

A61K 39/395 (2011.01) **A61K 39/17** (2011.01)
A61P 11/00 (2011.01) **A61P 17/02** (2011.01)
A61P 43/00 (2011.01) **A61P 1/16** (2011.01)
A61K 31/7088 (2011.01) **A61K 38/20**
(2011.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2006.02.01**

(30) Prioridade(s): **2005.02.01 US 649287 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.10.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.03.30**
122/2011

(73) Titular(es):

AMGEN INC.
ONE AMGEN CENTER DRIVE THOUSAND
OAKS, CA 91320-1799 **US**

(72) Inventor(es):

MICHAEL R. COMEAU **US**
DAVID R. FITZPATRICK **US**

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DISTÚRBIOS FIBRÓTICOS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA REDUZIR OU PREVENIR A FIBROSE NUM INDIVÍDUO QUE SOFRE DE UM DISTÚRBO FIBRÓTICO PELA ADMINISTRAÇÃO DE UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DE, PELO MENOS, UM ANTAGONISTA PARA A CITOCINA LINFOPOIETINA ESTROMAL TÍMICA AO INDIVÍDUO. NUMA FORMA DE REALIZAÇÃO, OS MÉTODOS E COMPOSIÇÕES COMPREENDEM AINDA A ADMINISTRAÇÃO DE, PELO MENOS, UM ANTAGONISTA ADICIONAL A UMA CITOCINA PRÓ-FIBROTICA, FACTOR DE CRESCIMENTO OU QUIMIOCINA ADICIONAL.

RESUMO**"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DISTÚRBIOS FIBRÓTICOS"**

A invenção proporciona métodos e composições para reduzir ou prevenir a fibrose num indivíduo que sofre de um distúrbio fibrótico pela administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de, pelo menos, um antagonista para a citocina linfopoietina estromal tímica ao indivíduo. Numa forma de realização, os métodos e composições compreendem ainda a administração de, pelo menos, um antagonista adicional a uma citocina pró-fibrotica, factor de crescimento ou quimiocina adicional.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DISTÚRBIOS FIBRÓTICOS"

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a composições e métodos para tratar distúrbios fibróticos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O processo de reparação de tecidos como uma parte da cura de ferimentos envolve duas fases. A primeira fase é a fase regenerativa, em que as células lesionadas são substituídas por células do mesmo tipo. A segunda fase é a formação de tecidos fibrosos, também chamada fibroplasia ou fibrose, em que o tecido conjuntivo substitui os tecidos do parênquima normais. O processo de reparação de tecidos pode tornar-se patogénico se a fase de fibrose continua descontrolada, levando a remodelação de tecido extensivo e a formação de tecido de cicatriz permanente (Wynn, Nature Rev. Immunol. 4, 583 (2004)).

Estimou-se que até 45% das mortes nos Estados Unidos podem ser atribuídas a doenças fibroproliferativas, que podem afectar muitos tecidos e sistemas de órgãos. (Wynn, *supra*, a 595 (2004)). As principais doenças fibróticas orgânicas incluem a doença pulmonar intersticial (ILD), caracterizada por inflamação pulmonar e fibrose. A ILD é conhecida por ter um número de causas tais como sarcoidose, silicose, doenças vasculares por colagénio, e escleroderma sistémica. No entanto, a fibrose pulmonar idiopática, um tipo comum de ILD, não tem causa conhecida. Outros distúrbios fibróticos em órgãos incluem a cirrose hepática, fibrose hepática que resulta de hepatite crónica B ou C infecção, doença renal, doença cardíaca, e doenças oftalmológicas que incluem a degeneração macular e retinal e retinopatia vítrea. Os distúrbios fibroproliferativos também incluem escleroderma sistémica e local, quelóides e

cicatrizes hipertróficas, aterosclerose, e restenose. As doenças fibroproliferativas adicionais incluem cicatrização excessiva que resultam de cirurgia, fibrose induzida por fármaco quimioterápico, fibrose induzida por radiação, e lesões e queimaduras (Wynn, *supra*, página 585).

Actualmente, estão disponíveis tratamentos para distúrbios fibróticos que incluem fármacos imunossuppressores gerais tais como corticosteróides, e outros tratamentos anti-inflamatórios. No entanto, os mecanismos envolvidos na regulação da fibrose parecem ser distintos daqueles de inflamação, e terapêuticas anti-inflamatórias nem sempre são eficazes na redução ou na prevenção de fibrose (Wynn, *supra*, página 591). O documento WO98/36061 refere-se a redução de fibrose e/ou formação de cicatrizes pela inibição de actividade mediada por receptor de IL-6. Portanto, permanece uma necessidade de desenvolver tratamentos para reduzir e prevenir a fibrose e controlar distúrbios fibróticos.

A presente invenção dirige-se a esta necessidade e proporciona métodos e composições para prevenir ou reduzir fibrose associada a distúrbios fibróticos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona métodos para modular a acumulação de fibroblastos e deposição de colagénio num tecido pela modulação da quantidade ou actividade da citocina linfopoietina estromal tímica (TSLP) no tecido. Num aspecto, a presente invenção proporciona um antagonista de TSLP para utilização na redução ou na prevenção de fibrose num indivíduo que sofre de um distúrbio fibrótico em que o antagonista se liga a linfopoietina estromal tímica ou a receptor de linfopoietina estromal tímica e é seleccionado do grupo que consiste num anticorpo, um péptido ou polipéptido. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona a utilização de pelo menos um antagonista de TSLP na preparação de um medicamento para a

prevenção ou o tratamento de um distúrbio fibrótico num indivíduo que sofre de tal distúrbio. A invenção ainda proporciona uma composição farmacêutica para prevenir ou reduzir a fibrose num indivíduo que sofre de um distúrbio fibrótico que compreende uma dosagem terapeuticamente eficaz de pelo menos um antagonista a TSLP em mistura com um portador farmacêuticamente aceitável. Os distúrbios fibróticos incluem, mas não são limitados a, escleroderma, doença pulmonar intersticial (ILD), fibrose pulmonar idiopática (IPF), fibrose hepática que resulta de infecção por hepatite crónica B ou C, fibrose induzida por radiação, e fibrose que surge a partir da cura de ferimento.

Numa forma de realização, o antagonista de TSLP é um agente de ligação a ligando de TSLP capaz de se ligar a TSLP e reduzir ou bloquear a sua actividade. Estes antagonistas incluem, mas não são limitados a, anticorpos antagonísticos, agentes de ligação a péptido ou polipéptido, receptores de TSLP solúveis (TSLPR), antagonistas de receptores heterodiméricos (heterodímero) receptor de interleucina 7 alfa solúvel (IL-7 R α)/TSLPR. O anticorpos antagonísticos incluem, mas não são limitados a, completamente humanos, humanizados, quiméricos, anticorpos de cadeia única, e fragmentos de anticorpo. Os agentes de ligação a péptido ou polipéptido, receptor solúvel e antagonistas de receptor heterodímero solúvel podem compreender ainda domínios Fc ou outros componentes multimerizantes, ou moléculas portadoras tais como PEG.

Em outra forma de realização, o antagonista de TSLP é um antagonista de TSLPR. Os antagonistas de TSLPR incluem antagonistas que se ligam ao receptor de TSLP, e antagonistas que se ligam ao heterodímero IL-7R α /TSLPR. Estes antagonistas incluem, mas não são limitados a, anticorpos antagonísticos que se ligam ao TSLPR; anticorpos antagonísticos que se ligam ao heterodímero, ligandos solúveis que se ligam ao TSLPR; ligandos solúveis que se

ligam ao heterodímero. Os anticorpos antagonísticos incluem, mas não são limitados a, anticorpos humanos, humanizados, quiméricos, e anticorpos de cadeia única, e fragmentos de anticorpo. O ligando solúvel pode compreender ainda domínios Fc ou outros componentes multimerizantes, ou moléculas portadoras tais como PEG.

Em outra forma de realização, os métodos e composições da presente invenção compreendem ainda pelo menos um antagonista adicional a uma ou mais citocina, factor de crescimento, ou quimiocina que promove fibrose. Estes factores pró-fibróticos incluem, mas não são limitados a, factor de transformação do crescimento β (TGF- β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-9 (IL-9), interleucina-13 (IL-13), factor estimulante de colónia de macrófagos/granulócitos (GM-CSF), factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), interleucina-6 (IL-6), oncostatina M (OSM), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), proteína quimiotática de monócito 1 (CCL2/MCP-1), e quimiocina regulada por activação e pulmonar (CCL18/PARC).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As Figuras 1A e 1B, e as Figuras 2A, 2B, e 2C mostram os resultados de injectar cinco grupos de ratinhos Balb/c intradermicamente com dosagens variáveis de TSLP e um controlo negativo MSA (albumina de soro de ratinho) uma vez por semana durante 1 semana (Figura 1A, Grupo 1), uma vez por semana durante 2 semanas (Figura 1B, Grupo 2); e três vezes por semana durante duas semanas na Figura 2A (Grupo 3), 2B (Grupo 4) e 2C (Grupo 5). A Figura 1A (Grupo 1) mostra fibrose não subcuticular induzida a partir de uma injeção única de 10 ug de TSLP durante uma semana; MSA só; e PBS só. A Figura 1B (Grupo 2) mostra fibrose não subcuticular induzida a partir de uma injeção única em cada uma de duas semanas (2 injeções totais) de 10 ug de

TSLP; MSA só, e PBS só. A Figura 2A (Grupo 3) mostra fibrose subcuticular pontuada no nível 3 para 10 ug de TSLP quando foi injectado três vezes por semana durante 2 semanas, mas sem fibrose para MSA só, e PBS só. A Figura 2B (Grupo 4) mostra fibrose pontuada no nível 2 para 1 ug de TSLP quando foi injectado três vezes por semana durante 2 semanas, mas sem fibrose for MSA só, e nenhum para PBS só com a excepção de um animal que mostrou fibrose no nível 1 para PBS só. A Figura 2C (Grupo 5) mostra fibrose pontuada no nível 1 para 1 ug de TSLP quando foi injectado três vezes por semana durante 2 semanas, mas sem fibrose para MSA só ou PBS só.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um antagonista de TSLP para utilização na modulação de acumulação de fibroblastos e deposição de colagénio num tecido pela modulação da quantidade ou actividade da citocina linfopoietina estromal tímica (TSLP) no tecido. Observou-se que a TSLP induz a acumulação de fibroblastos e deposição de colagénio característica de distúrbios fibróticos em animais. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um antagonista para TSLP para utilização na redução ou na prevenção de fibrose num indivíduo que sofre de um distúrbio fibrótico. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona a utilização de, pelo menos, um antagonista de TSLP na preparação de um medicamento para a prevenção ou o tratamento de um distúrbio fibrótico num indivíduo que sofre de tal distúrbio. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica para prevenir ou reduzir a fibrose num indivíduo, que compreende uma dosagem terapeuticamente eficaz de, pelo menos, um antagonista para TSLP em mistura com um portador farmacêuticamente aceitável.

Como é utilizado no presente documento, o termo "doença fibroproliferativa" ou "doença ou distúrbio

fibrótico" refere-se a condições que envolvem a fibrose num ou mais tecidos. Como é utilizado no presente documento, o termo "fibrose" refere-se à formação de tecido fibroso como um processo reparativo ou reactivo, ao invés de como um normal constituinte de um órgão ou tecido. A fibrose é caracterizada por acumulação de fibroblastos e deposição de colagénio em excesso de deposição normal em qualquer tecido particular. Como é utilizado no presente documento, o termo "fibrose" é utilizado como um sinónimo de "acumulação de fibroblastos e deposição de colagénio". Fibroblastos são células de tecido conjuntivo, que estão dispersas em tecido conjuntivo por todo o corpo. Os fibroblastos segregam uma matriz extracelular não rígida que contém colagénio do tipo I e/ou tipo III. Em resposta a uma lesão a um tecido, fibroblastos adjacentes migram para o ferimento, proliferam e produzem grandes quantidades de matriz extracelular colagenosa. O colagénio é uma proteína fibrosa rica em glicina e prolina que é um componente principal da matriz extracelular e tecido conjuntivo, cartilagem e osso. As moléculas de colagénio são estruturas helicóides de cadeia tripla chamadas cadeias α , que são enroladas entre si numa hélice semelhante a uma corda. O colagénio existe em diversas formas ou tipos; destes, tipo I, o mais comum, é encontrado em pele, tendão, e osso; e o tipo III é encontrado em pele, vasos sanguíneos e órgãos internos.

Os distúrbios fibróticos incluem, mas não são limitados a, escleroderma sistémica e local, quelóides e cicatrizes hipertróficas, aterosclerose, restenose, inflamação pulmonar e fibrose, fibrose pulmonar idiopática, cirrose hepática, fibrose como um resultado de infecção de hepatite crónica B ou C, doença renal, doença cardíaca resultando de tecido de cicatriz e doenças oftalmológicas, tais como degeneração macular e retinal e retinopatia vítrea. As doenças fibróticas adicionais incluem fibrose

resultante de fármacos quimioterápicos, fibrose induzida por radiação e lesões e queimaduras.

A escleroderma é um distúrbio fibrótico caracterizado por um espessamento e uma induração da pele causada pela superprodução de novo colagénio por fibroblastos em pele e outros órgãos. A escleroderma pode ocorrer como uma doença local ou sistémica. A escleroderma sistémica pode afectar vários órgãos. A esclerose sistémica é caracterizada pela formação de tecido fibroso colagenoso hialinizado e espessado, com espessamento da pele e adesão a tecidos subjacentes, especialmente das mãos e da face. A doença pode também ser caracterizada por disfagia devido a perda de peristaltismo e fibrose submucósica do esófago, dispneia devido a fibrose pulmonar, fibrose do miocárdio, e mudanças vasculares renais. (Stedman's Medical Dictionary, 26^a Edição, Williams & Wilkins, 1995)). A fibrose pulmonar afecta de 30 a 70% de pacientes com escleroderma, com frequência resultando em doença pulmonar restritiva (Atamas *et al.* Cytokine and Growth Factor Rev 14: 537-550 (2003)).

A fibrose pulmonar idiopática é um distúrbio pulmonar crónico, progressivo e usualmente letal, que se pensa ser uma consequência de um processo inflamatório crónico (Kelly *et al.*, Curr Pharma Design 9: 39-49 (2003)). As causas desta doença não são ainda conhecidas.

Como é utilizado no presente documento, o termo "indivíduo" refere-se a animais que incluem os mamíferos que incluem os seres humanos. O termo "mamífero" inclui primatas, animais domesticados que incluem cães, gatos, ovelha, gado, cabras, porcos, ratinhos, ratos, coelhos, cobaia, animais em cativeiro, tais como animais de jardim zoológico, e animais selvagens. Como é utilizado no presente documento, o termo "tecido" refere-se a um órgão ou conjunto de células especializadas, tais como pele tecido, tecido pulmonar, tecido renal e outros tipos de células.

