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen de DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando la selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y el anticuerpo se recupera del medio de cultivo. Se utilizan técnicas de biología molecular estándar para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, se pueden aislar algunos anticuerpos mediante cromatografía de afinidad con una matriz acoplada a proteína A o proteína G.

**[0058]** Para los anticuerpos que incluyen un dominio Fc, el sistema de producción de anticuerpos sintetiza preferiblemente anticuerpos en los que la región Fc está glicosilada. Por ejemplo, el dominio Fc de las moléculas de IgG está glicosilado en la asparagina 297 en el dominio CH2. Esta asparagina es el sitio para la modificación con oligosacáridos de tipo biantenarico. Se ha demostrado que se requiere esta glicosilación para las funciones efectoras mediadas por receptores Fc $\gamma$  y complemento C1q (Burton y Woof (1992) *Adv. Immunol.* 51: 1-84; Jefferis et al. (1998) *Immunol. Rev.* 163: 59-76). En una realización, el dominio Fc se produce en un sistema de expresión de mamífero que glicosila adecuadamente el residuo correspondiente a la asparagina 297. El dominio Fc u otra región del anticuerpo también pueden incluir otras modificaciones postraduccionales eucariotas.

**[0059]** Los anticuerpos también se pueden producir por un animal transgénico. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.849.992 describe un método para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Un transgén se construye incluyendo un promotor específico de la leche y ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de interés y una secuencia señal para la secreción. La leche producida por las hembras de dichos mamíferos transgénicos incluye, secretado en la misma, el anticuerpo de interés. El anticuerpo puede purificarse de la leche, o para algunas aplicaciones, utilizarse directamente.

#### Caracterización

**[0060]** Las propiedades de unión de un anticuerpo pueden medirse mediante cualquier método estándar, por ejemplo, uno de los métodos siguientes: análisis BIACORE<sup>TM</sup>, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), cristalografía de rayos X, análisis de secuencias y la mutagénesis de barrido. La capacidad de una proteína para inhibir una o más actividades de TWEAK puede evaluarse *in vitro* o en un modelo animal de un trastorno, por ejemplo, un trastorno descrito en este documento. Preferiblemente, el anticuerpo tiene un efecto estadísticamente significativo que indica que el anticuerpo inhibe una o más actividades de TWEAK.

**[0061]** En un caso, un anticuerpo se evalúa por la inhibición de la capacidad de TWEAK para estimular la producción de IL-8, MMP-1, PGE2, IL-6, IP-10 y RANTES en fibroblastos dérmicos. Véase Chicheportiche et al. (2002) *Arthritis Res.* 4 (2): 126-133 para las condiciones de ensayo adecuadas.

**[0062]** En otro caso, se evalúa un anticuerpo por su capacidad para inhibir TWEAK de estimular la proliferación de una célula endotelial. Véase, por ejemplo, de US 2003-0211993 que describe el siguiente ensayo de proliferación (así como otros ensayos útiles): se siembran HVEC en placas de microtitulación de 96 pocillos en subconfluencia (4.000 células por pocillo) y se cultivan durante la noche en medio CS-C sin adición de suplementos de crecimiento proveedor. Se reemplaza el medio por medios completos, o por medio basal. Las células se cultivan en medio basal con o sin TWEAK (100 ng/ml), bFGF usando una dilución 1/500 a 1/1000 de suplemento de crecimiento bFGF (Clonetics) o 1 ng/ml (R&D Systems), VEGF (10 ng/ml) o combinaciones de estos factores. Cuando se indique, también se añaden 10  $\mu$ g/ml del anticuerpo que se investiga o un anticuerpo de control. Las células se incuban a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante tres días y se midió la proliferación mediante un pulso con <sup>3</sup>H-timidina durante las últimas 10 horas de cultivo. Se puede medir la radiactividad unida a la célula con un BETAPLATE<sup>TM</sup> (EG&G Wallac, Gaithersburg, Md.). Una disminución en la proliferación mediada por TWEAK o la combinación de TWEAK y bFGF puede indicar que el anticuerpo es eficaz en el bloqueo de la actividad de TWEAK.

**[0063] Resonancia de plasmones superficiales (SPR).** La interacción de unión de una proteína de interés y una diana (por ejemplo, TWEAK) se puede analizar usando SPR. La SPR o el Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) detectan interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes. Los cambios en la masa en la superficie de unión (indicativos de una unión) del chip de BIA dan lugar a alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia de plasmones superficiales (SPR)). Los cambios en la refractividad generan una señal detectable, que se mide como una indicación de las reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas. Los métodos para utilizar SPR se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.641.640; Raether (1988) *Surface Plasmons* Springer Verlag; Sjolander y Urbaniczky (1991)

Anal. Chem. 63: 2338-2345; Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705 y recursos en línea proporcionados por BIAcore International AB (Uppsala, Suecia). La Información de SPR se puede utilizar para proporcionar una medida precisa y cuantitativa de la constante de equilibrio de disociación ( $K_d$ ), y los parámetros cinéticos, incluyendo  $K_{on}$  y  $K_{off}$ , para la unión de una biomolécula a una diana.

**[0064]** Los epítomos también se pueden mapear directamente mediante la evaluación de la capacidad de los diferentes anticuerpos de competir entre sí por la unión a TWEAK (por ejemplo, TWEAK humano, particularmente TWEAK humano soluble) usando técnicas cromatográficas de BIAcore (Pharmacia BIAtechnology Handbook, "Epitope Mapping", Sección 6.3.2, (mayo de 1994), véase también Johne et al (1993) J. Immunol. Methods, 160: 191-198). Una orientación general adicional para la evaluación de anticuerpos, por ejemplo, en transferencias Western y ensayos de inmunoprecipitación, se puede encontrar en Antibodies: A Laboratory Manual, ed. por Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Press (1988)).

#### Trastornos asociados a TWEAK

**[0065]** Se puede utilizar un anticuerpo anti-TWEAK (tal como un anticuerpo descrito en el presente documento) para tratar una variedad de trastornos, tales como un trastorno asociado a TWEAK. Por ejemplo, el anticuerpo se puede utilizar para tratar trastornos inflamatorios, inmunológicos, o autoinmunes en pacientes, así como trastornos neoplásicos. Ejemplos de trastornos asociados a TWEAK inflamatorios incluyen la artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria intestinal (incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), psoriasis, o miositis inflamatoria. Todavía otros ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden tratarse incluyen histiocitosis de células de Langerhans, síndrome de distrés respiratorio del adulto/bronquiolitis obliterante, granulomatosis de Wegener, vasculitis, caquexia, estomatitis, fibrosis pulmonar idiopática, dermatomiositis o polimiositis, escleritis no infecciosa, sarcoidosis crónica con afectación pulmonar, síndromes mielodisplásicos/anemia refractaria con exceso de blastos, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica de moderada a severa, y la arteritis de células gigantes.

**[0066]** A un sujeto que está en riesgo de, diagnosticado con, o que tiene uno de estos trastornos se le puede administrar un anticuerpo anti-TWEAK en una cantidad y durante un tiempo para proporcionar un efecto terapéutico global. El anticuerpo anti-TWEAK se puede administrar solo o en combinación con otros agentes. Se han descrito métodos para administrar un agente de bloqueo de TWEAK en combinación con un agente de bloqueo de TNF- $\alpha$ . En el caso de una terapia de combinación, las cantidades y tiempos de administración pueden ser los que proporcionan, por ejemplo, un efecto terapéutico sinérgico. Además, la administración del agente de bloqueo de TWEAK (con o sin el segundo agente) se puede utilizar como un tratamiento primario, por ejemplo, un tratamiento de primera línea, o como un tratamiento secundario, por ejemplo, para sujetos que tienen una respuesta inadecuada a una terapia previamente administrada (es decir, una terapia que no sea con un agente de bloqueo de TWEAK).

#### Artritis reumatoide (RA)

**[0067]** Se puede utilizar un anticuerpo anti-TWEAK (tal como un anticuerpo descrito en el presente documento) para tratar la artritis reumatoide y trastornos relacionados. La artritis reumatoide ("RA") es una enfermedad inflamatoria crónica que provoca dolor, hinchazón, rigidez y pérdida de función, principalmente en las articulaciones. La RA comienza con frecuencia en la membrana sinovial, la membrana que rodea una articulación creando un saco protector. En muchos individuos que sufren de RA, los leucocitos se infiltran desde la circulación en la membrana sinovial causando una inflamación continua anormal (por ejemplo, sinovitis). En consecuencia, la membrana sinovial se inflama, causando calor, enrojecimiento, hinchazón y dolor. El colágeno en el cartílago se destruye gradualmente, estrechando el espacio articular y finalmente dañando el hueso. La inflamación provoca un daño erosivo de los huesos en la zona afectada. Durante este proceso, las células de la membrana sinovial crecen y se dividen de manera anormal, haciendo que la membrana sinovial normalmente delgada se vuelva gruesa y de lugar a una articulación inflamada e hinchada al tacto.

**[0068]** A medida que avanza la AR, las células sinoviales anormales pueden invadir y destruir el cartílago y el hueso dentro de la articulación. Los músculos, ligamentos y tendones circundantes que sostienen y estabilizan la articulación puede llegar a ser débiles e incapaces de trabajar normalmente. La RA también puede causar una pérdida de hueso más generalizada que puede conducir a la osteoporosis, haciendo los huesos frágiles y más propensos a la fractura. Todos estos efectos causan el dolor, el deterioro y deformidades asociados con la RA. Las regiones que pueden afectarse incluyen las muñecas, nudillos, rodillas y la parte anterior del pie. A menudo, pueden estar implicadas muchas articulaciones, e incluso la columna vertebral pueden verse afectada. En aproximadamente el 25% de las personas con RA, la inflamación de los vasos sanguíneos pequeños puede causar nódulos o bultos reumatoides, bajo la piel, que a menudo se forman cerca de las articulaciones. A medida que la enfermedad progresa, el fluido también se puede acumular, en particular en los tobillos. Muchos pacientes con RA también desarrollan anemia, o una disminución en el número normal de glóbulos rojos.

**[0069]** La RA comprende un número de subtipos de la enfermedad, tal como el síndrome de Felty, la RA seronegativa, la RA "clásica", la RA progresiva y/o recurrente, y la RA con vasculitis. Algunos expertos clasifican la enfermedad en el tipo 1 o tipo 2. El tipo 1, la forma menos común, dura unos pocos meses, como máximo, y no deja

incapacidad permanente. El tipo 2 es crónica y dura durante años, a veces de por vida. La RA también puede manifestarse como nódulos reumatoides subcutáneos, nódulos viscerales, vasculitis que causa úlceras en las piernas o mononeuritis múltiple, derrame pleural o pericárdico, linfadenopatía, síndrome de Felty, síndrome de Sjogren, y epiescleritis. Estos subtipos de la enfermedad y también los sujetos que muestran uno o más de los síntomas anteriores pueden tratarse usando los anticuerpos descritos en el presente documento.

[0070] La RA se puede evaluar mediante una variedad de medidas clínicas. Algunos indicios de ejemplo incluyen la puntuación total de Sharp (TSS), la puntuación de la erosión de Sharp, y el índice de discapacidad HAQ. Los métodos del presente documento se pueden utilizar para lograr una mejora para al menos uno de estos indicios. Las propiedades terapéuticas de un anticuerpo anti-TWEAK para el tratamiento de la RA se pueden evaluar en un modelo animal, por ejemplo, usando el modelo de artritis inducida por colágeno en ratón (mCIA) (véase, por ejemplo, Stuart et al., J. Clin. Invest. 69: 673-683 (1982).

#### Esclerosis múltiple

[0071] Se puede utilizar un anticuerpo anti-TWEAK (tal como un anticuerpo descrito en el presente documento) para tratar la esclerosis múltiple (MS) y trastornos relacionados. La MS es una enfermedad del sistema nervioso central que se caracteriza por la inflamación y pérdida de vainas de mielina.

[0072] Los pacientes que tienen MS pueden identificarse por los criterios que establecen un diagnóstico de EM clínicamente definido tal como se define en el taller sobre el diagnóstico de la EM (Poser et al., Ann. Neurol. (1983) 13: 227). Brevemente, un individuo con MS clínicamente definida ha tenido dos ataques y evidencia clínica de cualquiera de dos lesiones o evidencia clínica de una lesión y evidencia paraclínica de otra lesión independiente. La MS definida también puede diagnosticarse por la evidencia de dos ataques y bandas oligoclonales de IgG en el fluido cerebroespinal o por combinación de un ataque, evidencia clínica de dos lesiones y banda oligoclonal de IgG en el fluido cerebroespinal.