TSLP

Linfopoietina estromal tímica (TSLP) refere-se a um feixe de quatro α -hélices de citocina de tipo I que é um membro da família IL-2, mas mais proximamente relacionada a IL-7. As citocinas são proteínas reguladoras de baixo peso molecular segregadas em resposta a certos estímulos, que agem sobre receptores na membrana de células alvo. As citocinas regulam uma variedade de respostas celulares. As citocinas são geralmente descritas em referências, tais como Cytokines, A. Mire-Sluis e R. Thorne, ed., Academic Press, Nova Iorque, (1998).

A TSLP foi originalmente clonada de uma linha celular de estroma tímico (Sims et al J. Exp. Med 192 (5), 671-680 (2000)) e observou-se que suporta o desenvolvimento de células B e T precoces. A TSLP humana foi posteriormente clonada e observou-se que tem um 43 por cento de identidade em sequência de aminoácidos em relação ao homólogo murino (Quentmeier et al. Leukemia 15, 1286-1292 (2001), e a Patente U.S. No: 6.555.520). A sequência de polinucleótido e de aminoácidos de TSLP humana são apresentadas nas SEQ ID NO: 1 e 2 respectivamente. Observou-se que a TSLP se liga com baixa afinidade a uma cadeia de receptor da família de receptor da hematopoietina chamado receptor de TSLP (TSLPR), que é descrito no Pedido de Patente U.S. No: 09/895,945 (publicação No: 2002/0068323) (SEQ ID NO: 4 e 5). A sequência de polinucleótidos que codifica TSLPR humano é apresentada como SEQ ID NO: 3 do presente pedido, e a sequência de aminoácidos é apresentada como SEQ ID NO: 4 do presente pedido, respectivamente. O domínio solúvel do TSLPR é aproximadamente de 25 a 231 aminoácidos de SEQ ID NO: 4. A TSLP liga-se com alta afinidade a um complexo heterodimérico de TSLPR e o receptor alfa de interleucina 7 IL-7R α (Park et al., J. Exp. Med 192:5 (2000), Pedido de Patente U.S. No. 09/895,945, publicação número U.S. 2002/0068323). A sequência de receptor α de IL-7 é mostrada

na Figura 2 da Patente U.S. Nº 5.264.416. A sequência do domínio solúvel do receptor α de IL-7 é aminoácido 1 a 219 da Figura 2 na Patente U.S. No: 5.264.416.

A TSLP humana pode também ser expressa em forma modificada, em que um local de clivagem de furina foi removido através de modificação da sequência de aminoácidos, como descrito na publicação de pedido de patente PCT documento WO 03/032898. A TSLP modificada retém actividade, mas a sequência de comprimento completo é mais facilmente expressa em células microbianas ou de mamíferos.

A TSLP é produzida em células epiteliais humanas que incluem a pele, células epiteliais brônquicas, traqueais, e das vias aéreas, queratinócitos, células do estroma e mastócitos, células musculares lisas, e fibroblastos do pulmão e dérmicos, como foram determinadas por meio de análise de ARNm quantitativa (Soumelis *et al*, Nature Immunol. 3 (7) 673-680 (2002)). Tanto a murina como a TSLP humana estão envolvidas na promoção da inflamação alérgica. Soumelis *et al*, *supra* reportaram que o complexo de receptor heterodímero de TSLP é expresso em células dendríticas (células DC) CD11c+ humanas. As experiências de cultura de células dendríticas mostraram que a ligação de TSLP a células DC induz a produção de quimiocinas que atraem T_H2 célula TARC (quimiocina regulada por activação e timo; também conhecida como CCL17) e MDC (quimiocina derivada de macrófago, também conhecida como CCL22), e regula positivamente moléculas co-estimulatórias HLA-DR, CD40, CD80, CD86, e CD83 na superfície de células. As DCs activadas por TSLP em cultura de células induziram a diferenciação de células T $CD8^+$ e $CD4^+$ naive (Soumelis, *supra*) em células efectoras pró-alérgicas (Gilliet *et al*, J. Exp. Med. 197(8), 1059-1063 (2003)) que produzem citocinas pró-alérgicas IL-4, IL-5, IL-13 e TNF- α ao mesmo tempo em que regula negativamente a IL-10 e o interferão- γ (Soumelis *et al.*, *supra*, Gilliet *et al.*, *supra*). Reportou-

se que a TSLP é expressa em amostras de tecido de células epiteliais tonsilares inflamadas, e queratinócitos dentro das lesões de pacientes com dermatite atópica. (Soumelis *et al.*, *supra*).

Ensaaios de TSLP

As actividades de TSLP podem ser medidas num ensaio utilizando células BAF que expressam TSLPR humano (BAF/HTR), que requerem TSLP activa para a proliferação como foi descrito na publicação de pedido de patente PCT WO 03/032898. O bioensaio de BAF/HTR utiliza uma linha de células de linfócitos pró B murinos, que foi transfectada com o receptor humano de TSLP (linha de células obtida a partir de Steven F. Ziegler, Virginia Mason Research Center, Seattle, WA.). As células BAF/HTR são dependentes de huTSLP para o crescimento, e proliferam em resposta a huTSLP activo adicionado em amostras de teste. Em seguida a um período de incubação, proliferação celular é medida por meio da adição de corante Alamar Blue I (Biosource International Catalog nº DAL1100, 10 uL por poço). As células BAF/HRT metabolicamente activas absorvem e reduzem o Alamar Blue, que leva à mudança nas propriedades fluorescentes do corante. Os ensaios adicionais para a actividade de huTSLP incluem, por exemplo, um ensaio de medição da indução de crescimento de células T a partir da medula óssea humana por TSLP como foi descrito na Patente U.S. 6.555.520. Outra actividade de TSLP é a capacidade de activar STAT5 como foi descrita na referência a Levin *et al.*, J. Immunol. 162: 677-683 (1999) e o pedido de patente PCT WO 03/032898. Os ensaios adicionais incluem a produção de CCL17/TARC induzida por TSLP a partir de células dendríticas e monócitos humanos primários como foi descrita na referência a Soumelis *et al. supra*.

Encontrou-se que a TSLP induz a acumulação de fibroblastos e a deposição de colagénio em animais, como será descrito no Exemplo a seguir. A injeção de TSLP

murina intradermicamente em ratinhos resultou em fibrose dentro do tecido subcutâneo dos ratinhos, caracterizado por proliferação de fibroblastos e deposição de colagénio. A actividade antagonizante de TSLP resultaria na prevenção ou na diminuição da proliferação de fibroblastos e deposição de colagénio num tecido.

Como é utilizado no presente documento, o termo "factores pró-fibróticos" refere-se a citocinas, factores de crescimento ou quimiocinas além de TSLP que se observou que promove a acumulação de fibroblastos e deposição de colagénio em vários tecidos. Reportaram-se que uma quantidade de citocinas e factores de crescimento estão envolvidos na regulação da remodelação de tecidos e fibrose. Estes incluem as "citocinas pró-fibróticas" tais como factor de transformação do crescimento beta ($\text{TGF-}\beta$), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), e interleucina-13 (IL-13), que mostraram que estimulam a síntese de colagénio e fibrose em tecidos fibróticos (Letterio *et al.* Ann Rev. Immunol. 16, 137-161 (1998), Fertin *et al.*, Cell Mol. Biol. 37, 823-829 (1991), Doucet *et al.*, J. Clin. Invest. 101, 2129-2139 (1998). Interleucina-9 (IL-9) mostrou que induz a fibrose das vias aéreas nos pulmões de ratinhos (Zhu *et al.*, J. Clin. Invest. 103, 779-788(1999)).

Além de $\text{TGF-}\beta$, reportaram-se que outras citocinas ou factores de crescimento aumentam a fibrose no distúrbio fibrótico fibrose pulmonar idiopática (IPF) que incluem factor estimulante de colónia de macrófagos/granulócito (GM-CSF), factor de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina-1 beta (IL-1 β), e factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (Kelly *et al.* Curr Pharmaceutical Des 9: 39-49 (2003)). As citocinas e factores de crescimento reportados por estarem envolvidos na promoção de fibrose pulmonar que ocorre em escleroderma incluem $\text{TGF-}\beta$, interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6),

oncostatina M (OSM), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), as citocinas do tipo 2 IL-4 e IL-13, IL-9, proteína quimiotática de monócito 1 (CCL2/MCP-1), e quimiocina regulada por activação e pulmonar (CCL18/PARC) (Atamas *et al.*, Cyto Growth Fact Rev 14: 537-550 (2003)). Portanto, numa forma de realização, os métodos e composições da presente invenção compreendem ainda administrar pelo menos um antagonista adicional a um ou mais factores pró-fibróticos além de pelo menos um antagonista de TSLP para reduzir ou prevenir a fibrose num indivíduo que sofre de um distúrbio fibrótico. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona a utilização de pelo menos um antagonista pró-fibrótico além de pelo menos um antagonista de TSLP na preparação de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de um distúrbio fibrótico num indivíduo. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica que compreende, além de pelo menos um antagonista de TSLP, um ou mais antagonistas a factores pró-fibróticos, isto é, citocinas, factores de crescimento ou quimiocinas, em mistura com um portador farmacêuticamente aceitável. Estes factores pró-fibróticos incluem, mas não são limitados a, as seguintes citocinas, factores de crescimento ou quimiocinas: interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-9 (IL-9), interleucina-13 (IL-13), factor de transformação do crescimento beta (TGF- β), factor estimulante de colónia de macrófagos/granulócitos (GM-CSF), factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), interleucina-6 (IL-6), oncostatina M (OSM), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), proteína quimiotática de monócito 1 (CCL2/MCP-1), e quimiocina regulada por activação e pulmonar (CCL18/PARC). Os números de acesso para estas citocinas e seus receptores específicos (se disponíveis) são encontrados no Quadro I a seguir.

QUADRO I

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
TSLP	<i>Homo sapiens</i>	Proteína da linfopoietina estromal tímica	GenBank/ Patente US N° 6555520	AAK67940/ SEQ ID NO: 2
TSLP	<i>Mus musculus</i>	Linfopoietina derivada do estroma tímica; Linfopoietina derivada estromal tímica	GenBank	AAF81677
TSLPR	<i>Homo sapiens</i>	Sequência semelhante a receptor de citocina 2 (CRL2); IL-XR; Receptor da proteína da linfopoietina estromal tímica	US 2002/0068323	SEQ ID NO: 5
TSLPR	<i>Mus</i>	Factor semelhante a receptor de citocina 2; Receptor delta 1 da citocina tipo I; Molécula semelhante a receptor 2 de citocina (CRLM-2); Receptor da proteína da linfopoietina estromal tímica	GenBank, SWISSPROT	Q8CII9

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
TNF-alfa	<i>Homo sapiens</i>	Factor de necrose tumoral; Membro 2 da superfamília do ligando do factor de necrose tumoral; TNF-a; Caquectina	GenBank, SWISSPROT	P01375
TNF-alfa	<i>Mus</i>	Factor de necrose tumoral; Membro 2 da superfamília do ligando do factor de necrose tumoral; TNF-a; Caquectina	GenBank, SWISSPROT	P06804
TNF-RI	<i>Homo sapiens</i>	Membro 1A da superfamília do receptor do factor de necrose tumoral; p60; TNF-R1; p55; CD120a [contém: Proteína de ligação do factor de necrose tumoral 1 (TBPI)]	GenBank, SWISSPROT	P19438
TNF-RI	<i>Mus</i>	Membro 1A da superfamília do receptor do factor de necrose tumoral; p60; TNF-R1; p55	GenBank, SWISSPROT	P25118

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
TNF-RII	<i>Homo sapiens</i>	Membro 1B da superfamília do receptor do factor de necrose tumoral; Receptor 2 do factor de necrose tumoral; p80; TNF-R2; p75; CD120b; Etanorcepte [contém: Proteína de ligação do factor de necrose tumoral 2 (TBPII)]	GenBank, SWISSPROT	P20333
TNF-RII	<i>Mus</i>	Membro 1B da superfamília do receptor do factor de necrose tumoral; Receptor 2 do factor de necrose tumoral; TNF-R2; p75	GenBank, SWISSPROT	P25119
IL-1 alfa	<i>Homo sapiens</i>	Interleucina-1 alfa; Hematopoietina-1	GenBank, SWISSPROT	P01583
IL-1 alfa	<i>Mus</i>	Interleucina-1 alfa	GenBank, SWISSPROT	P01582
IL-1 R-1	<i>Homo sapiens</i>	Receptor da interleucina-1, tipo I; IL-1R-alfa; P80; Antigénio	GenBank, SWISSPROT	P14778

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
		CD121a		
IL-1 R-1	<i>Mus</i>	Receptor da interleucina-1, tipo I; P80	GenBank, SWISSPROT	P13504
IL-1 R-2	<i>Homo sapiens</i>	Receptor da interleucina-1, tipo II; IL-1R-beta; Antígeno CDw121b	GenBank, SWISSPROT	P27930
IL-1 R-2	<i>Mus</i>	Receptor da interleucina-1, tipo II	GenBank, SWISSPROT	P27931
IL-4	<i>Homo sapiens</i>	Interleucina-4; Factor 1 estimulador de células B (BSF-1); Factor 1 estimulador de linfócitos	GenBank, SWISSPROT	P05112
IL-4	<i>Mus</i>	Interleucina-4; Factor 1 estimulador de células B (BSF-1); Factor 1 estimulador de linfócitos; Factor de indução de IGG1; Factor de	GenBank, SWISSPROT	P07750

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
		diferenciação de IGG de células B; Factor 1 de crescimento de células B		
IL-4R	<i>Homo sapiens</i>	Cadeia alfa do receptor da interleucina-4 (IL-4R-alfa; Antígeno CD124) [contém: Cadeia alfa do receptor da interleucina-4 solúvel (sIL4Ralfa/prot); Proteína de ligação de IL-4 (IL4-BP)]	GenBank, SWISSPROT	P24394
IL-4R	<i>Mus</i>	Cadeia alfa do receptor da interleucina-4 (IL-4R-alfa) [contém: Cadeia alfa do receptor da interleucina-4 solúvel; Proteína de ligação de IL-4 (IL4-BP)]	GenBank, SWISSPROT	P16382

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
IL-5	<i>Homo sapiens</i>	Interleucina-5; Factor de substituição de células T (TRF); Factor de diferenciação de eosinófilos; Factor de diferenciação de células B	GenBank, SWISSPROT	P05113
IL-5	<i>Mus</i>	Interleucina-5; Factor de substituição de células T (TRF); Factor II de crescimento de células B (BCGF-II); Factor de diferenciação de eosinófilos; Indutor de linfócitos T citotóxicos	GenBank, SWISSPROT	P04401
IL-5R	<i>Homo sapiens</i>	Cadeia alfa do receptor da interleucina-5 (IL-5R-alfa); Antigénio CD125	GenBank, SWISSPROT	Q01344
IL-5R	<i>Mus</i>	Cadeia alfa do receptor da interleucina-5 (IL-	GenBank, SWISSPROT	P21183