[0073] El tratamiento eficaz de la esclerosis múltiple puede examinarse de varias maneras diferentes. Se pueden usar los siguientes parámetros para medir la eficacia del tratamiento. Se utilizan tres criterios principales: EDSS (escala del estado de discapacidad ampliada), aparición de exacerbaciones o MRI (imágenes por resonancia magnética). La EDSS es un medio para medir el grado de deterioro clínico debido a la EM (Kurtzke (1983) Neurology 33: 1444). Se evalúan ocho sistemas funcionales para el tipo y la gravedad del deterioro neurológico. Brevemente, antes del tratamiento, los pacientes se evalúan por el deterioro en los sistemas siguientes: piramidal, cerebelo, tronco cerebral, sensorial, intestino y vejiga, visual, cerebral, y otro. Se realizan seguimientos a intervalos definidos. La escala varía de 0 (normal) a 10 (muerte debida a EM). Una disminución en la EDSS indica un tratamiento eficaz (Kurtzke (1994) Ann. Neurol. 36: 573-79).

[0074] Un modelo animal de ejemplo para la esclerosis múltiple es el modelo experimental de encefalitis autoinmune (EAE) de ratón, por ejemplo, tal como se describe en Tuohy et al. (J. Immunol. (1988) 141: 1126-1130), Sobel et al. (J. Immunol. (1984) 132: 2393-2401), y Traugott (Cell Immunol. (1989) 119: 114-129). A los ratones se les puede administrar un anticuerpo descrito en el presente documento antes de la inducción de EAE. Los ratones se evalúan por criterios característicos para determinar la eficacia del anticuerpo.

#### Apoplejía

[0075] Se puede utilizar un anticuerpo anti-TWEAK (tal como un anticuerpo descrito en el presente documento) para tratar a un sujeto que ha experimentado una apoplejía, por ejemplo, una apoplejía tromboembólica o hemorrágica (por ejemplo, dentro de las últimas 48, 24, 12, 8, ó 2 horas), o para prevenir una apoplejía, por ejemplo, en un sujeto en riesgo de apoplejía. La apoplejía es un término general para el daño cerebral agudo que resulta de una enfermedad de los vasos sanguíneos. La apoplejía puede clasificarse en al menos dos categorías principales: apoplejía hemorrágica (resultante de la fuga de sangre fuera de los vasos sanguíneos normales) y apoplejía isquémica (isquemia cerebral debido a la falta de suministro de sangre). Algunos sucesos que pueden causar una apoplejía isquémica incluyen la trombosis, embolia, y la hipoperfusión sistémica (con la isquemia y la hipoxia resultantes).

[0076] La apoplejía generalmente causa la muerte neuronal y lesiones en el cerebro por falta de oxígeno y sucesos secundarios. El área del cerebro que muere como resultado de la falta de suministro de sangre u otro daño se denomina un infarto. En algunos casos, los tratamientos descritos en el presente documento pueden utilizarse para reducir o minimizar el tamaño de un infarto, por ejemplo, mediante la reducción de sucesos secundarios que causan la muerte o lesión neuronal.

[0077] La obstrucción de una arteria cerebral como resultado de un trombo que se ha acumulado en la pared de una arteria cerebral se denomina generalmente trombosis cerebral. En la embolia cerebral, el material oclusivo que bloquea la arteria cerebral surge aguas abajo en la circulación (por ejemplo, la embolia es llevada a la arteria cerebral desde el corazón). Debido a que es difícil discernir si una apoplejía es causada por trombosis o embolia, el término tromboembolia se utiliza para cubrir ambos tipos de apoplejía. La hipoperfusión sistémica puede surgir como

consecuencia de la disminución de los niveles de sangre, disminución del hematocrito, presión arterial baja o incapacidad del corazón para bombear sangre adecuadamente.

- 5 **[0078]** Además, se puede administrar un anticuerpo anti-TWEAK como terapia profiláctica de la apoplejía, o como un componente de la misma, por ejemplo, a un sujeto que ha experimentado un ataque isquémico transitorio (TIA) o muestra síntomas de TIA.

#### Trastornos neuronales

- 10 **[0079]** Se puede utilizar un anticuerpo anti-TWEAK (tal como un anticuerpo descrito en el presente documento) para tratar o prevenir trastornos neuronales, tales como traumas mecánicos neuronales y trastornos neurodegenerativos. Ejemplos de traumas mecánicos neuronales incluyen la lesión de la médula espinal (SCI) y la lesión cerebral traumática (TBI). Ejemplos de trastornos neurodegenerativos incluyen la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la parálisis bulbar progresiva (PBP), esclerosis lateral primaria (PLS), atrofia muscular progresiva (PMA), la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington (HD) y la enfermedad de Alzheimer. En un caso, el trastorno neuronal se caracteriza principalmente por la destrucción o muerte de las células nerviosas, por ejemplo, de las neuronas motoras (por ejemplo, ALS), de las neuronas del cuerpo estriado de los ganglios basales y/o las neuronas corticales (por ejemplo, enfermedad de Huntington), de neuronas de la sustancia negra (por ejemplo, enfermedad de Parkinson).

#### Cáncer

- 25 **[0080]** TWEAK y sus receptores pueden estar implicados en el desarrollo de al menos algunos tipos de cáncer, por ejemplo, un cáncer de páncreas. Se puede utilizar un anticuerpo anti-TWEAK (tal como un anticuerpo descrito en el presente documento) para tratar o prevenir los cánceres (por ejemplo, adenocarcinomas) y otros trastornos neoplásicos.

#### Composiciones farmacéuticas

- 30 **[0081]** Se puede formular un anticuerpo anti-TWEAK (tal como un anticuerpo descrito en el presente documento) como una composición farmacéutica para la administración a un sujeto, por ejemplo, para tratar un trastorno descrito en el presente documento. Habitualmente, una composición farmacéutica incluye un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. La composición puede incluir una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una sal de adición de ácido o una sal de adición de base (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

- 40 **[0082]** La formulación farmacéutica es una técnica bien establecida, y se describe con más detalle, por ejemplo, en Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>a</sup> ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7<sup>a</sup> Ed, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); y Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3<sup>a</sup> ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

- 45 **[0083]** Las composiciones farmacéuticas pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida puede depender del modo pretendido de administración y la aplicación terapéutica. Habitualmente las composiciones para los agentes descritos en este documento están en la forma de soluciones inyectables o infusibles.

- 50 **[0084]** En una realización, el anticuerpo anti-TWEAK está formulado con materiales excipientes, tales como cloruro de sodio, fosfato de sodio dibásico heptahidratado, fosfato monobásico de sodio, y un estabilizador. Se puede proporcionar, por ejemplo, en una solución tamponada a una concentración adecuada y se puede almacenar a 2-8°C.

- 60 **[0085]** Dichas composiciones pueden administrarse por un modo parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular). Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente", tal como se usa en el presente documento, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural y intrasternal.

- 65 **[0086]** La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para el almacenamiento estable a alta concentración. Las soluciones inyectables estériles

pueden prepararse mediante la incorporación de un agente descrito en el presente documento en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de un agente descrito en el presente documento en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que producen un polvo de un agente descrito en el presente documento más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

**[0087]** En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-TWEAK se puede preparar con un portador que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, JR Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1978).

**[0088]** Se puede modificar un anticuerpo anti-TWEAK, por ejemplo, con un grupo que mejora su estabilización y/o retención en circulación, por ejemplo, en sangre, suero, u otros tejidos, por ejemplo, en al menos 1,5, 2, 5, 10, ó 50 veces. El anticuerpo modificado puede evaluarse para determinar si se puede llegar a los sitios de inflamación, por ejemplo, las articulaciones.

**[0089]** Por ejemplo, el anticuerpo anti-TWEAK puede asociarse con (por ejemplo, conjugarse a) un polímero, por ejemplo, un polímero sustancialmente no antigénico, tal como un óxido de polialquileno o un óxido de polietileno. Los polímeros adecuados variarán sustancialmente en peso. Se pueden utilizar polímeros que tienen pesos moleculares promedio en número que van desde aproximadamente 200 a aproximadamente 35.000 Daltons (o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 15.000, y de 2.000 a aproximadamente 12.500).

**[0090]** Por ejemplo, el anticuerpo anti-TWEAK puede conjugarse con un polímero soluble en agua, por ejemplo, un polímero de polivinilo hidrófilo, por ejemplo, alcohol polivinílico o polivinilpirrolidona. Ejemplos de dichos polímeros incluyen homopolímeros de óxido de polialquileno, tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloque de los mismos, siempre que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros de bloque. Polímeros útiles adicionales incluyen polioialquilenos, tales como polioxietileno, polioxipropileno, y copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno; polimetacrilatos; carbómeros; y polisacáridos ramificados o no ramificados.

**[0091]** En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-TWEAK también puede acoplarse o, en cualquier caso, asociarse a una etiqueta u otro agente, por ejemplo, otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o citostático, aunque, en muchas realizaciones, esta configuración es innecesaria. Ejemplos de agentes citotóxicos y quimioterapéuticos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, vinblastina, doxorubicina, daunorrubicina, un maitansinoide (por ejemplo, maitansinol o el maitansinoide DM1, un derivado que contiene sulfhidrilo de maitansina), mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, taxano, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

**[0092]** Cuando se usa el anticuerpo anti-TWEAK en combinación con un segundo agente (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  u otro agente), los dos agentes se pueden formular por separado o juntos. Los agentes pueden formularse o, en cualquier caso utilizarse, en una cantidad sinérgicamente eficaz. También es posible usar uno o ambos de los agentes en cantidades menores a las que se utilizarían para monoterapia. Por ejemplo, las respectivas composiciones farmacéuticas se pueden mezclar, por ejemplo, justo antes de la administración, y administrarse juntas o se pueden administrar por separado, por ejemplo, a la vez o en diferentes tiempos.

**[0093]** También es posible utilizar otros agentes que bloquean TWEAK. El agente puede ser cualquier tipo de compuesto (por ejemplo, molécula pequeña orgánica o inorgánica, ácido nucleico, proteína, o mimético de péptido) que pueda ser administrado a un sujeto. En una realización, el agente de bloqueo es un compuesto biológico, por ejemplo, una proteína que tiene un peso molecular de entre 5-300 kDa. Por ejemplo, un agente de bloqueo de TWEAK puede inhibir la unión de TWEAK a un receptor de TWEAK. Los agentes de bloqueo de TWEAK de ejemplo, aparte de los anticuerpos que se unen a TWEAK, incluyen anticuerpos que se unen a TWEAK-R y formas solubles del TWEAK-R (por ejemplo, Fn14) que compiten con TWEAK-R de la superficie de la célula por la unión a TWEAK. Otros agentes terapéuticos descritos en el presente documento también se pueden proporcionar como una composición farmacéutica, por ejemplo, mediante métodos estándar o métodos descritos en el presente documento.

Administración

5 [0094] El anticuerpo anti-TWEAK se puede administrar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, mediante una variedad de métodos. Para muchas aplicaciones, la vía de administración es uno de: inyección o infusión intravenosa (IV), inyección subcutánea (SC), intraperitoneal (IP), o inyección intramuscular. También es posible utilizar la administración intraarticular. También se pueden utilizar otros modos de administración parenteral. Ejemplos de dichos modos incluyen: inyección intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, transtraqueal, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal y epidural y intraesternal. En algunos casos, la administración puede ser directamente a un sitio de la inflamación, por ejemplo, una articulación u otro sitio inflamado.

10 [0095] La vía y/o modo de administración del anticuerpo también puede adaptarse para el caso individual, por ejemplo, mediante el control del sujeto, por ejemplo, mediante imágenes tomográficas, examen neurológico, y los parámetros estándar asociados con el trastorno en particular, por ejemplo, criterios para la evaluación de la artritis reumatoide.

15 [0096] El anticuerpo se puede administrar como una dosis fija, o en una dosis de mg/kg. La dosis también se puede elegir para reducir o evitar la producción de anticuerpos contra el anticuerpo anti-TWEAK. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica o un efecto terapéutico combinatorio. Generalmente, se pueden utilizar las dosis del anticuerpo anti-TWEAK (y opcionalmente un segundo agente) con el fin de proporcionar a un sujeto el agente en cantidades biodisponibles. Por ejemplo, se pueden administrar las dosis en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, 0,5-100 mg/kg, 1 mg/kg -100 mg/kg, 0,5-20 mg/kg, 0,1-10 mg/kg, ó 1-10 mg/kg. También se pueden utilizar otras dosis.

20 [0097] La forma de dosificación unitaria o "dosis fija", tal como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido y, opcionalmente, en asociación con el otro agente. Se pueden administrar dosis únicas o múltiples. Alternativamente, o además, el anticuerpo se puede administrar mediante infusión continua.