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
		5R-alfa)		
IL-9	<i>Homo sapiens</i>	Interleucina-9; Factor de crescimento P40 de células T; Citocina P40	GenBank, SWISSPROT	P15248
IL-9	<i>Mus</i>	Interleucina-9; Factor de crescimento P40 de células T; Citocina P40	GenBank, SWISSPROT	P15247
IL-9R	<i>Homo sapiens</i>	Receptor da interleucina-9	GenBank, SWISSPROT	Q01113
IL-9R	<i>Mus</i>	Receptor da interleucina-9	GenBank, SWISSPROT	Q01114
IL-13	<i>Homo sapiens</i>	Interleucina-13	GenBank, SWISSPROT	P35225
IL-13	<i>Mus</i>	Interleucina-13; Proteína de activação de células T P600	GenBank, SWISSPROT	P20109
IL-13RA-1	<i>Homo sapiens</i>	Cadeia alfa-1 do receptor da interleucina-13 (IL-13R-alfa-1); Antigénio CD213a1	GenBank, SWISSPROT	P78552

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
IL-13RA-1	<i>Mus</i>	Cadeia alfa-1 do receptor da interleucina-13 (IL-13R-alfa-1); Proteína de ligação da interleucina-13; NR4	GenBank, SWISSPROT	009030
IL-13RA-2	<i>Homo sapiens</i>	Cadeia alfa-2 do receptor da interleucina-13; Proteína de ligação da interleucina-13	GenBank, SWISSPROT	Q14627
IL-13RA-2	<i>Mus musculus</i>	Receptor alfa 2 da IL-13	GenBank	AAC33240
TGF- β 1	<i>Homo sapiens</i>	Factor de transformação do crescimento beta 1	SWISSPROT	P01137
TGF- β 1	<i>Mus musculus</i>	Factor de transformação do crescimento beta 1	SWISSPROT	P04202
TGF- β R1	<i>Homo sapiens</i>	Factor de transformação do crescimento beta receptor tipo I; receptor R4 da proteína quinase serina/treonina (SKR4); quinase 5 semelhante a receptor da	SWISSPROT	P36897

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
		activina (ALQU-5)		
TGF- β R2	<i>Homo sapiens</i>	Receptor tipo II do factor de transformação do crescimento beta	SWISSPROT	P37173
GM-CSF	<i>Homo sapiens</i>	factor de estimulação de colónias de granulócito-macrófago; factor de estimulação de colónias; sargramostim; molgramostin	SWISSPROT	P04141
IL-6	<i>Homo sapiens</i>	Interleucina 6; interferão, beta 2	Genbank	AAH15511
IL-6	<i>Homo sapiens</i>	Precursor da interleucina-6; Factor 2 de estimulação de células B; interferão beta-2; factor de crescimento de hibridoma; Factor	SWISSPROT	P05231

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
		de diferenciação de CTL		
IL-6	<i>Mus musculus</i>	Precursor da interleucina-6; interleucina HP-1; Factor de crescimento de hibridoma de células B	SWISSPROT	P08505
IL-6 R β	<i>Homo sapiens</i>	cadeia beta do receptor da interleucina-6; glicoproteína de membrana 130; gp130; receptor da oncostatina M; CDw130; Antígeno CD130	SWISSPROT	P40189
IL-6R- alfa	<i>Homo sapiens</i>	Precursor da cadeia alfa do receptor da interleucina-6; Antígeno CD126	SWISSPROT	P08887
IL-6R- beta	<i>Homo sapiens</i>	Cadeia beta do receptor da interleucina-6	Genbank; SWISSPROT	AAB63010;
IL-6 R- alfa	<i>Mus musculus</i>	Cadeia alfa do receptor da	SWISSPROT	P22272

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
		interleucina-6		
IL-6R-beta	<i>Mus musculus</i>	Cadeia beta do receptor da interleucina-6	SWISSPROT	Q00560
OSM	<i>Homo sapiens</i>	Oncostatina M	Genbank	AAA36388
subunidade beta OSMR	<i>Homo sapiens</i>	Subunidade beta do receptor específico da oncostatina-M	Genbank; Patente US N° 5891997	AAC50946; SEQ ID NO: 2
OSM	<i>Mus musculus</i>	Precursor da oncostatina M	SWISSPROT	P53347
OSMR	<i>Mus musculus</i>	Receptor específico da oncostatina M	Genbank	AAC40122
CTGR	<i>Homo sapiens</i>	Precursor do factor de crescimento do tecido conjuntivo; proteína 24 específica de condrócitos hipertróficos	SWISSPROT	P29279
CTGR	<i>Mus musculus</i>	Precursor do factor de crescimento do tecido conjuntivo; proteína FISP-12; proteína 24 específica de condrócitos hipertróficos	SWISSPROT	P29268

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
PDGF-1	<i>Homo sapiens</i>	Factor de crescimento derivado de plaquetas, cadeia A; polipéptido alfa do factor de crescimento derivado de plaquetas	SWISSPROT	P04085
PDGF-2	<i>Homo sapiens</i>	Factor de crescimento derivado de plaquetas, cadeia B; polipéptido beta do factor de crescimento derivado de plaquetas	SWISSPROT	P01127
PDGF-1	<i>Mus musculus</i>	Factor de crescimento derivado de plaquetas, precursor da cadeia A	SWISSPROT P20033	
PDGF-2	<i>Mus musculus</i>	Factor de crescimento derivado de plaquetas, precursor da cadeia B	SWISSPROT	P31240

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
PDGR-R- α	<i>Homo sapiens</i>	Receptor alfa do factor de crescimento derivado de plaquetas, antigénio CD140a	SWISSPROT	P16234
PDGR-R- β	<i>Homo sapiens</i>	Receptor beta factor de crescimento derivado de plaquetas; antigénio CD140B	SWISSPROT	P09619
CCL2	<i>Homo sapiens</i>	Precursor A2 da citocina induzível pequena; proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1); factor de activação e quimiotático de monócitos (MCAF); proteína JE secretória de monócitos (HC11)	SWISSPROT	P13500
MCP-1-R	<i>Homo sapiens</i>	Receptor tipo 2 da quimiocina C-C (CCR2); Receptor da proteína 1 quimioattractiva dos monócitos	SWISSPROT	P41597

(continuação)

Nome da Proteína	Espécie	Sinónimos	Banco(s) de dados (ou Pedido de Patente)	Nº de Acesso (ou SEQ ID NO:)
CCL18	<i>Homo sapiens</i>	Precursor A18 da citocina induzível pequena (CCL18); Proteína 4 do macrófago inflamatório (MIP-4); Quimiocina regulada por activação e pulmonar (PARC quimiocina CC); Quimiocina 1 CC associada a activação dos macrófagos alternativa (MAC-1); quimiocina 1 de células dendríticas (DC-CK1)	SWISSPROT	P55774

Antagonistas de TSLP

Um antagonista de TSLP inibe ou bloqueia pelo menos uma actividade de TSLP, ou alternativamente, bloqueia a expressão da citocina ou seu receptor. Inibir ou bloquear a actividade de citocina pode ser alcançado, por exemplo, por meio da utilização de um ou mais agentes inibidores que interferem com a ligação da citocina a seu receptor, e/ou bloqueia a transdução de sinal que resulta da ligação da citocina a seu receptor.

Na presente invenção, o antagonista de TSLP compreende um agente de ligação a TSLP, que se liga a TSLP e previne a ligação da citocina a seu receptor, e/ou bloqueia a transdução de sinal que resulta da ligação da citocina a seu receptor. Estes antagonistas incluem, mas não são limitados a, anticorpos antagonísticos, agentes de ligação a péptido ou polipéptido, TSLPR solúvel e heterodímeros EL-7R α /TSLPR solúveis.

Em outra forma de realização, o antagonista é um antagonista de TSLPR, que se liga a este receptor e bloqueia a ligação do ligando e/ou a transdução de sinal. Estes antagonistas incluem, mas não são limitados a, anticorpos antagonísticos e ligandos solúveis, que se ligam a TSLPR e interferem com transdução de sinal e actividade de TSLP.

Em outra forma de realização, o antagonista é um antagonista ao heterodímero IL-7R α /TSLPR, que se liga ao heterodímero, e bloqueia a ligação do ligando e/ou a transdução de sinal. Estes antagonistas incluem, mas não são limitados a, anticorpos antagonísticos, ligandos solúveis, que se ligam ao heterodímero e interferem com transdução de sinal e actividade de TSLP.

Em outra forma de realização, as utilizações e composições da presente invenção proporcionam um antagonista adicional a um ou mais "factores pró-fibróticos", que incluem, mas não são limitados a IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, TGF- β , GM-CSF, TNF- α , IL-1 β , CTGF, IL-6, OSM, PDGF, CCL2/MCP-1, e CCL18/PARC para prevenir ou reduzir a fibrose num indivíduo que sofre de um distúrbio fibrótico. Os antagonistas a estes factores pró-fibróticos podem ser seleccionados de agentes que se ligam ao factor por si mesmos, o receptor, ou um receptor heterodimérico ao qual o factor pode ligar-se e sinalizar, em que o antagonista interfere com a ligação do ligando/receptor e/ou pelo menos uma actividade. Numa forma de realização, o

factor antagonista bloqueia a expressão do factor ou seu receptor.

Numa forma de realização, os antagonistas de TSLP ligam-se especificamente ao ligando, receptor ou receptor heterodímero de TSLP. Como é utilizado no presente documento, o termo "liga-se especificamente" refere-se a antagonistas tais como anticorpos que têm uma afinidade de ligação (K_a) para TSLP, TSLPR, ou o heterodímero, (ou correspondente a uma citocina pró-fibrotica, receptor da citocina, ou receptor de heterodímero da citocina) de mais de ou igual a 10^6 M^{-1} , numa forma de realização 10^7 M^{-1} , em outra forma de realização, 10^8 M^{-1} , em outra forma de realização 10^9 M^{-1} , como foram determinadas por meio de técnicas bem conhecidas na especialidade (tais como, por exemplo, Scatchard, Ann NY Acad Sci 51:660-672 (1949), e como serão descritas a seguir).

Os antagonistas para TSLP e factores pró-fibróticos serão descritos geralmente em mais detalhes a seguir.

Antagonistas Particulares

Anticorpos

Os antagonistas incluem anticorpos que se ligam a uma citocina ou seu receptor e reduzem ou bloqueiam pelo menos uma actividade da citocina. Como é utilizado no presente documento, o termo "anticorpo" refere-se a anticorpos intactos que incluem anticorpos policlonais (veja-se, por exemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow e Lane (eds), Cold Spring Harbor Press, (1988)), e anticorpos monoclonais (veja-se, por exemplo, a Patente U.S. N° RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439, e 4.411.993, e Monoclonal antibodies: A New Dimension in Biological Analysis. Plenum Press, Kennett, McKeam e Bechtol (eds.) (1980)). Como é utilizado no presente documento, o termo "anticorpo" também se refere a um fragmento de um anticorpo tal como $F(ab)$, $F(ab')$, $F(ab')_2$, F_v , fragmentos de regiões determinantes de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia única

(scFv), ou combinações destes, que podem ser produzidos por meio de técnicas de recombinação de ADN ou por meio de clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. Os anticorpos também incluem polipéptidos tais como proteínas de fusão que contêm pelo menos uma porção de uma imunoglobulina que é suficiente para conferir ligação de antígeno específica ao polipéptido. Os anticorpos também incluem dAb (domínio V_H), diacorpos (anticorpos bivalentes que compreendem duas cadeias de polipéptidos, cada uma tendo cadeias V_H e V_L), e triacorpos e tetracorpos (anticorpos com três e quatro cadeias de polipéptidos respectivamente, cada uma tendo cadeias V_H e V_L). Os anticorpos também incluem minicorpos (como foram descritos no documento WO 94/09817), e maxicorpos ou fusões de scFv-Fc (Powers *et al*, J. Immunol Met 251, 123-135 (2001)), produzidas por meio de técnicas de ADN recombinante ou por meio de clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos.

O termo "anticorpo" também se refere a anticorpos biespecíficos ou bifuncionais que são um anticorpo híbrido artificial que tem dois pares de cadeia pesada/leve diferentes e dois locais de ligação diferentes. Os anticorpos biespecíficos podem ser produzidos por uma variedade de métodos que inclui fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. (Veja-se Songsivilai *et al*, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990), Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)). Como é utilizado no presente documento, o termo "anticorpo" também se refere a anticorpos quiméricos, isto é, anticorpos que têm um domínio de imunoglobulina de anticorpo constante humano é acoplado a um ou mais domínios de imunoglobulina de anticorpo variáveis não humanos, ou fragmentos dos mesmos (veja-se, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.595.898 e a Patente U.S. Nº 5.693.493). Os anticorpos também se referem a anticorpos "humanizados", e anticorpos humanos produzidos

por animais transgênicos, ambos os quais serão descritos mais completamente a seguir. O termo "anticorpos" também inclui anticorpos multiméricos, ou um complexo de mais alta ordem de proteínas tais como anticorpos heterodiméricos. "Anticorpos" também inclui anticorpos anti-idiotípicos. A produção de anticorpos é descrita em mais detalhe a seguir.

Os anticorpos policlonais dirigidos a uma citocina ou seu polipéptido receptor podem ser produzidos em animais (por exemplo, coelhos ou ratinhos) por meio de injeções múltiplas subcutâneas ou intraperitoneais do polipéptido e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o polipéptido antigénico a uma proteína portadora que é imunogénica na espécie a ser imunizada, tal como hemocianina de molusco keyhole, soro, albumina, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de semente de soja. Também, agentes de agregação tal como alúmen podem ser utilizados para melhorar a resposta imune. Após a imunização, os animais são sangrados e o soro é ensaiado para título de anticorpos.

Os anticorpos monoclonais que são imunorreactivos com uma citocina ou seu receptor são produzidos utilizando qualquer método que proporcione a produção de moléculas de anticorpos por linhas de células contínuas em cultura. Exemplos de métodos adequados para preparar anticorpos monoclonais incluem os métodos de hibridoma de Kohler *et al.* Nature 256:495-97 (1975) e o método de hibridoma de células B humanas (Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Também proporcionados pela invenção são linhas de células de hibridoma que produzem anticorpos monoclonais reactivos com citocinas ou seus receptores.

Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser modificados para utilização como agentes terapêuticos. Uma forma de realização é um anticorpo "quimérico" em que uma

porção da cadeia pesada (H) e/ou leve (L) é idêntica com ou homóloga a uma sequência correspondente em anticorpos derivados de um espécie particular ou pertencente a um classe ou subclasse particular de anticorpo, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico com ou homóloga a uma sequência correspondente em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencente a outra classe ou subclasse de anticorpo. Também incluídos são fragmentos de tais anticorpos, contanto que exibam a actividade biológica desejada. Veja-se a Patente U.S. Nº 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55 (1985).

Um anticorpo monoclonal pode também ser um anticorpo "humanizado". Os métodos para humanizar anticorpos não humanos são bem conhecidos na especialidade. Veja-se a Patente U.S. Nº 5.585.089 e 5.693.762. Geralmente, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos no mesmo a partir de uma fonte que não é de seres humanos. A humanização pode ser realizada, por exemplo, utilizando métodos descritos na especialidade (veja-se, por exemplo, a Pat. U.S. Nº 4.816.567 e o documento WO 94/10332, Jones *et al.*, Nature 321:522-25 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-27 (1998); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-36 (1988)), por meio da substituição de pelo menos uma porção de uma região determinante de complementaridade de roedor para as regiões correspondentes de um anticorpo humano.