25 [0098] Se puede administrar una dosis de anticuerpo anti-TWEAK, por ejemplo, en un intervalo periódico durante un período de tiempo (un periodo de tratamiento) suficiente para comprender al menos 2 dosis, 3 dosis, 5 dosis, 10 dosis, o más, por ejemplo, una o dos veces al día, o aproximadamente de una a cuatro veces por semana, o preferiblemente semanal, quincenal, mensualmente, por ejemplo, durante entre aproximadamente 1 a 12 semanas, preferiblemente entre 2 a 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, y aún más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5, ó 6 semanas. Los factores que pueden influir en la dosis y el tiempo requerido para tratar eficazmente un sujeto, incluyen, por ejemplo, la gravedad de la enfermedad o el trastorno, la formulación, la vía de administración, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. Los modelos animales también se pueden usar para determinar una dosis útil, por ejemplo, una dosis inicial o un régimen.

30 [0099] Si un sujeto está en riesgo de desarrollar un trastorno inflamatorio u otro trastorno descrito en el presente documento, el anticuerpo se puede administrar antes de la aparición completa del trastorno, por ejemplo, como medida preventiva. La duración de dicho tratamiento preventivo puede ser de una sola dosis del anticuerpo o el tratamiento puede continuar (por ejemplo, múltiples dosis). Por ejemplo, un sujeto con riesgo para el trastorno o que tiene una predisposición para el trastorno puede tratarse con el anticuerpo durante días, semanas, meses o incluso años, con el fin de prevenir que aparezca o irrumpa el trastorno.

35 [0100] Una composición farmacéutica puede incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente descrito en el presente documento. Dichas cantidades eficaces pueden determinarse en base al efecto del agente administrado, o el efecto combinatorio de los agentes si se utiliza más de un agente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente también puede variar de acuerdo con factores, tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en el individuo, por ejemplo, la mejora de al menos un parámetro de un trastorno o mejora de al menos un síntoma del trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

#### 60 Dispositivos y kits para terapia

65 [0101] Las composiciones farmacéuticas que incluyen el anticuerpo anti-TWEAK se pueden administrar con un dispositivo médico. El dispositivo puede diseñarse con características, tales como la portabilidad, el almacenamiento a temperatura ambiente, y la facilidad de uso para que pueda ser utilizado en situaciones de emergencia, por ejemplo, por un sujeto no entrenado o por el personal de emergencia en el campo, extraído de los centros médicos y otros equipos médicos. El dispositivo puede incluir, por ejemplo, una o más carcasas para el almacenamiento de preparaciones farmacéuticas que incluyen el anticuerpo anti-TWEAK, y puede ser configurarse para suministrar una

o más dosis unitarias del anticuerpo. El dispositivo puede configurarse además para administrar un segundo agente, por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ , ya sea como una sola composición farmacéutica que también incluye el anticuerpo anti-TWEAK o como dos composiciones farmacéuticas separadas.

5 **[0102]** Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos conocidos incluyen: US 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; US 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; US 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para el suministro de medicación a una velocidad de infusión precisa; US 10 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármaco; US 4.439.196, que describe un sistema de administración osmótica de fármaco que tiene compartimientos con múltiples cámaras; y US 4.475.196, que describe un sistema de administración osmótica de fármaco. También se conocen muchos otros dispositivos, implantes, sistemas de administración y módulos.

15 **[0103]** Se puede disponer un anticuerpo anti-TWEAK en un kit. En un caso, el kit incluye (a) un recipiente que contiene una composición que incluye el anticuerpo anti-TWEAK, y opcionalmente (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, con instrucciones, de comercialización u otro material que se refiere a los métodos descritos en el presente documento y/o el uso de los agentes para el beneficio terapéutico.

20 **[0104]** En un caso, el kit incluye también un segundo agente para tratar un trastorno inflamatorio, por ejemplo, un anticuerpos anti-TNF- $\alpha$ . Por ejemplo, el kit incluye un primer recipiente que contiene una composición que incluye el anticuerpo anti-TWEAK, y un segundo recipiente que incluye el segundo agente.

25 **[0105]** El material informativo de los kits no se limita en su forma. En un caso, el material informativo puede incluir información acerca de la producción del compuesto, el peso molecular del compuesto, concentración, fecha de caducidad, información del lote o sitio de producción, y así sucesivamente. En un caso, el material informativo se refiere a métodos de administración del anticuerpo anti-TWEAK, por ejemplo, en una dosis adecuada, forma de dosificación, o el modo de administración (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación, o modo de administración descritos en el presente documento), para tratar un sujeto que ha tenido o que está en riesgo de sufrir un trastorno inflamatorio, u otro trastorno descrito en el presente documento. La información puede disponerse en una variedad de formatos, incluir texto impreso, material legible por ordenador, grabación de vídeo o grabación de audio, o información que proporciona un enlace o dirección de material sustantivo, por ejemplo, en Internet.

35 **[0106]** Además del anticuerpo, la composición en el kit puede incluir otros ingredientes, tales como un disolvente o tampón, un estabilizante, o un conservante. El anticuerpo puede proporcionarse en cualquier forma, por ejemplo, forma líquida, seca o liofilizada, preferiblemente sustancialmente puro y/o estéril. Cuando los agentes se proporcionan en una solución líquida, la solución líquida es preferiblemente una solución acuosa. Cuando los agentes se proporcionan como una forma seca, la reconstitución generalmente es mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, agua estéril o tampón, opcionalmente se puede disponer en el kit.

40 **[0107]** El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición o composiciones que contienen los agentes. En algunos casos, el kit contiene recipientes separados, separadores o compartimientos para la composición y el material informativo. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, vial o jeringuilla, y el material informativo puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En otros casos, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un único recipiente no dividido. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringa que tiene unido a las mismas el material informativo en forma de una etiqueta. En algunos casos, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de recipientes individuales, conteniendo cada uno una o más formas de dosificación unitaria (por ejemplo, una forma de dosificación descrita en el presente documento) de los agentes. Los recipientes pueden incluir una dosis unitaria de combinación, por ejemplo, una unidad que incluye tanto el anticuerpo anti-TWEAK como el segundo agente, por ejemplo, en una proporción deseada. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringuillas, ampollas, paquetes de aluminio, envases blíster, o dispositivos médicos, por ejemplo, conteniendo cada uno una única dosis unitaria de combinación. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos, resistente al agua (por ejemplo, impermeables a los cambios de humedad o evaporación), y/o estanco a la luz.

45 **[0108]** El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para la administración de la composición, por ejemplo, una jeringa u otro dispositivo de administración adecuado. El dispositivo puede estar dispuesto precargado con uno o ambos de los agentes o puede estar vacío, pero adecuado para la carga.