Os anticorpos podem ser anticorpos humanos. Utilizando animais transgênicos (por exemplo, ratinhos) que são capazes de produzir um repertório de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena tais anticorpos são produzidos por imunização com o antigénio apropriado (isto é, que tem pelo menos 6 aminoácidos contíguos), opcionalmente conjugado a um portador. Veja-se, por exemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 2551-55 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature 362:255-58 (1993)

Bruggermann *et al.* Year em Immuno. 7:33 (1993), Mendez *et al.*, Nature Genetics 15:146-156 (1997), e a Patente U.S. Nº 6.300.129,). Num método, tais animais transgênicos são produzidos por meio da incapacitação dos loci endógenos que codificam as cadeias de imunoglobulina pesada e leve nos mesmos, e da inserção de loci que codificam as proteínas de cadeia pesada e leve humanas no genoma dos mesmos. Os animais parcialmente modificados, isto é, aqueles que têm menos do complemento completo de modificações, são então cruzados para obter um animal que tem todas as modificações de sistema imune desejadas. Quando é administrado um imunogénio, estes animais transgênicos produzem anticorpos com sequências de aminoácidos humanas (ao invés de, por exemplo, murinas), que inclui regiões variáveis que são imuno-específicas para estes antigénios. Veja-se a Pub. PCT Nº WO9633735 e o documento WO9402602. Métodos adicionais são descritos na Patente U.S. Nº 5.545.807, Pub. PCT Nº WO9110741 e o documento WO 9004036, e na Patente Europeia Nº 546073B1 e 546073A1. Anticorpos humanos podem também ser produzidos pela expressão de ADN recombinante em células hospedeiras ou pela expressão em células de hibridoma como são descritos no presente documento.

Os anticorpos que incluem anticorpos humanos podem também ser produzidos a partir de bibliotecas de apresentação de fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581(1991)). Estes processos imitam a selecção imune através da apresentação de repertórios de anticorpo na superfície de bacteriófagos filamentosos, e subsequente selecção de fagos pela sua ligação a um antigénio de escolha. Tal técnica é descrita no documento WO 9910494 que descreve o isolamento de anticorpos agonísticos de alta afinidade e funcionais para receptores de MPL e msK utilizando tal enfoque. As bibliotecas de apresentação de fagos de anticorpo estão disponíveis em que fragmentos Fab de

anticorpo, por exemplo, são apresentados em bibliotecas de fago e fagomídeo, que permitem a selecção e a purificação de Fabs e IgGs solúveis, e que permitem a purificação por afinidade (Dyax Corp).

Os anticorpos quiméricos, enxertados com CDR, e humanizados são produzidos tipicamente por métodos de recombinação. Os ácidos nucleicos que codificam os anticorpos são introduzidos em células hospedeiras e expressos utilizando materiais e procedimentos descritos no presente documento. Numa forma de realização, os anticorpos são produzidos em células hospedeiras de mamíferos, tais como células CHO. Os anticorpos monoclonais (por exemplo, humanos) podem ser produzidos pela expressão de recombinante ADN em células hospedeiras ou pela expressão em células de hibridoma como é descrito no presente documento.

Antagonistas de Péptido/Polipéptido

Os antagonistas a TSLP incluem péptidos e polipéptidos que são capazes de se ligar a TSLP, TSLPR, ou o receptor heterodimérico IL-7Ra/TSLPR, inibir ou bloquear a ligação do receptor do ligando, e/ou reduzir ou bloquear a actividade de citocina. Os antagonistas de péptido e polipéptido a outros factores pró-fibróticos incluem péptidos ou polipéptidos capazes de se ligar ao ligando, o receptor do ligando, ou um receptor heterodimérico, onde aplicável. Como é utilizado no presente documento, o termo "polipéptido" refere-se a qualquer cadeia de aminoácidos ligada por ligações peptídicas, independente do comprimento ou modificação pós-traducional. "Péptido" geralmente refere-se a uma cadeia de aminoácidos mais curta, entre aproximadamente dois aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos. Os polipéptidos e péptidos incluem proteínas naturais, polipéptidos e péptidos sintéticos ou recombinantes. Como é utilizado no presente documento, o termo "aminoácido" refere-se aos 20 α -aminoácidos padrão

bem como derivados de ocorrência natural e sintéticos. Um polipéptido pode conter aminoácidos L ou D ou uma combinação do mesmo. Como é utilizado no presente documento, o termo "péptido mimético" refere-se a estruturas semelhantes a péptidos que têm estruturas não de aminoácidos substituída por um ou mais aminoácidos.

Os polipéptidos e péptidos de ligação da presente invenção podem incluir uma sequência ou sequência parcial de proteínas de ocorrência natural, sequências randomizadas derivadas de proteínas de ocorrência natural, ou sequências inteiramente randomizadas.

Os antagonistas de péptido e polipéptido incluem as proteínas de fusão em que as terminações amino e/ou carboxi do péptido ou polipéptido são fusionadas a outro polipéptido, um fragmento do mesmo, ou a aminoácidos que não são reconhecidos geralmente para ser parte de qualquer sequência de proteínas específica. Os exemplos de tais proteínas de fusão são polipéptidos imunogénicos tais como regiões constantes da imunoglobulina (Fc), proteínas marcadoras, proteínas ou polipéptidos que facilitam a purificação do péptido ou polipéptido desejado, as sequências que promovem a formação de proteínas multiméricas tais como motivos de zíper de leucina que são úteis na formação de dímero ou trímero e para promover a estabilidade e semividas de circulação mais longas. Outras proteínas de fusão úteis incluem a ligação de domínios funcionais, tais como locais activos de enzimas, domínios de glicosilação, sinais de alvejamento celular ou regiões transmembranares. Estes péptidos ou polipéptidos podem ser ainda unidos a ligantes de péptidos além de agentes de multimerização tais como uma região Fc a fim de multimerizar a molécula e deste modo melhorar a afinidade de ligação. As fusões de fragmentos de anticorpo tais como o domínio Fc de IgF, IgA, IgM, ou IgE com um polipéptido tal como um domínio solúvel de um receptor da citocina são

bem conhecidos. Os péptidos ou polipéptidos de ligação podem também ser unidos a moléculas portadoras tais como polietilenoglicol (PEG).

Os polipéptidos ou péptidos de ligação incluem ainda peptícorpos, que são descritos na Patente U.S. N° 6.660.843.

Ligandos solúveis

Os antagonistas de péptido e polipéptido incluem os antagonistas de ligando solúvel. Como é utilizado no presente documento, o termo "antagonista de ligando solúvel" refere-se a péptidos solúveis, polipéptidos ou péptidos miméticos capazes de se ligar ao receptor de TSLP ou outro receptor de factor pró-fibrótico, ou receptor heterodimérico e bloquear a ligação citocina-receptor e/ou a transdução de sinal e a actividade. Os antagonistas de ligando solúvel incluem variantes da citocina que mantêm homologia substancial a, mas não a actividade do ligando, que inclui trunicações tais um trunicações de terminal N ou C, substituições, deleções, e outras alterações na sequência de aminoácidos, tal como substituição de um péptido mimético não aminoácido para um resíduo de aminoácidos. Os antagonistas de ligando solúvel, por exemplo, podem ser capazes de se ligar a receptor da citocina, mas não permitir a transdução de sinal. Para os propósitos da presente invenção, uma proteína é "substancialmente similar" a outra proteína se é pelo menos 80%, preferentemente pelo menos aproximadamente 90%, mais preferentemente pelo menos aproximadamente 95% idêntica uma a outra em sequência de aminoácidos.

Receptores solúveis

Os antagonistas de péptido e polipéptido incluem ainda fragmentos ou versões truncadas do receptor da citocina, modificadas ou de outra maneira, capazes de se ligar a TSLP, (ou outros factores pró-fibróticos) e/ou bloquear ou inibir a ligação de receptor de TSLP, e deste modo reduzir

ou bloquear a actividade de citocina. Estas versões truncadas do receptor da citocina, por exemplo, incluem domínios solúveis de ocorrência natural, bem como variações devido a proteólise das terminações N ou C. O domínio solúvel inclui todo ou parte do domínio extracelular do receptor, separado ou unido a péptidos ou modificações adicionais. O domínio solúvel de TSLPR humano é aproximadamente de 25 a 231 aminoácidos de SEQ ID NO: 4. O domínio solúvel de IL-7R α é aproximadamente de 1 a 219 aminoácidos da Figura 2 da Patente U.S. Nº 5.264.416. Os domínios solúveis de receptores podem também ser proporcionados como proteínas de fusão, tais como fusões Fc.

Os antagonistas de citocina também incluem receptores ou fragmentos de receptores homo ou heterodimérico de ligação cruzada desenhados para se ligarem a citocinas, também conhecidos como "armadilhas de citocina". As armadilhas de citocina são polipéptidos de fusão capazes de se ligar a uma citocina para formar um complexo não funcional. Uma armadilha de citocina inclui pelo menos uma porção de ligação de citocina de um domínio extracelular de a região determinante de especificidade de um receptor de citocina junto com uma porção de ligação de citocina do domínio extracelular do componente de transdução de sinal do receptor de citocina e um componente tal como um Fc que multimeriza os fragmentos de receptor da citocina. As armadilhas de citocina são descritas, por exemplo, na Patente U.S. Nº 6.472.179.

Péptidos e polipéptidos

Os péptidos e antagonistas de polipéptido da presente invenção podem ser gerados por quaisquer métodos conhecidos na especialidade que inclui síntese química, digestão de proteínas, ou tecnologia recombinante, apresentação de fagos, rastreio de péptido-ARN, e outras técnicas de rastreio de afinidade. Por exemplo, os polipéptidos e

péptidos podem ser sintetizados em solução ou num suporte sólido de acordo com técnicas convencionais. Vários sintetizadores automáticos estão comercialmente disponíveis e podem ser utilizados de acordo com protocolos conhecidos. Veja-se, por exemplo, Stewart e Young (*supra*); Tam *et al.*, J Am Chem Soc, 105:6442, (1983); Merrifield, Science 232:341-347 (1986); Barany e Merrifield, The peptides, Gross e Meienhofer, eds, Academic Press, Nova Iorque, 1-284; Barany *et al.*, Int J Pep Protein Res, 30: 705-739 (1987); e a Patente U.S. Nº 5.424.398. Os métodos para síntese de péptidos em fase sólida são descritos em Coligan *et al.*, Curr Prot Immunol, Wiley Interscience, 1991, Unidade 9, por exemplo.

Os métodos de síntese de péptidos em fase sólida utilizam um copoli(estireno-divinilbenzeno) que contém 0,1-1,0 mM de aminas/g de polímero. Estes métodos para a síntese de péptidos utilizam protecção de butiloxicarbonilo (t-BOC) ou 9-fluorenilmetiloxi-carbonil(FMOC) de grupos alfa-amino. Ambos os métodos envolvem sínteses por etapas de acordo com as quais um único aminoácido é adicionado em cada etapa partindo da terminação C do péptido (Veja-se, Coligan *et al.*, Curr Prot Immunol, Wiley Interscience, 1991, Unidade 9). No término da síntese química, o péptido sintético pode ser desprotegido para remover os grupos bloqueadores de aminoácido t-BOC ou FMOC e clivado do polímero por tratamento com ácido a temperatura reduzida (por exemplo, HF líquido-10% de anisol durante aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 hora a 0°C). Após a evaporação dos reagentes, os péptidos são extraídos do polímero com 1% de solução de ácido acético que é então liofilizada para render a matéria-prima. Esta pode ser purificada normalmente por tais técnicas como filtração em gel em Sephadex G-15 utilizando 5% ácido acético como um solvente. A liofilização de fracções apropriadas da coluna rendeu os péptidos homogéneos ou derivados de péptido, que

podem então ser caracterizados por tais técnicas padrão como análise de aminoácidos, cromatografia em camada fina, cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia de absorção de ultravioleta, rotação molar, solubilidade, e quantificados pela degradação de Edman em fase sólida.

As técnicas de apresentação de fagos representam outro método para identificar péptidos capazes de se ligar a citocinas ou seus receptores. Brevemente, uma biblioteca de fagos é preparada (utilizando, por exemplo, ml 13, fd, ou fago lambda), apresentando inserções de resíduos de aminoácidos. As inserções podem representar, por exemplo, um arranjo completamente degenerado ou tendencioso. As inserções que carregam fagos que se ligam ao antigénio desejado são seleccionados e este processo repetido através de diversos ciclos de re-selecção de fagos que se ligam ao antigénio desejado. O sequenciamento de ADN é conduzido para identificar as sequências dos péptidos expressos. A porção linear mínima da sequência que se liga ao antigénio desejado pode ser determinada nesse sentido. O procedimento pode ser repetido utilizando um biblioteca tendenciosa que contém as inserções que contém parte ou toda a porção linear mínima mais um ou mais resíduos degenerados adicionais a montante ou a jusante do mesmo. Estas técnicas podem identificar péptidos com afinidade de ligação ainda maior para as citocinas ou seus receptores. A tecnologia de apresentação de fagos é descrita, por exemplo, em Scott *et al.* Science 249: 386 (1990); Devlin *et al.*, Science 249: 404 (1990); Patente U.S. Nº 5.223.409; Patente U.S. Nº 5.733.731; Patente U.S. Nº 5.498.530; Patente U.S. Nº 5.432.018; Patente U.S. Nº 5.338.665; Patente U.S. Nº 5.922.545; documento WO 96/40987, e documento WO 98/15833. Opcionalmente, bibliotecas de mutagénese são criadas e rastreadas como foram descritas anteriormente para otimizar adicionalmente a sequência dos melhores ligantes. (Lowman, Ann Rev Biophys Biomol Struct 26:401-24 (1997)).

Outros métodos de geração de péptidos de ligação incluem técnicas de selecção de afinidade adicionais conhecidas na especialidade, que incluem métodos de "apresentação em *E. coli*", "apresentação em ribossoma" que utilizam a ligação química de péptidos a ARN conhecido colectivamente como "rastreo de péptido-ARN". Os métodos de rastreo duplo-híbrido de levedura também podem ser utilizados para identificar os péptidos da invenção que se ligam a citocinas ou seus receptores. Além disso, bibliotecas de péptidos derivados quimicamente foram desenvolvidas em que péptidos são imobilizados em materiais não biológicos estáveis, tais como hastes de polietileno ou resinas permeáveis a solvente. Outra biblioteca de péptidos derivados quimicamente utiliza fotolitografia para a exploração de péptidos imobilizados em lâminas de vidro. Mais adiante no presente documento, estes e métodos relacionados são colectivamente referidos como "rastreo de péptidos químico". O rastreo de péptidos químico pode ser vantajoso em que permite a utilização de D-aminoácidos e outros análogos, bem como elementos não peptídicos. Tanto os métodos biológicos como químicos são revistos em Wells e Lowman, Curr Opin Biotechnol 3: 355-62 (1992).

Adicionalmente, os péptidos seleccionados, péptidos miméticos, capazes de se ligar citocinas e receptores da citocina podem ser melhorados ainda através da utilização de "desenho de fármaco racional". Num enfoque, a estrutura tridimensional de um polipéptido da invenção, um ligando ou parceiro de ligação, ou de um complexo de parceiro de ligação a polipéptido, é determinada por meio de cristalografia de raios X, por meio de ressonância magnética nuclear, ou por meio de modelagem por homologia em computador ou, mais tipicamente, por uma combinação destes enfoques. A informação estrutural relevante é utilizada para desenhar moléculas análogas, para identificar inibidores eficazes, tais como moléculas

pequenas que podem se ligar a um polipéptido da invenção. Os exemplos de algoritmos, software, e métodos para modelar substratos ou agentes de ligação com base na estrutura tridimensional de uma proteína são descritos na publicação PCT WO107579.

Os antagonistas tais como péptidos, polipéptidos, péptidos miméticos, anticorpos, domínios solúveis, são seleccionados por meio do rastreio para ligação à citocina alvo ou alvos de receptor da citocina, seguido por eluição não específico e específico. Uma quantidade de ensaios de ligação é conhecida na especialidade e inclui ensaios de ligação não competitivos e competitivos. Subsequentemente, os parâmetros inibitórios tais como CI_{50} (concentração na qual 50% de uma actividade designada é inibida) e a afinidade de ligação como foi medida por K_D (constante de dissociação) ou K_a (constante de associação) podem ser determinados utilizando ensaios a base de células ou outros ensaios. A CI_{50} pode ser determinada utilizando ensaios a base de células, por exemplo, que utilizam culturas de células que expressam receptores da citocina na superfície celular, bem como um repórter de sinalização que responde a citocina tal como um vector de repórter pLuc-MCS (Stratagene cat n° 219087). A inibição da sinalização ao aumentar as quantidades de inibidor está presente na cultura de células juntamente com a citocina que pode ser utilizada para determinar a CI_{50} . Como é utilizado no presente documento, o termo "liga-se especificamente" refere-se a uma afinidade de ligação de pelo menos $10^6 M^{-1}$, numa forma de realização, $10^7 M^{-1}$ ou superior. A constante de equilíbrio K_D ou K_a pode ser determinada utilizando sistemas de ensaio BIAcore® tais como BIAcore®3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) que utilizam várias concentrações de inibidores candidatos de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O valor terapêutico dos antagonistas pode então ser testado em vários modelos

animais tais como os modelos murinos descritos a seguir no Exemplo.

Os antagonistas específicos a factores pró-fibróticos são conhecidos. Além de inibidores à actividade de TSLP, os métodos e composições da presente invenção podem utilizar antagonistas específicos que incluem a proteína de fusão do receptor Fc de TNF- α conhecida como Etanorcepte (ENBREL®), sTNF-RI, onercepte, D2E7, e Remicade™, e anticorpos especificamente reactivos com TNF- α e receptor de TNF- α . Os antagonistas incluem ainda moléculas antagonistas de IL-1 α tais como anakinra, Kineret®, moléculas semelhantes a IL-1 α tais como IL-1Hy1 e IL-1Hy2; inibidores de polipéptidos a IL-1 α e receptor de IL-1 α , antagonista de receptor solúvel de IL-1. Os inibidores de polipéptidos de IL-1 são descritos na Patente U.S. 6.599.873, que descreve sequências polipéptido glicosilado e não glicosilado, que é incorporado por referência no presente documento. O Kineret® difere da IL-1 α nativa humana em que tem a adição de um único resíduo de metionina na sua terminação amino. O Kineret® bloqueia a actividade biológica da IL-1 pela inibição competitiva da ligação de IL-1 ao receptor tipo I da interleucina-1 (IL-1rI). Os inibidores adicionais conhecidos incluem anticorpos que se ligam a IL-4 e receptor de IL-4, anticorpos que se ligam a IL-5 e receptores de IL-5, e anticorpos que se ligam a IL-13 e receptores de IL-13.

Independente da maneira em que os péptidos ou polipéptidos são preparados, uma molécula de ácido nucleico que codifica cada péptido ou polipéptido pode ser gerada utilizando procedimentos padrão de ADN recombinante. A sequência de nucleótidos de tais moléculas pode ser manipulada tanto quanto apropriado sem mudar a sequência de aminoácidos que codificam para ser responsáveis pela degeneração do código do ácido nucleico bem como para ser responsáveis pela preferência de codão em células

hospedeiras particulares. As técnicas de ADN recombinante também proporcionam um método conveniente para preparar agentes polipeptídicos da presente invenção, ou fragmentos dos mesmos que incluem domínios de receptor solúvel, por exemplo. Um polinucleótido que codifica o polipéptido ou fragmento pode ser inserido num vector de expressão, que pode por sua vez ser inserido numa célula hospedeira para a produção dos polipéptidos da presente invenção.

Uma variedade de sistemas de vector de expressão/hospedeiro podem ser utilizados para expressar os agentes peptídicos e polipeptídicos. Estes sistemas incluem, mas não são limitados a microrganismos tais como bactérias transformadas com vectores de expressão ADN de cosmídeo ou plasmídeo, bacteriófago recombinante; levedura transformada com vectores de expressão de leveduras; sistemas de células insectos infectados com vectores de expressão de vírus (por exemplo, baculovírus); sistemas de células vegetais transfectadas com vectores de expressão de vírus (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformadas com vectores de expressão bacterianos (por exemplo, plasmídeo Ti ou pBR322); ou sistemas de células animais. As células de mamíferos que são úteis em produções de proteína recombinante incluem, mas não são limitadas a células VERO, células HeLa, linhas de células do ovário de hamster chinês (CHO), células COS (tal como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 e 293.

O termo "vector de expressão" refere-se a um plasmídeo, fago, vírus ou vector, para expressar um polipéptido a partir de uma sequência de polinucleótidos. Um vector de expressão pode compreender uma unidade transcricional que compreende uma montagem de (1) um elemento ou elementos genéticos que têm um papel regulador na expressão de genes, por exemplo, promotores ou melhoradores, (2) uma estrutura ou sequência que codifica o

agente polipeptídico que é transcrito em ARNm e traduzido em proteína, e (3) iniciação de transcrição e sequências de terminação apropriadas. As unidades estruturais destinadas a utilização em sistemas de expressão de levedura ou eucarióticos preferentemente incluem uma sequência líder que permite a secreção extracelular de proteína traduzida por uma célula hospedeira. Alternativamente, onde a proteína recombinante é expressa sem uma sequência líder ou de transporte, pode incluir um resíduo de metionilo amino terminal. Este resíduo pode ou pode não ser subsequentemente clivado a partir da proteína recombinante expressa para proporcionar um produto polipeptídico final. Por exemplo, os péptidos e peptícorpos podem ser expressos recombinantemente em leveduras utilizando um sistema de expressão comercialmente disponível, por exemplo, o Sistema de Expressão em Pichia (Invitrogen, San Diego, CA), seguindo as instruções do fabricante. Este sistema também se baseia na sequência pré-pró-alfa para dirigir a secreção, mas a transcrição da inserção é guiada pelo promotor do álcool oxidase (AOX1) mediante a indução por metanol. O polipéptido segregado é purificado a partir do meio de crescimento de leveduras utilizando os métodos utilizados para purificar o polipéptido a partir de sobrenadantes de células bacterianas e de mamíferos.

Alternativamente, o ADNc que codifica o péptido e polipéptidos pode ser clonado no vector de expressão de baculovírus pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). Este vector pode ser utilizado de acordo com as direcções do fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* em meios livres de proteínas sF9 e para produzir a proteína recombinante. A proteína recombinante pode ser purificada e concentrada a partir dos meios utilizando uma coluna de heparina-Sepharose (Pharmacia).

Alternativamente, o péptido ou polipéptido pode ser expresso num sistema de insecto. Os sistemas de insecto for

expressão de proteínas são bem conhecidos a aqueles peritos na especialidade. Num tal sistema, o vírus da poliedrose nuclear da *Autographa californica* (AcNPV) pode ser utilizado como um vector para expressar genes estranhos em células de *Spodoptera frugiperda* ou em *Trichoplusia larvae*. A sequência que codifica o péptido pode ser clonada numa região não essencial do vírus, tais como o gene da poliedrina, e colocada sob controlo do promotor da poliedrina. A inserção bem-sucedida do péptido deixará o gene da poliedrina inactivo e produzirá vírus recombinante com falta de proteína de revestimento. Os vírus recombinantes podem ser utilizados para infectar células de *S. frugiperda* ou *Trichoplusia larvae* em que o péptido é expresso (Smith et al., J Virol 46: 584 (1983); Engelhard et al., Proc Nat Acad Sci (USA) 91: 3224-7 (1994)).

Em outro exemplo, a sequência de ADN que codifica o péptido pode ser amplificada por PCR e clonada num vector apropriado, por exemplo, pGEX-3X (Pharmacia). O vector pGEX é desenhado para produzir uma proteína de fusão que compreende glutathione S-transferase (GST), codificada pelo vector, e uma proteína codificada por um fragmento de ADN inserido no local de clonagem do vector. Os iniciadores para PCR podem ser gerados para incluir, por exemplo, um local de clivagem apropriado.

Alternativamente, uma sequência ADN que codifica o péptido pode ser clonada num plasmídeo que contém um promotor desejado e, opcionalmente, uma sequência líder (Better et al., Science 240:1041-43 (1988)). A sequência desta construção pode ser confirmada por meio do sequenciamento automatizado. O plasmídeo pode então ser transformado em *E. coli* estirpe MC1061 utilizando procedimentos padrão que utilizam incubação com CaCl_2 e tratamento de choque térmico das bactérias (Sambrook et al., supra). As bactérias transformadas podem ser crescidas em meio LB suplementado com carbenicilina, e produção da

proteína expressa pode ser induzida pelo crescimento num meio adequado. Se estiver presente, a sequência líder pode efectuar a secreção do péptido e ser clivada durante a secreção.

Os sistemas de hospedeiro de mamíferos para a expressão de péptidos e polipéptidos recombinantes são bem conhecidos a aqueles peritos na especialidade. As estirpes de células hospedeiras podem ser escolhidas para uma capacidade particular de processar a proteína expressa ou produzir certas modificações pós-translacionais serão úteis em proporcionar a actividade de proteína. Tais modificações da proteína incluem, mas não são limitadas a, acetilação, carboxilação, glicosilação, fosforilação, lipidação e acilação. Células hospedeiras diferentes tais como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, e similares têm maquinaria celular específica e mecanismos característicos para tais actividades pós-traducionais e podem ser escolhidas para assegurar a correcta modificação e processamento da proteína estranha introduzida.

Prefere-se que as células transformadas sejam utilizadas para a produção de proteínas com alto rendimento e de longo prazo. Uma vez que tais células sejam transformadas com vectores que contêm marcadores seleccionáveis bem como o cassete de expressão desejado, as células podem ser permitidas que cresçam durante 1-2 dias em meios enriquecidos antes de serem transferidas a meios selectivos. O marcador seleccionável é desenhado para permitir crescimento e recuperação de células que expressam com sucesso as sequências introduzidas. Amontoados resistentes de células transformadas estavelmente podem ser proliferados utilizando técnicas de cultura de tecido apropriadas à linha de células utilizada.

Uma quantidade de sistemas de selecção pode ser utilizada para recuperar as células que foram transformadas para a produção de proteína recombinante. Tais sistemas de

selecção incluem, mas não são limitados a, genes da timidina quinase HSV, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase e adenina fosforibosiltransferase, em células tk, hgp_{rt} ou ap_{rt}, respectivamente. Também, a resistência a antimetabolito pode ser utilizada como a base de selecção para dhfr que confere resistência a metotrexato; gpt que confere resistência a ácido micofenólico; neo que confere resistência ao aminoglicósido G418 e confere resistência a clorosulfurona; e higo que confere resistência a higromicina. Os genes seleccionáveis adicionais que podem ser úteis incluem trpB, que permite que as células utilizem indol em lugar de triptofano, ou hisD, que permite que as células utilizem histinol em lugar de histidina. Os marcadores que dão uma indicação visual para a identificação de transformantes incluem antocianinas, β -glucuronidase e seu substrato, GUS, e luciferase e seu substrato, luciferina.

Em alguns casos, os polipéptidos expressados desta invenção podem precisar ser "re-dobrados" e oxidados numa estrutura terciária apropriada e ligações dissulfeto geradas a fim de ser biologicamente activo. A re-dobramento pode ser realizada utilizando uma quantidade de procedimentos bem conhecidos na especialidade. Tais métodos incluem, por exemplo, a exposição ao agente polipeptídico solubilizado a um pH usualmente acima de 7 na presença de um agente caotrópico. A selecção de caotrópico é similar às escolhas utilizadas para a inclusão de solubilização de corpo, no entanto um caotrópico é tipicamente utilizado a uma concentração mais baixa. Os agentes caotrópicos exemplares são guanidina e ureia. Na maioria dos casos, a solução de re-dobramento/oxidação conterá também um agente redutor mais sua forma oxidada numa razão específica para gerar um potencial redox particular que permite que a inversão de dissulfeto ocorra para a formação de pontes de cisteína. Alguns pares redox comuns utilizados incluem

cisteína/cistamina, glutathiona/ditiobisGSH, cloreto cúprico, ditiotreitól DTT/ditiano DTT, e 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. Em muitos casos, um co-solvente pode ser utilizado para aumentar a eficácia do re-dobramento. Os co-solventes comumente utilizados incluem glicerol, polietilenoglicol de vários pesos moleculares, e arginina.

É necessário purificar os péptidos e polipéptidos da presente invenção. As técnicas de purificação de proteínas são bem conhecidas a aqueles peritos na especialidade. Estas técnicas envolvem, a um nível, o fraccionamento bruto das fracções proteínáceas e não proteínáceas. Que têm os péptidos ou polipéptidos separados das outras proteínas, o péptido ou polipéptido de interesse pode ser purificado adicionalmente utilizando técnicas cromatográficas e electroforéticas para alcançar purificação parcial ou completa (ou purificação para a homogeneidade). Os métodos analíticos particularmente adequados para a preparação de polipéptidos e péptidos são cromatografia de permuta de iões, cromatografia por exclusão; electroforese em poliacrilamida gel; focalização isoeléctrica. Um método eficaz particularmente de purificação de péptidos é cromatografia líquida de proteína rápida ou mesmo HPLC. O termo "polipéptido ou péptido purificado" como é utilizado no presente documento, é pretendido que se refira a uma composição, isolável de outros componentes, em que o polipéptido ou péptido é purificado a qualquer grau em relação ao seu estado obtenível naturalmente. Um péptido ou polipéptido purificado, portanto também se refere a um polipéptido ou péptido que é livre do ambiente em que possa estar naturalmente. Geralmente, "purificado" irá referir-se a uma composição de péptido ou polipéptido que foi submetida a fraccionamento para remover vários outros componentes, e cuja composição substancialmente retém sua actividade biológica expressada. Onde o termo "substancialmente purificado" é utilizado, esta designação

irá referir-se a uma composição de péptido ou polipéptido em que o polipéptido ou péptido forma o maior componente da composição, tal como constituindo aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% ou mais das proteínas na composição.