#### 60 Reconocimiento de células que expresan TWEAK

65 **[0109]** Los anticuerpos anti-TWEAK descritos en el presente documento se pueden usar para dirigir una carga a una célula que expresa TWEAK o a un tejido u otra estructura asociada con TWEAK. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden unir a un virus o partícula de tipo virus que puede liberar un gen exógeno (por ejemplo, para terapia génica) o a un liposoma, por ejemplo, un liposoma que encapsula un agente terapéutico o un gen exógeno. Un método de

ejemplo para usar un anticuerpo para reconocer un virus se describe en Roux et al. (1989) Proc Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86: 9079 a 9083. Véase también, por ejemplo, Curr Gene Ther. (2005) 5: 63-70 y Hum Gene Ther. (2004) 15: 1034-1044.

5 **[0110]** Los Abs anti-TWEAK de la presente invención también pueden unirse a liposomas que contienen un agente terapéutico, tal como agentes quimioterapéuticos. La unión de anticuerpos a liposomas puede realizarse mediante cualquier agente de reticulación conocido, tal como agentes reticulantes heterobifuncionales que han sido ampliamente utilizados para acoplar toxinas o agentes quimioterapéuticos a anticuerpos para la liberación dirigida. Por ejemplo, la conjugación a liposomas se puede realizar usando el reactivo de reticulación dirigido a carbohidratos hidrazida del ácido 4-(4-maleimidofenil)butírico (MPBH) (Duzgunes et al. (1992) J. Cell. Biochem. Abst. Supl. 16E 77). Los liposomas que contienen anticuerpos también se pueden preparar mediante métodos bien conocidos (véase, por ejemplo, DE 3.218.121; Epstein et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-92; Hwang et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-34; US 4.485.045 y 4.544.545).

#### 15 Usos de diagnóstico

**[0111]** Los anticuerpos anti-TWEAK se pueden utilizar en un método de diagnóstico para detectar la presencia de TWEAK, in vitro (por ejemplo, una muestra biológica, tal como tejido, biopsia) o in vivo (por ejemplo, formación de imágenes in vivo en un sujeto). Por ejemplo, los anticuerpos anti-TWEAK humanos o efectivamente humanos se pueden administrar a un sujeto para detectar TWEAK dentro del sujeto. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse, por ejemplo, con un marcador detectable por MRI o un radiomarcador. El sujeto puede evaluarse utilizando un medio para detectar el marcador detectable. Por ejemplo, el sujeto puede escanearse para evaluar la localización del anticuerpo en el sujeto. Por ejemplo, el sujeto es escaneado, por ejemplo, mediante RMN u otros medios tomográficos.

25 **[0112]** Los ejemplos de marcadores útiles para el diagnóstico por imagen incluyen marcadores radiactivos, tales como  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ , y  $^{188}\text{Rh}$ , marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, marcadores activos de resonancia magnética nuclear, isótopos emisores de positrones detectables mediante un escáner de tomografía por emisión de positrones ("PET"), quimioluminiscentes, tales como luciferina, y marcadores enzimáticos, tales como peroxidasa o fosfatasa. También se pueden emplear emisores de radiación de corto alcance, tales como isótopos detectables por sondas detectoras de corto alcance. El ligando de proteína puede marcarse con dichos reactivos usando técnicas conocidas. Por ejemplo, véase Wensel y Meares (1983) Radioimmunoimaging and radioimmunotherapy, Elsevier, Nueva York, para las técnicas relacionadas con el radiomarcado de anticuerpos y Colcher et al. (1986) Meth. Enzymol. 121: 802-816.

35 **[0113]** El sujeto puede ser "captarse en imágenes" in vivo usando técnicas conocidas, tales como el escaneo radionuclear usando, por ejemplo, una cámara o tomografía de emisión gamma. Véase, por ejemplo, AR Bradwell et al., «Developments in Antibody Imaging», Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, RW Baldwin et al., (Eds.), pág. 65-85 (Academic Press, 1985). Alternativamente, se puede utilizar un escáner de tomografía transaxial de emisión de positrones, tal como el designado Pet VI situado en el Laboratorio Nacional Brookhaven, cuando el marcador radiactivo emite positrones (por ejemplo,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$ , y  $^{13}\text{N}$ ).

40 **[0114]** Agentes de contraste MRI. La obtención de imágenes por Resonancia Magnética (MRI) utiliza RMN para visualizar las características internas de un ser vivo, y es útil para el pronóstico, diagnóstico, tratamiento y cirugía. MRI puede utilizarse sin compuestos trazadores radiactivos para beneficio obvio. Algunas técnicas MRI se resumen en EP 0502814A. En general, se utilizan las diferencias relacionadas con constantes de tiempo de relajación T1 y T2 de los protones del agua en diferentes medios para generar una imagen. Sin embargo, estas diferencias pueden ser insuficientes para proporcionar imágenes nítidas y de alta resolución.

50 **[0115]** Las diferencias en estas constantes de tiempo de relajación se pueden mejorar mediante agentes de contraste. Ejemplos de dichos agentes de contraste incluyen un conjunto de agentes magnéticos, agentes paramagnéticos (que alteran principalmente T1) y agentes ferromagnéticos o superparamagnéticos (que alteran principalmente la respuesta T2). Los quelatos (por ejemplo, quelatos EDTA, DTPA y NTA) pueden utilizarse para unir (y reducir la toxicidad) de algunas sustancias paramagnéticas (por ejemplo,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ). Otros agentes pueden estar en forma de partículas, por ejemplo, de diámetros de menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10 nm). Las partículas pueden tener propiedades ferromagnéticas, anti-ferromagnéticas o superparamagnéticas. Las partículas pueden incluir, por ejemplo, magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ),  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , ferritas, y otros compuestos minerales magnéticos de elementos de transición. Las partículas magnéticas pueden incluir uno o más cristales magnéticos con y sin material no magnético. El material no magnético puede incluir polímeros sintéticos o naturales (tales como sefaroza, dextrano, dextrina, almidón y similares).