Vários métodos para quantificar o grau de purificação do péptido ou polipéptido serão conhecidos a aqueles peritos na especialidade à luz da presente descrição. Estes incluem, por exemplo, a determinação da actividade de ligação específica de uma fracção activa, ou avaliar a quantidade de péptido ou polipéptido dentro de uma fracção por meio de análise por SDS/PAGE. Um método preferido para avaliar a pureza de uma fracção de péptido ou polipéptido é calcular a actividade de ligação da fracção, para comparar a mesma à actividade de ligação do extracto inicial, e assim calcular o grau de purificação, no presente documento avaliado por um "número de purificação de dobra". As unidades reais utilizadas para representar a quantidade de actividade de ligação, claro, será dependente da técnica de ensaio particular escolhida para acompanhar a purificação e se ou não o polipéptido ou péptido exibe uma actividade de ligação detectável.

Várias técnicas adequadas para utilização em purificação serão bem conhecidas a aqueles peritos na especialidade. Estes incluem, por exemplo, a precipitação com sulfato de amónio, PEG, anticorpos (imunoprecipitação) e similares ou por meio de desnaturação por calor, seguida por centrifugação; etapas de cromatografia tais como cromatografia por afinidade (por exemplo, Proteína-A-Sepharose), permuta de iões, filtração em gel, fase reversa, hidroxilapatita e cromatografia por afinidade; focalização isoelectrica; electroforese em gel; e combinações de tais e outras técnicas. Como é geralmente conhecido na especialidade, acredita-se que a ordem de

condução das várias etapas de purificação pode ser mudada, ou que certas etapas podem ser omitidas, e ainda resultar num método adequado para a preparação de um polipéptido substancialmente purificado.

Antagonistas a polinucleótidos

Antagonistas a TSLP e outras citocinas pró-fibroticas incluem antagonistas que previnem ou reduzem a expressão da citocina ou seu receptor. Estes incluem oligonucleótidos antisenso ou senso que compreendem uma sequência de polinucleótido de cadeia simples (ARN ou ADN) capaz de ligar-se a sequências ARNm alvo (senso) ou ADN (antisenso). Oligonucleótidos antisenso ou senso, compreendem fragmentos da sequência de polinucleótido alvo que codifica a citocina ou seu receptor. Tal fragmento geralmente compreende pelo menos aproximadamente 14 nucleótidos, tipicamente desde aproximadamente 14 até aproximadamente 30 nucleótidos. A capacidade de derivar um oligonucleótido antisenso ou um senso, com base numa sequência de ácido nucleico que codifica dada proteína dada proteína é descrita em, por exemplo, Stein e Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988), e van der Krol *et al.* (BioTechniques 6:958,1988). A ligação de oligonucleótidos antisenso ou senso a sequências de ácido nucleico alvo resulta na formação de duplexes que bloqueiam ou inibem a expressão de proteína por um de diversos meios, que inclui degradação potenciada do ARNm por RNase H, inibição de splicing, terminação prematura da transcrição ou tradução, ou por outros meios. Os oligonucleótidos antisenso assim podem ser utilizados para bloquear a expressão de proteínas. Os oligonucleótidos antisenso ou senso compreendem ainda oligonucleótidos que tem esqueletos açúcar-fosfodiéster modificados (ou outras ligações de açúcar, tais como aquelas descritas no documento WO91/06629) e em que tais ligações de açúcar são resistentes a nucleases endógenas. Tais oligonucleótidos com ligações de açúcar resistentes são estáveis *in vivo*

(isto é, capazes de resistir a degradação enzimática), mas retêm a especificidade de sequência para ser capazes de ligar-se a sequências de nucleótidos alvo.

Outros exemplos de oligonucleótidos senso ou antisenso incluem aqueles oligonucleótidos que são ligados covalentemente a fracções orgânicas, tais como aquelas descritas no documento WO 90/10448, e outras fracções que aumentam a afinidade do oligonucleótido para uma sequência de ácido nucleico alvo, tal como poli-(L)-lisina. Além disso ainda, agentes intercalantes, tais como elipticina, e agentes alquilantes ou complexos de metal podem ser unidos a oligonucleótidos senso ou antisenso para modificar as especificidades de ligação do oligonucleótido antisenso ou senso para a sequência de nucleótidos alvo.

Os oligonucleótidos antisenso ou senso podem ser introduzidos numa célula que contém o ácido nucleico alvo por meio de qualquer método de transferência de genes, que inclui, por exemplo, lipofecção, transfecção de ADN mediada por CaPO_4 -, electroporação, ou pela utilização de vectores de transferência de genes tais como vírus Epstein-Barr ou adenovírus.

Os oligonucleótidos senso ou antisenso também podem ser introduzidos numa célula que contém o ácido nucleico alvo por meio da formação de um conjugado com um ligando-molécula de ligação, como descrito no documento WO 91/04753. As moléculas de ligação a ligando adequadas incluem, mas não são limitadas a, receptores de superfícies celular, factores de crescimento, outras citocinas, ou outros ligandos que se ligam a receptores de superfícies celular. Preferentemente, a conjugação do ligando-molécula de ligação não interfere substancialmente com a capacidade do ligando-molécula de ligação de ligar-se a sua molécula ou receptor correspondente, ou bloquear a entrada do oligonucleótido senso ou antisenso ou sua versão conjugada na célula.

Alternativamente, um oligonucleótido senso ou um antisenso pode ser introduzido numa célula que contém o ácido nucleico alvo por meio da formação de um complexo oligonucleótido-lípido, como descrito no documento WO 90/10448. O complexo oligonucleótido senso ou antisenso-lípido é preferentemente dissociado dentro da célula por uma lipase endógena.

Métodos adicionais para prevenir a expressão de citocinas ou receptores de citocina alvo são interferência de ARN ou ARN produzido por meio da introdução de ARN de cadeia dupla específico (dsRNA), como descrito, por exemplo, em Boshier *et al.*, Nature Cell Biol 2, E31-E36 (2000).

Composições farmacêuticas

As composições farmacêuticas que contém um ou mais antagonistas de TSLP de acordo com a presente invenção estão dentro do âmbito da presente invenção. Além disso, composições farmacêuticas que contém um ou mais antagonistas de TSLP além de antagonistas a factores pró-fibróticos são proporcionadas. Tais composições compreendem uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de cada antagonista em mistura com materiais farmacêuticamente aceitáveis. Uma quantidade eficaz, como é utilizado no presente documento, é uma quantidade suficiente para tratar um indivíduo para um distúrbio fibrótico. Tipicamente, os antagonistas serão suficientemente purificados para administração a um animal.

A composição farmacêutica podem conter materiais formulação para modificar, manter ou conservar, por exemplo, o pH, osmolaridade, viscosidade, claridade, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou libertação, adsorção ou penetração da composição. Os materiais de formulação adequados incluem, mas não são limitados a, aminoácidos (tal como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina);

antimicrobianos; antioxidantes (tal como ácido ascórbico, sulfito de sódio ou hidrogenosulfito de sódio); tampões (tal como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, outros ácidos orgânicos); agentes de volume (tal como manitol ou glicina), agentes quelantes (tal como ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA)); agentes complexantes (tal como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina ou hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monossacáridos; dissacáridos e outros hidratos de carbono (tal como glicose, manose, ou dextrinas); proteínas (tal como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas); colorantes; aromatizantes e agentes de diluição; agentes emulsificantes; polímeros hidrofílicos (tal como polivinilpirrolidona); polipéptidos de baixo peso molecular; contraíões formadores de sais (tal como sódio); conservantes (tal como cloreto de benzalcónio, ácido benzóico, ácido salicílico, timerosal, álcool fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogénio); solventes (tal como glicerina, propilenoglicol ou polietileno glicol); álcoois de açúcar (tal como manitol ou sorbitol); agentes de suspensão; tensioactivos ou agentes humectantes (tal como Pluronic, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbato tais como polisorbato 20, polisorbato 80, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes melhoradores da estabilidade (sacarose ou sorbitol); agentes melhoradores da tonicidade (tal como haletos de metal alcalinos (preferentemente cloreto de sódio ou potássio, manitol sorbitol); veículos de distribuição; diluentes; excipientes e/ou adjuvantes farmacêuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edição, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

A composição farmacêutica óptima será determinada por um perito na especialidade dependendo, por exemplo, da via de administração pretendida, formato de distribuição, e

desejada dosagem. Veja-se, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*. Tais composições podem influenciar o estado físico, estabilidade, taxa de libertação *in vivo*, e taxa da depuração *in vivo* da molécula terapêutica.

O veículo ou portador primário numa composição farmacêutica pode ser de natureza aquosa ou não aquosa. Por exemplo, um veículo adequado ou portador pode ser água para injeção, solução salina fisiológica ou fluido cerebrospinal artificial, possivelmente complementado com outros materiais comuns em composições para administração parentérica. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina de soro são veículos exemplares adicionais. Outras composições farmacêuticas exemplares compreendem tampão Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, ou tampão acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pode ainda incluir sorbitol ou um substituto adequado do mesmo. Numa forma de realização, da presente invenção, as composições antagonistas podem ser preparadas para armazenagem misturando a composição seleccionada que tem o grau de pureza desejado com agentes de formulação opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*) na forma de um bolo liofilizado ou uma solução aquosa. Além disso, o antagonista terapêutico pode ser formulado como um liofilizado utilizando excipientes apropriados tais como sacarose.

As composições farmacêuticas podem ser seleccionadas para a patologia a ser tratada. O tratamento de distúrbios fibróticos pode ser administrado topicamente, oralmente ou administrado por meio de injeção, por exemplo. Alternativamente, as composições podem ser administradas, por exemplo, por inalação terapêutica, oralmente, ou por meio de injeção. A preparação de tal farmacêuticamente aceitável composições é dentro do perito na especialidade.

Os componentes de formulação estão presentes em concentrações que são aceitáveis para o local de administração. Por exemplo, tampões são utilizados para manter a composição em pH fisiológico ou a pH ligeiramente baixo, tipicamente dentro de um intervalo de pH de desde aproximadamente 5 até aproximadamente 8.

Quando a administração parentérica é contemplada, as composições terapêuticas para utilização nesta invenção podem estar na forma de uma solução aquosa livre de pirogénios, parentericamente aceitável que compreende o antagonista desejado num veículo farmacologicamente aceitável. Um veículo particularmente adequado para injeção parentérica é água destilada estéril em que um antagonista é formulado como uma solução estéril, isotónica, propriamente conservada. Ainda outra preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com um agente, tal como microesferas injectáveis, partículas bio-erodíveis, compostos poliméricos (ácido poliláctico, ácido poliglicólico), pérolas, ou lipossomas, que proporcionam a libertação controlada ou sustentada do produto que pode então ser distribuído via uma injeção depot. O ácido hialurónico pode também ser utilizado, e este pode ter o efeito de promover a duração sustentada na circulação. Outros meios adequados para a introdução da molécula desejada incluem dispositivos de administração de fármacos implantáveis.

Em outro aspecto, formulações farmacêuticas adequadas para administração parentérica podem ser formuladas em soluções aquosas, preferentemente em tampões fisiologicamente compatíveis tais como solução de Hanks, solução de ringer, ou solução salina fisiologicamente tamponada. Suspensões de injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tal como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol, ou dextrano. Adicionalmente, suspensões dos compostos activos podem ser

preparadas como suspensões de injeção oleosas apropriadas. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos gordos, tais como óleo de gergelim, ou ésteres de ácido gordo sintético, tais como oleato de etilo, triglicéridos, ou lipossomas. Polímeros de amino policatiónicos não lipídicos podem também ser utilizados para administração. Opcionalmente, a suspensão pode também conter adequados estabilizadores ou agentes para aumentar a solubilidade dos compostos e permitir a preparação de soluções altamente concentradas. Em outra forma de realização, uma composição farmacêutica pode ser formulada para inalação. Por exemplo, um antagonista pode ser formulado como um pó seco para inalação. Soluções de inalação de molécula de ácido nucleico ou polipéptido que incluem antagonistas podem também ser formuladas com um propelente para administração por aerossol. Em ainda outra forma de realização, as soluções podem ser nebulizadas. A administração pulmonar é ainda descrita no pedido PCT N° PCT/US94/001875, que descreve a administração pulmonar de proteínas quimicamente modificadas.

É também contemplado que certas formulações podem ser administradas oralmente. Numa forma de realização da presente invenção, as moléculas que são administradas desta maneira podem ser formuladas com ou sem aqueles portadores habitualmente utilizados na composição de formas de dosagem sólidas tais como comprimidos e cápsulas. Por exemplo, uma cápsula pode ser desenhada para libertar a porção activa da formulação no ponto no tracto gastrointestinal quando a biodisponibilidade é maximizada e a degradação pré-sistémica é minimizada. Os agentes adicionais podem ser incluídos para facilitar a absorção da molécula antagonista. Diluentes, aromatizantes, ceras com baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes desintegrantes de comprimido, e ligantes podem também ser utilizados.

As composições farmacêuticas para administração oral podem também ser formuladas utilizando portadores farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos na especialidade em dosagens adequadas para administração oral. Tais portadores permitem que as composições farmacêuticas sejam formuladas como comprimidos, pílulas, drageias, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas, suspensões, e similares, para ingestão pelo paciente.

As preparações farmacêuticas para utilização oral podem ser obtidas através da combinação de compostos activos com excipiente sólido e processamento da mistura resultante de grânulos (opcionalmente, após a moagem) para obter comprimidos ou núcleo de drageia. Auxiliares adequados podem ser adicionados, se for desejado. Os excipientes adequados incluem cargas de hidrato de carbono ou proteína, tais como açúcares, que inclui lactose, sacarose, manitol, e sorbitol; amido de milho, trigo, arroz, batata, ou outras plantas; celulose, tal como metilcelulose, hidroxipropilmetil-celulose, ou carboximetilcelulose de sódio; gomas, que inclui arábica e tragacanto; e proteínas, tais como gelatina e colagénio. Se for desejado, agentes desintegrantes ou solubilizantes podem ser adicionados, tal como a polivinilpirrolidona reticulada, agar, e ácido algínico ou um sal do mesmo, tal como alginato de sódio.

Os núcleos de drageia podem ser utilizados em conjunto com revestimentos adequados, tais como soluções de açúcar concentradas, que pode também contêm goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenoglicol, e/ou dióxido de titânio, soluções de laca, e solventes orgânicos ou misturas de solventes. Corantes ou pigmentos podem ser adicionados aos comprimidos ou drageia revestimentos para a identificação de produto ou para caracterizar a quantidade de composto activo, isto é, dosagem.