65 **[0116]** Los anticuerpos anti-TWEAK también se pueden marcar con un grupo indicador que contiene el átomo  $^{19}\text{F}$  activo en RMN, o una pluralidad de dichos átomos en la medida en que (i) sustancialmente todos los átomos de flúor naturalmente abundantes son del isótopo  $^{19}\text{F}$  y, por lo tanto, sustancialmente todos los compuestos que contienen flúor son activos en RMN; (ii) muchos compuestos polifluorados químicamente activos, tales como anhídrido trifluoroacético, están disponibles comercialmente a un coste relativamente bajo, y (iii) se han encontrado muchos

compuestos fluorados médicamente aceptables para su uso en seres humanos, tales como los poliéteres perfluorados utilizados para transportar oxígeno como sustitutos de hemoglobina. Después de permitir dicho tiempo para la incubación, se lleva a cabo un MRI de cuerpo completo usando un aparato tal como uno de los descritos por Pykett (1982) Scientific American, 246: 78-88 para localizar y obtener imágenes de la distribución de TWEAK.

[0117] En otro caso, la descripción proporciona un método para detectar la presencia de TWEAK en una muestra in vitro (por ejemplo, una muestra biológica, tal como suero, plasma, tejido, biopsia). El método de la invención puede usarse para diagnosticar un trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado con células inmunes. El método incluye: (i) poner en contacto la muestra o una muestra de control con el anticuerpo anti-TWEAK; y (ii) evaluar la muestra por la presencia de TWEAK, por ejemplo, mediante la detección de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-TWEAK y TWEAK, o mediante la detección de la presencia del anticuerpo o TWEAK. Por ejemplo, el anticuerpo se puede inmovilizar, por ejemplo, sobre un soporte, y se detecta la retención del antígeno sobre el soporte, y/o viceversa. Puede incluirse una muestra de control. Un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en la muestra con respecto a la muestra de control puede ser indicativo de la presencia de TWEAK en la muestra. Generalmente, puede utilizarse un anticuerpo anti-TWEAK en aplicaciones que incluyen la polarización de fluorescencia, microscopía, ELISA, centrifugación, cromatografía, y clasificación de células (por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia).

#### Ejemplo 1

[0118] La secuencia del dominio variable de cadena pesada de P2D10 murino, con las CDRs subrayadas, es:

1 EVQLVESGGG LVRPGGSLKL FCAASGFTFS RYAMSWVRQS PEKRLEWVAE

51 ISSGGSYPYY PDTVTVGRFTI SRDNAKNTLY LEMSSLKSED TAMYYCARVL

101 YYDYDGDRIE VMDYWGQGTA VIVSS (SEQ ID NO:50)

[0119] Este es un dominio variable de cadena pesada del subgrupo 3D murino.

[0120] La secuencia del dominio variable de cadena ligera de P2D10 murino, con las CDRs subrayadas, es:

1 DVVMTQSPLS LSVSLGDQAS ISCRSSQSLV SSKGNTYLHW YLQKPGQSPK

51 FLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVAAEDLGV YFCSQSTHFP

101 RTFGGGTTLE IK (SEQ ID NO:51)

[0121] Esta es la cadena ligera kappa del subgrupo 2 murino.

[0122] Los siguientes armazones aceptores humanos fueron escogidos para el dominio variable de cadena pesada del subgrupo 3 de huP2D10:Human 56-84m (número de acceso de base de datos NCBI GL:33318898, Scamurra et al, la presentación directa.). La secuencia con CDR subrayadas es la siguiente:

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMSWVRQA PGKGLEWVAN

51 IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP

101 MTTVVKPSLA TNDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO:52)

[0123] La secuencia del dominio variable de cadena ligera del subgrupo 2 de K107 humana (número de acceso de base de datos NCBI GI: 21669075, Akahori et al, la presentación directa), con las CDRs subrayadas es:

1 DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ

51 LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQALQTP





[0133] Las CDRs están subrayadas. La cadena ligera de huP2D10 L2 es un injerto de CDR lineal (sin retromutaciones en el almacén).

5 [0134] Esta es una secuencia de aminoácidos de ejemplo de la cadena pesada de IgG1 de huPD210 H1 maduro.

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYAMSWVRQA PGKGLEWVAE  
 10 51 ISSGGSPYYPY PDTVTGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVL  
 101 YYDYDGDRIE VMDYWGQGTL VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL  
 15 151 GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS  
 201 LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL  
 20 251 FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR  
 301 EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ  
 25 351 PREPQVYTLF PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK  
 401 TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS  
 30 451 LSPG (SEQ ID NO:64)

35 [0135] A continuación, se muestra la numeración de Kabat para el segmento V<sub>H</sub> del dominio variable de cadena pesada (SED ID NO: 65):

Kabat No.	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
hP2D10	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYAMSWVRQA	PGKGLEWVAE
40 Kabat No.	12a3456789	0123456789	0123456789	012abc3456	78901234
hP2D10	ISSGGSPYYPY	PDTVTGRFTI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAR

45 [0136] Esta es una secuencia de aminoácidos de ejemplo de la cadena ligera de huP2D10 L1 maduro:

1 DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV SSKGNTYLHW YLQKPGQSPQ  
 50 51 FLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YFCSQSTHFP  
 101 RTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
 55 151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE  
 201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SEQ ID NO:66)

60 [0137] A continuación, se muestra la numeración de Kabat para el segmento V<sub>L</sub> (SED ID NO: 67):

65

Kabat No. 1234567890 1234567890 1234567abc de89012345 6789012345  
 hP2D10 DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV SSKGNTYLHW YLQKPGQSPQ

5 Kabat No. 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345  
 hP2D10 FLIYKVSNRFL SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YFCSQSTHFP

[0138] Esta es una secuencia de aminoácidos de ejemplo de la cadena ligera de huP2D10 L2 maduro:

10

1 DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV SSKGNTYLHW YLQKPGQSPQ

15

51 LLIYKVSNRFL SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHFP

101 RTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPRKAK

20

151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLKAD YEKHKVYACE

201 VTHQGLSSPV TKSFNREGC (SEQ ID NO:68)

25

[0139] A continuación, se muestra la numeración de Kabat para el segmento VL (SED ID NO: 69):

Kabat No. 1234567890 1234567890 1234567abc de89012345 6789012345  
 hP2D10 DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV SSKGNTYLHW YLQKPGQSPQ

30

Kabat No. 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345  
 hP2D10 LLIYKVSNRFL SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YFCSQSTHFP

35

Ejemplo 2

[0140] El anticuerpo monoclonal de bloqueo a TWEAK, mP2D10, redujo significativamente la gravedad clínica en modelos de esclerosis múltiple, apoplejía y artritis reumática. Se modeló la farmacocinética (PK) del anticuerpo monoclonal anti-TWEAK, mP2D10, siguiendo administración intravenosa (IV).