As preparações farmacêuticas que podem ser utilizadas oralmente também incluem as cápsulas duras feitas de gelatina, bem como cápsulas moles, vedadas feitas de gelatina e um revestimento, tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas duras podem conter ingredientes activos misturados com cargas ou ligantes, tais como lactose ou amidos, lubrificantes, tais como talco ou estearato de magnésio, e, opcionalmente, estabilizadores. Em cápsulas moles, os compostos activos podem ser dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, tais como óleos gordos, líquido, ou polietilenoglicol líquido com ou sem estabilizadores.

Outra composição farmacêutica pode envolver uma quantidade eficaz de antagonista numa mistura com excipientes não tóxicos que são adequados para o fabrico de comprimidos. Por meio da dissolução dos comprimidos em água estéril, ou outro veículo apropriado, as soluções podem ser preparadas em forma de dosagem unitária. Os excipientes adequados incluem, mas não são limitados a, diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, carbonato ou bicarbonato de sódio, lactose, ou fosfato de cálcio; ou ligantes, tais como amido, gelatina, ou acácia; ou agentes lubrificantes tais como estearato de magnésio, ácido esteárico, ou talco.

As composições farmacêuticas adicionais serão evidentes a aqueles peritos na especialidade, que inclui formulações que envolve moléculas em formulações de distribuição sustentada ou controlada. Técnicas para formular uma variedade de outros meios de distribuição sustentada ou controlada, tais como portadores de lipossoma, micropartículas bio-erodíveis ou pérolas porosas e injecções depot, são também conhecidas a aqueles peritos na especialidade. Veja-se, por exemplo, o documento WO 9315722 que descreve libertação controlada de micropartículas poliméricas porosas para a distribuição de

composições farmacêuticas. Exemplos de preparações de libertação sustentada adicionais incluem matrizes poliméricas semipermeáveis na forma de artigos moldados, por exemplo, filmes, ou microcápsulas. Matrizes de libertação sustentada podem incluir poliésteres, hidrogéis, poliláctidos (documento U.S. 3.773.919, documento EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, Biopolymers, 22:547-556 (1983), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, (1981); Langer *et al.*, Chem. Tech., 12:98-105(1982)), etileno vinilo acetato (Langer *et al.*, supra) ou ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). As composições de libertação sustentada também incluem lipossomas, que podem ser preparadas por meio de qualquer de diversos métodos conhecidos na especialidade. Veja-se, por exemplo, Eppstein *et al.*, PNAS (USA), 82: 3688 (1985); EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949.

A composição farmacêutica a ser utilizada para a administração *in vivo* tipicamente deve ser estéril. Isto pode ser conseguido por meio de filtração através de membranas de filtração estéril. Onde a composição é liofilizado, a esterilização utilizando este método pode ser conduzida antes de ou após a liofilização e reconstituição. A composição para administração parentérica pode ser armazenada na forma liofilizada ou em solução. Além disso, composições parentéricas geralmente são colocadas num recipiente que tem uma porta de acesso estéril a, por exemplo, uma bolsa de solução intravenosa ou frasco que tem uma tampa que pode ser perfurada por uma agulha de injeção hipodérmica.

Uma vez a composição farmacêutica foi formulada, pode ser armazenada em recipientes estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido, ou um pó desidratado ou liofilizado. Tais formulações podem ser armazenadas numa forma pronta para o uso ou numa forma (por exemplo,

liofilizada) que requer reconstituição antes de administração.

Kits para produzir uma unidade de administração de dose individual podem cada um conter tanto um primeiro recipiente que tem uma proteína seca como um segundo recipiente que tem uma formulação aquosa. Kits podem conter seringas pré-carregadas de câmara simples ou múltiplas (por exemplo, seringas de líquidos e lioseringas).

Uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica a ser utilizada terapêuticamente dependerá, por exemplo, do contexto terapêutico e objetivos. Um perito na especialidade apreciará que os níveis de dosagem apropriados para o tratamento assim variarão dependendo, em parte, da molécula administrada, a indicação para a qual a molécula é está a ser utilizada, a via de administração, e o tamanho (peso corporal, superfície corporal ou tamanho do órgão) e condição (a idade e saúde geral) do paciente. Consequentemente, o clínico pode titular a dosagem e modificar a via de administração para obter o efeito terapêutico óptimo. Uma dosagem típica pode variar desde aproximadamente 0,1 mg/kg a até aproximadamente 100 mg/kg ou mais, dependendo dos factores mencionados anteriormente. Os anticorpos podem ser preferentemente injectados ou administrada intravenosamente.

Para qualquer composto, a dose terapêuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente em ensaios de cultura de células ou em modelos animais tais como ratinhos, ratos, coelhos, cães, porcos, ou macacos. Um modelo animal pode também ser utilizado para determinar o intervalo de concentração apropriado e a via de administração. Tal informação pode então ser utilizada para determinar doses úteis e vias para administração em seres humanos.

A dosagem exacta será determinada em vista de factores relacionados ao indivíduo que requer tratamento. A dosagem e a administração são ajustadas para proporcionar níveis

suficientes do composto activo ou para manter o efeito desejado. Factores que podem ser levados em consideração incluem a gravidade da patologia inflamatória, se a patologia é aguda ou crónica, a saúde geral do indivíduo, a idade, peso, e género do indivíduo, tempo e frequência de administração, combinação(ões) de fármaco, sensibilidades de reacção, e resposta a terapêutica. Composições farmacêuticas de longa duração podem ser administradas a cada 3 a 4 dias, a cada semana, ou bissemanalmente dependendo da semivida e taxa de depuração da formulação particular.

A frequência de dosagem dependerá dos parâmetros farmacocinéticos da molécula terapêutica antagonista na formulação utilizada. Tipicamente, uma composição é administrada até uma dosagem ser alcançada que consegue o efeito desejado. A composição pode portanto ser administrada como uma dose individual, ou como doses múltiplas (nas mesmas ou diferentes concentrações/dosagens) ao longo do tempo, ou como uma infusão contínua. Além disso o refinamento da dosagem apropriada é feito rotineiramente. As dosagens apropriadas podem ser verificadas através de utilização de dados dose-resposta apropriados. Além disso, a composição pode ser administrada profilaticamente.

A via de administração da composição farmacêutica está de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, oralmente, através de injeção por vias intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intra-ocular, intraarterial, intraportal, intralesional, intramedularmente, meios intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutânea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, uretral, vaginal, ou rectal, por sistemas de libertação sustentada ou por dispositivos de implantação. Onde for desejado, as composições podem ser administrada por meio de

injecção por bolus ou continuamente por infusão, ou por meio de dispositivo de implantação.

Alternativamente ou adicionalmente, a composição pode ser administrada localmente via a implantação de uma membrana, esponja, ou outro material apropriado ao qual a molécula desejada foi absorvida ou encapsulada. Onde um dispositivo de implantação é utilizado, o dispositivo pode ser implantado em qualquer tecido ou órgão adequado, e a distribuição da molécula desejada pode ser via difusão, bolus de libertação no tempo, ou administração contínua.

Em alguns casos, um antagonista da presente invenção pode ser distribuído implantando certas células que foram geneticamente manipuladas, utilizando métodos tais como aqueles descritos no presente documento, para expressar e segregar o polipéptido. Tais células podem ser animal ou células humanas, e podem ser autólogas, heterólogas, ou xenogénicas. Opcionalmente, as células podem ser imortalizadas. A fim de diminuir a chance de uma resposta imunológica, as células podem ser encapsuladas para evitar infiltração de tecidos circundantes. Os materiais de encapsulação são tipicamente membranas ou envoltórios biocompatíveis, semipermeáveis poliméricos que permitem a libertação dos produto(s) de proteína, mas previnem a destruição das células pelo sistema imune do paciente ou por outros factores prejudiciais dos tecidos circundantes.

As composições farmacêuticas que contêm os antagonistas terapêuticos da presente invenção são administrados a um indivíduo que sofre de um distúrbio fibrótico para prevenir ou reduzir a fibrose no indivíduo. Os distúrbios fibróticos incluem escleroderma local e sistémica, doença pulmonar intersticial, fibrose pulmonar idiopática, fibrose que surge a partir de hepatite crónica B ou C, fibrose induzida por radiação, e fibrose que surge a partir da cura de ferimento.

A invenção tendo sido descrita, os seguintes exemplos são oferecidos por meio de ilustração, e não limitação.

EXEMPLO

A TSLP murina (R&D Systems) foi administrada a ratinhos fêmea de 15-8 semanas de idade Balb/c (Charles River) de acordo com o seguinte protocolo. Os ratinhos foram divididos em três grupos de 5 ratinhos cada. O Grupo 1 foi injectado três vezes por semana durante uma semana (total de três injeções); o Grupo 2 foi injectado três vezes por semana durante duas semanas (total de seis injeções), e o Grupo 3 foi injectado três vezes por semana durante seis semanas (total de 18 injeções). Os ratinhos foram injectados intradermicamente com 10 µg de TSLP em 100 µl de PBS no flanco esquerdo, e 100 µl de PBS no flanco direito como um controlo. 72 horas após a injeção final, os animais foram anestesiados, sangrias terminais foram realizadas, e o soro foi isolado para análise futura. A pele foi colhida, fixos em formalina, e colocadas em lâminas para coloração com H&E (Hematoxilina e Eosina) para avaliação patológica.

A examinação Histopatológica determinou que após uma ou duas semanas de injeções de muTSLP intradérmicas, a pele de ratinhos continham infiltrados de células mononucleares e eosinófilos dentro do tecido subcutâneo, com extensão no músculo do tronco cutâneo e sobreposição de adipose. Os locais tratados com TSLP também mostraram edema de leve a moderado e de mínima a moderada hiperplasia epitelial na pele. Em contraste, secções de pele injectadas com PBS mostraram somente infiltrados célula mononuclear e eosinófilos mínimo juntamente aos locais de injeção. As lesões da pele tenderam a ser multifocais a localmente extensiva. A gravidade da lesão aumentou com a duração crescente do tratamento. No entanto, após 6 semanas de injeção, a pele injectada com TSLP não mostrou sinais de desenvolvimento de descamação ou lesões.

As secções de pele foram coradas com Trichrome de Masson's, que corou de verde o colagénio. A coloração mostrou que no ponto de tempo de duas semanas colagénio começou a ser depositado em TSLP tratada vs. pele tratada com PBS. Este depósito de colagénio foi não visto no ponto de tempo de uma semana, mas mostrou nos pontos de tempo de duas semanas e seis semanas.

A histopatologia mostrou que após seis semanas de administração intradérmica de muTSLP, o tecido subcutâneo continha infiltrados difusos de moderados a severos de células mononucleares e eosinófilos; a derme continha mastócitos, eosinófilos e células mononucleares, e o epitélio estava moderadamente hiperplásico. A pele injectada com PBS mostrou somente infiltrados difusos de células mononucleares e eosinófilos dentro da derme, possivelmente causadas por muTSLP sistémica ou uma reacção não específica a injecções repetidas.

O tratamento Seis semanas de TSLP resultou em fibrose moderada dentro do tecido subcutâneo, caracterizado por proliferação de fibroblastos e deposição de colagénio. Esta observação foi confirmada com coloração Trichrome. Nem proliferação de fibroblastos nem deposição de colagénio foi vista no tecido subcutâneo tratada com PBS. A coloração de amostras tomadas a seis semanas mostrou um número aumentado de mastócitos na derme de pele injectada com muTSLP inflamada em relação a uma população esparsa de mastócitos na derme da pele testada com PBS.

As pontuações de patologia para pele de ratinho tratada com TSLP a 1 semana, 2 semanas, e seis semanas após 3 injecções por semana em comparação com a pele de ratinho tratada com PBS a seis semanas são sumarizadas nos Quadros 2 a 5 mostrados a seguir.

Quadro 2: tratamento com TSLP semana 1

Animal de tratamento N°	Grupo 1						
	TSLP sem. 1						DP
	1-1	1-2†	1-3†	1-4†	1-5	média	
Inflamação	0	3	1	2	0	1,2	0,6
Neutrófilos	0	1	1	1	0	0,6	0,2
Células mononucleares	0	3	1	2	0	1,2	0,6
Eosinófilos	0	3	1	2	0	1,2	0,6
Edema	0	2	2	2	0	1,2	0,5
Hiperplasia epitelial	0	0 2	1	1	0	0,8	0,4
*Total	0	7	4	5	0		
*pontuação média do grupo	0					3,2	1,4

Quadro 3: tratamento com TSLP semana 2

Animal de tratamento N°	Grupo 2						
	TSLP sem. 2						DP
	2-1	2-2†	2-3†	2-4†	2-5	média	
Inflamação	3	2	2	3	4	2,8	0,4
Neutrófilos	1	1	1	1	1	1,0	0,0
Células mononucleares	3	2	2	3	4	2,8	0,4
Eosinófilos	3	2	2	3	4	2,8	0,4
Edema	2	2	2	2	3	2,2	0,2
Hiperplasia epitelial	1	1	2	2	2	1,6	0,2
*Total	6	5	6	7	9		
*pontuação média do grupo						6,6	0,7

Quadro 4: tratamento com TSLP semana 6

Animal de tratamento N°	Grupo 3A						
	TSLP sem. 6						DP
	3-1	3-2†	3-3†	3-4†	3-5	média	
Inflamação	3	3	4	4	3	3,4	0,2
Neutrófilos	1	1	2	1	1	1,2	0,2
Células mononucleares	3	3	4	4	3	3,4	0,2
Eosinófilos	2	2	3	3	2	2,4	0,2
Edema	2	2	3	3	2	2,4	0,2
Hiperplasia epitelial	2	2	3	3	2	2,4	0,2
fibrose subcuticular	3	3	3	3	3	3,0	0,0
*Total	10	10	13	13	10		
*pontuação média do grupo						11,2	0,7

Quadro 5: controlo com PBS semana 6

Animal de tratamento N°	Grupo 3A						
	PBS sem. 6						DP
	3-1	3-2†	3-3†	3-4†	3-5	média	
Inflamação	2	1	1	1	2	1,4	0,2
Neutrófilos	0	0	0	0	0	0,0	0,02

Continuação

Animal de tratamento N°	Grupo 3A						
	PBS sem. 6						
	3-1	3-2†	3-3†	3-4†	3-5	média	DP
Células mononucleares	2	1	1	1	2	1,4	0,2
Eosinófilos	2	1	1	1	2	1,4	0,2
Edema	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Hiperplasia epitelial	2	1	0	0	2	1,0	0,4
fibrose subcuticular	0	1	0	0	0	0,2	0,2
*Total	4	3	1	1	4		
Códigos e Símbolos 0 = sem achados 1 = mínimo 2 = Suave 3 = Moderado 4 = marcado * = Exclui pontuações de componente de inflamação celular (neutrófilos, células mononucleares , eosinófilos). † = infiltrado celular e edema misturados em tecido subcutâneo							

Estes resultados demonstram que a injeção de TSLP purificado na pele de ratinhos leva a acumulação sub-epitelial de fibroblastos e deposição de colagénio tão precoce quanto duas semanas após a injeção. Esta resposta é aumentada ao longo do curso de tempo seis semanas e foi acompanhada pelo espessamento de pele, edema, e significativa acumulação celular observados na epiderme, derme e subcutina. Esta resposta demonstra o envolvimento de TSLP na promoção de doença fibrótica.