[0141] Se administró mP2D10 a ratones a 1, 10 ó 100 mg/kg mediante inyección IV. Las concentraciones séricas de mP2D10 se determinaron usando ELISA. El perfil PK de concentración-tiempo se analizó usando un modelo de dos compartimentos con eliminación de primer orden o eliminación de Michaelis-Menten del compartimento central con un volumen de V1. Las constantes de velocidad entre los dos compartimentos fueron K12 (saliendo del compartimento de 1 al 2) y K21 (saliendo del compartimento de 2 al 1). Para el modelo de eliminación de primer orden, la constante de velocidad de eliminación fue de K10. Para el modelo de eliminación de Michaelis-Menten, el fármaco se depuró a la velocidad de  $V_m \cdot C_1 / (K_m + C_1)$ , en la que, C1 era mP2D10 en la concentración en el compartimento central, Vm y Km eran constantes. Los datos se ajustaron con software ADAPT II (D'Argenio, DZ y A. Schumitzky. ADAPTII User's Guide: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software. Biomedical Simulations Resource, Los Angeles, 1997) utilizando el procedimiento de estimación de probabilidad máxima.

[0142] Para el modelo de eliminación lineal de dos compartimentos, V1 fue de 23,2 ml/kg, K10 fue de 0,0096 h<sup>-1</sup>, la K12 fue de 2,501 y K21 fue de 1,053. El valor del área bajo la curva (AIC) fue de 298 y el valor Schwarz fue de 304,2. Para el modelo de eliminación no lineal de dos compartimentos, el V1 fue de 0,0235. El Vm fue de 9,22 mg/kg/h, la Km fue de 484,2 µg/ml. La K12 fue de 2,348 h<sup>-1</sup>, y la K21 fue de 0,966 h<sup>-1</sup>. El valor AIC fue de 269 y el valor Schwarz fue de 276. La PK de mP2D10 fue mejor predicha por un modelo no lineal que un modelo lineal.

[0143] Los perfiles de concentración-tiempo de mP2D10 se predijeron mejor por un modelo de dos compartimentos con eliminación Michaelis-Menten que con la eliminación de primer orden.

[0144] Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas descritas en el presente documento.

65

## REIVINDICACIONES

1. Proteína aislada que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una secuencia de dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que pueden formar un sitio de unión a antígeno que se une a TWEAK humano (inductor débil de la apoptosis de tipo TNF), en la que:
- 5 (a) la secuencia del dominio variable de cadena pesada de la proteína comprende las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):  
 CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos: GFTFSRYAMS (SEQ ID NO: 1);  
 CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos: EISSGGSYPPDVTG (SEQ ID NO: 2); y  
 10 CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos: VLYDYDGDRIEVM DY (SEQ ID NO: 3); y  
 (b) la secuencia de dominio variable de cadena ligera de la proteína comprende las siguientes CDR:  
 CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos: RSSQSLVSSKGNTYLH (SEQ ID NO: 8);  
 CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos: KVSNRFS (SEQ ID NO: 9); y  
 15 CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos: SQSTHFPRT (SEQ ID NO: 10).
2. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la proteína es una IgG recombinante de longitud completa.
3. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la proteína comprende una región Fc humana.
- 20 4. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la proteína comprende una región Fc humana con una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de la región Fc.
5. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la proteína es un Fab o scFv.
- 25 6. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la proteína comprende regiones armazón que son al menos un 90% idénticas con las regiones armazón de la línea germinal humana.
7. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la secuencia del dominio variable de cadena ligera de la proteína comprende regiones armazón que son al menos un 95% idénticas con una secuencia de la línea germinal del subgrupo V $\kappa$ 1.
- 30 8. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la secuencia del dominio variable de cadena ligera de la proteína comprende regiones armazón que son al menos un 95% idénticas con la secuencia DPK9.
- 35 9. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la secuencia del dominio variable de cadena ligera de la proteína comprende regiones armazón que son al menos un 95% idénticas con una secuencia seleccionada entre las secuencias establecidas en SEQ ID NOS: 17, 19, 22, 23, 25, 26, 51, 61 y 63.
- 40 10. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la secuencia del dominio variable de cadena ligera de la proteína comprende regiones armazón que son idénticas con una secuencia seleccionada entre las secuencias establecidas en SEQ ID NOS: 17, 19, 22, 23, 25, 26, 51, 61 y 63.
- 45 11. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la secuencia del dominio variable de cadena pesada de la proteína comprende regiones armazón que son al menos un 95% idénticas con una secuencia de la línea germinal del subgrupo VH I.
12. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la secuencia del dominio variable de cadena pesada de la proteína comprende regiones armazón que son al menos un 95% idénticas con la secuencia de la línea germinal DP-54.
- 50 13. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la secuencia del dominio variable de cadena pesada de la proteína comprende regiones armazón que son al menos un 95% idénticas con una secuencia seleccionada entre las secuencias establecidas en SEQ ID NOS: 27-43, 46-50 y 59.
- 55 14. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la secuencia del dominio variable de cadena pesada de la proteína comprende regiones armazón que son idénticas con una secuencia seleccionada entre las secuencias establecidas en SEQ ID Nos 27-43, 46-50 y 59.
- 60 15. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la secuencia de cadena pesada de la proteína comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 64 y la secuencia de cadena ligera de la proteína comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 68.
16. Proteína, según la reivindicación 15, en la que secuencia de cadena ligera de la proteína comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 68.
- 65 17. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la proteína está funcionalmente unida a una o más de otras entidades moleculares.

18. Proteína, según la reivindicación 17, en la que dicha una o más entidades moleculares son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
- 5 19. Composición farmacéutica que comprende una proteína, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un portador farmacéuticamente aceptable.
20. Método de disposición de la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que dicho método comprende:
- 10 (i) proporcionar una célula huésped que contiene secuencias de ácido nucleico recombinante para expresar la proteína; y  
(ii) mantener la célula en condiciones en las que se expresa la proteína.
21. Método, según la reivindicación 20, que comprende además aislar la proteína y formular la proteína con un portador farmacéuticamente aceptable
- 15 22. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, o composición farmacéutica, según la reivindicación 19, para utilizar en el tratamiento de un trastorno autoinmune.
- 20 23. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, o composición farmacéutica, según la reivindicación 19, para utilizar en el tratamiento de la artritis reumatoide.
24. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, o composición farmacéutica, según la reivindicación 19, para utilizar en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- 25 25. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, o composición farmacéutica, según la reivindicación 19, para utilizar en el tratamiento de la apoplejía.