Numa experiência de acompanhamento, cinco grupos de ratinhos fêmeas de 8 semanas de idade Balb/c (Charles River) foram tratados de acordo com o seguinte protocolo. Cada grupo continha 5 ratinhos. Os grupos foram injectados intradermicamente em distintas partes das costas com 100 ul

de volume total como foi descrito anteriormente. O Grupo 1 recebeu uma injeção durante uma semana (total de uma injeção) de 10 ug de ARS (albumina de soro de ratinho, um controlo negativo), 10 ug de TSLP, e PBS em distintas partes das costas. O Grupo 2 foi injectado uma vez por semana por duas semanas (total de injeções) com 10 ug de ARS, 10 ug de TSLP, e PBS em distintas partes das costas. O Grupo 3 foi injectado três vezes por semana por duas semanas (6 injeções total) com 10 ug de ARS, 10 ug de TSLP, e PBS em distintas partes das costas. O Grupo 4 foi injectado três vezes por semana por duas semanas (total de seis injeções) com 1 ug de ARS, 1 ug de TSLP, e PBS em distintas partes das costas. O Grupo 5 foi injectado 3 vezes por semana durante duas semanas (total de seis injeções) com 0,1 ug de ARS, 0,1 ug de TSLP, e PBS em distintas partes das costas. 72 horas após a injeção final, os animais em cada grupo foram sacrificados, a pele foi colhida, fixas em formalina, e colocadas em lâminas para coloração com H&E para avaliação patológica. A evidência de fibrose subcuticular a partir das amostras de pele foi pontuada numa escala desde 1 até 4. A fibrose foi visualmente pontuada com base na acumulação de fibroblastos na região subcuticular das secções de pele. Os resultados são dados nas Figuras 1 e 2. Como visto na Figura 1, a dosagem individual semanalmente de TSLP durante uma semana (Figura 1A, Grupo 1), ou durante duas semanas (Figura 1B, Grupo 2) não resultou em evidência de fibrose. Como visto na Figura 2A, a dosagem de 10 ug de TSLP administrada três vezes por semana por duas semanas (Grupo 3) induziu o maior grau de fibrose encontrado na pele, resultando numa pontuação de 3. Como visto na Figura 2B, a dosagem de 1 ug de TSLP administrada três vezes por semana durante duas semanas (Grupo 4) resultou numa pontuação de 2, e, como é mostrado na Figura 2C, a dosagem de 0,1 ug de TSLP administrada três vezes por semana durante duas semanas

(Grupo 5) resultou numa pontuação de 1. O controlo de ARS, e PBS só não induzem qualquer sinal de fibrose na pele dos ratinhos em qualquer um dos grupos, com a excepção de um único animal pontuando um 1 para PBS no Grupo 4 (Figura 2C). Esta segunda experiência demonstra que TSLP induz fibrose em animais numa maneira dependente da dose.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> AMGEN INC.

Comeau, Michael R.

Fitzpatrick, David R.

<120> COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DISTÚRBIOS
FIBRÓTICOS

<130> A-958 (documento WO)

<140> a ser assignado

<141> 01-02-2006

<150> US 60/649.287

<151> 01-02-2005

<160> 4

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 743

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (200)..(676)

<400> 1

```

gcagccagaa agctctggag catcagggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa      60
caagggcttc ctgtggactg gcaatgagag gcaaaacctg gtgcttgagc actggccct      120
aaggcaggcc ttacagatct cttacactcg tgggtgggaag agtttagtgt gaaactgggg      180
tggaattggg tgtccacgt atg ttc cct ttt gcc tta cta tat gtt ctg tca      232
      Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser
      1             5             10

gtt tct ttc agg aaa atc ttc atc tta caa ctt gta ggg ctg gtg tta      280
Val Ser Phe Arg Lys Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu
      15             20             25

act tac gac ttc act aac tgt gac ttt gag aag att aaa gca gcc tat      328
Thr Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr
      30             35             40

ctc agt act att tct aaa gac ctg att aca tat atg agt ggg acc aaa      376
Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys
      45             50             55

agt acc gag ttc aac aac acc gtc tct tgt agc aat cgg cca cat tgc      424
Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys
      60             65             70             75

ctt act gaa atc cag agc cta acc ttc aat ccc acc gcc ggc tgc gcg      472
Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala
      80             85             90

tcg ctc gcc aaa gaa atg ttc gcc atg aaa act aag gct gcc tta gct      520
Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala
      95             100             105

atc tgg tgc cca ggc tat tcg gaa act cag ata aat gct act cag gca      568
Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala
      110             115             120

atg aag aag agg aga aaa agg aaa gtc aca acc aat aaa tgt ctg gaa      616
Met Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu
      125             130             135

caa gtg tca caa tta caa gga ttg tgg cgt cgc ttc aat cga cct tta      664
Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu
      140             145             150             155

ctg aaa caa cag caaacatct ttattatgggt catatttcac agcccaaaat      716
Leu Lys Gln Gln

aaatcatctt tattaagtaa aaaaaaa      743

```

<210> 2

<211> 159

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser Val Ser Phe Arg Lys
1           5           10           15

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr
20           25           30

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser
35           40           45

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn
50           55           60

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln
65           70           75           80

Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu
85           90           95

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly
100          105          110

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg
115          120          125

Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu
130          135          140

Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
145          150          155

```

```

<210> 3
<211> 1116
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1116)
<220>
<221> sig_péptido
<222> (1)..(66)

```

<220>

<221> misc_feature

<222> (694)..(756)

<400> 3

atg ggg cgg ctg gtt ctg ctg tgg gga gct gcc gtc ttt ctg ctg gga	48
Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe Leu Leu Gly	
1 5 10 15	
ggc tgg atg gct ttg ggg caa gga gga gca gca gaa gga gta cag att	96
Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile	
20 25 30	
cag atc atc tac ttc aat tta gaa acc gtg cag gtg aca tgg aat gcc	144
Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala	
35 40 45	
agc aaa tac tcc agg acc aac ctg act ttc cac tac aga ttc aac ggt	192
Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly	
50 55 60	
gat gag gcc tat gac cag tgc acc aac tac ctt ctc cag gaa ggt cac	240
Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His	
65 70 75 80	
act tca ggg tgc ctc cta gac gca gag cag cga gac gac att ctc tat	288
Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr	
85 90 95	
tto tcc atc agg aat ggg acg cac ccc gtt ttc acc gca agt ogc tgg	336
Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala Ser Arg Trp	
100 105 110	
atg gtt tat tac ctg aaa ccc agt tcc ccg aag cac gtg aga ttt tgg	384
Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val Arg Phe Ser	
115 120 125	

tgg cat cag gat gca gtg acg gtg acg tgt tct gac ctg tcc tac ggg Trp His Gln Asp Ala Val Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu Ser Tyr Gly 130 135 140	432
gat ctc ctc tat gag gtt cag tac cgg agc ccc ttc gac acc gag tgg Asp Leu Leu Tyr Glu Val Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp Thr Glu Trp 145 150 155 160	480
cag tcc aaa cag gaa aat acc tgc aac gtc acc ata gaa ggc ttg gat Gln Ser Lys Gln Glu Asn Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu Gly Leu Asp 165 170 175	528
goc gag aag tgt tac tct ttc tgg gtc agg gtg aag gct atg gag gat Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala Met Glu Asp 180 185 190	576
gta tat ggg cca gac aca tac cca agc gac tgg tca gag gtg aca tgc Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu Val Thr Cys 195 200 205	624
tgg cag aga ggc gag att cgg gat gcc tgt gca gag aca cca acg cct Trp Gln Arg Gly Glu Ile Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr Pro Thr Pro 210 215 220	672
ccc aaa cca aag ctg tcc aaa ttt att tta att tcc agc ctg gcc atc Pro Lys Pro Lys Leu Ser Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile 225 230 235 240	720
ctt ctg atg gtg tct ctc ctc ctt ctg tct tta tgg aaa tta tgg aga Leu Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys Leu Trp Arg 245 250 255	768
gtg aag aag ttt ctc att ccc agc gtg cca gac ccg aaa tcc atc ttc Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys Ser Ile Phe 260 265 270	816
ccc ggg ctc ttt gag ata cac caa ggg aac ttc cag gag tgg atc aca Pro Gly Leu Phe Glu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln Glu Trp Ile Thr 275 280 285	864
gac acc cag aac gtg gcc cac ctc cac aag atg gca ggt gca gag caa Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala Gly Ala Glu Gln 290 295 300	912
gaa agt ggc ccc gag gag ccc ctg gta gtc cag ttg gcc aag act gaa Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala Lys Thr Glu 305 310 315 320	960
gcc gag tct ccc agg atg ctg gac cca cag acc gag gag aaa gag gcc Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala 325 330 335	1008
tct ggg gga tcc ctc cag ctt ccc cac cag ccc ctc caa ggc ggt gat Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp 340 345 350	1056
gtg gtc aca atc ggg ggc ttc acc ttt gtg atg aat gac cgc tcc tac Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr 355 360 365	1104
gtg gcg ttg tga	1116

<211> 371

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met	Gly	Arg	Leu	Val	Leu	Leu	Trp	Gly	Ala	Ala	Val	Phe	Leu	Leu	Gly
1			5					10					15		

Gly	Trp	Met	Ala	Leu	Gly	Gln	Gly	Gly	Ala	Ala	Glu	Gly	Val	Gln	Ile
			20				25						30		

Gln	Ile	Ile	Tyr	Phe	Asn	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Val	Thr	Trp	Asn	Ala
	35					40						45			

Ser	Lys	Tyr	Ser	Arg	Thr	Asn	Leu	Thr	Phe	His	Tyr	Arg	Phe	Asn	Gly
	50					55					60				

Asp	Glu	Ala	Tyr	Asp	Gln	Cys	Thr	Asn	Tyr	Leu	Leu	Gln	Glu	Gly	His
65					70				75					80	

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

Phe	Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	His	Pro	Val	Phe	Thr	Ala	Ser	Arg	Trp
			100					105					110		

Met	Val	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	His	Val	Arg	Phe	Ser
	115						120					125			

Trp	His	Gln	Asp	Ala	Val	Thr	Val	Thr	Cys	Ser	Asp	Leu	Ser	Tyr	Gly
	130					135					140				

Asp	Leu	Leu	Tyr	Glu	Val	Gln	Tyr	Arg	Ser	Pro	Phe	Asp	Thr	Glu	Trp
145				150					155					160	

Gln	Ser	Lys	Gln	Glu	Asn	Thr	Cys	Asn	Val	Thr	Ile	Glu	Gly	Leu	Asp
			165					170						175	

Ala	Glu	Lys	Cys	Tyr	Ser	Phe	Trp	Val	Arg	Val	Lys	Ala	Met	Glu	Asp
			180					185					190		

Val	Tyr	Gly	Pro	Asp	Thr	Tyr	Pro	Ser	Asp	Trp	Ser	Glu	Val	Thr	Cys
	195						200					205			

[illegible]

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 9836061 A [0004]
- US 6555520 B [0018] [0021] [0024]
- US 895945 A [0018]
- US 20020068323 A [0018]
- US 5264416 A [0018] [0046]
- WO 03032898 A [0019] [0021]
- US 32011 A [0032]
- US 4902614 A [0032]
- US 4543439 A [0032]
- US 4411993 A [0032]
- WO 9409817 A [0032]
- US 5595898 A [0033]
- US 5693493 A [0033]
- US 4816567 A [0036] [0037]
- US 5585089 A [0037]
- US 5693762 A [0037]
- WO 9410332 A [0037]
- US 6300129 B [0038]
- WO 9633735 A [0038]
- WO 9402602 A [0038]
- US 5545807 A [0038]
- WO 9110741 A [0038]
- EP 546073 B1 [0038]
- EP 546073 A1 [0038]
- US 6660843 B [0044]
- US 6472179 B [0047]

- US 5424398 A [0048]
- US 5223409 A [0050]
- US 5733731 A [0050]
- US 5498530 A [0050]
- US 5432018 A [0050]
- US 5338665 A [0050]
- US 5922545 A [0050]
- WO 9640987 A [0050]
- WO 9815833 A [0050]
- WO 107579 A [0052]
- US 6599873 B [0054]
- WO 9106629 A [0069]
- WO 9010448 A [0070] [0073]
- WO 9104753 A [0072]
- US 94001875 W [0082]
- US 3773919 A [0089]
- EP 58481 A [0089]
- EP 133988 A [0089]
- EP 36676 A [0089]
- EP 88046 A [0089]
- EP 143949 A [0089]
- US 60649287 B [0110]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **Wynn.** Nature Rev. Immunol., 2004, vol. 4, 583 [0002]
- **Stedman's Medical Dictionary.** Williams & Wilkins, 1995 [0014]
- **Atamas et al.** Cytokine and Growth Factor Rev, 2003, vol. 14, 537-550 [0014]
- **Kelly et al.** Curr Pharma Design, 2003, vol. 9, 39-49 [0015]
- **Cytokines.** Academic Press, 1998 [0017]
- **Sims et al.** J. Exp. Med, 2000, vol. 192 (5), 671-680 [0018]

- **Quentmeier et al.** Leukemia, 2001, vol. 15, 1286-1292 [0018]
- **Park et al.** J. Exp. Med, 2000, vol. 192, 5 [0018]
- **Soumelis et al.** Nature Immunol., 2002, vol. 3 (7), 673-680 [0020]
- **Gilliet et al.** J. Exp. Med., 2003, vol. 197 (8), 1059-1063 [0020]
- **Levin et al.** J. Immunol., 1999, vol. 162, 677-683 [0021]
- **Letterio et al.** Ann Rev. Immunol., 1998, vol. 16, 137-161 [0023]
- **Fertin et al.** Cell Mol. Biol., 1991, vol. 37, 823-829 [0023]
- **Doucet et al.** J. Clin. Invest., 1998, vol. 101, 2129-2139 [0023]
- **Zhu et al.** J. Clin. Invest., 1999, vol. 103, 779-788 [0024]
- **Kelly et al.** Curr Pharmaceutical Des, 2003, vol. 9, 39-49 [0024]
- **Atamas et al.** Cyto Growth Fact Rev, 2003, vol. 14, 537-550 [0024]
- **Scatchard.** Ann NY Acad Sci. 1949, vol. 51, 660-672 [0030]
- **Antibodies: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Press, 1988 [0032]
- **Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analysis.** Plenum Press, 1980 [0032]
- **Powers et al.** J. Immunol Meth, 2001, vol. 251, 123-135 [0032]
- **Songsivilai et al.** Clin. Exp. Immunol., 1990, vol. 79, 315-321 [0033]
- **Kostelny et al.** J. Immunol., 1992, vol. 148, 1547-1553 [0033]
- **Kohler et al.** Nature, 1975, vol. 256, 495-97 [0035]
- **Kozbor.** J. Immunol., 1984, vol. 133, 3001 [0035]

- **Brodeur et al.** Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0035]
- **Morrison et al.** Proc. Natl. Acad. Sci., 1985, vol. 81, 6851-55 [0036]
- **Jones et al.** Nature, 1986, vol. 321, 522-25 [0037]
- **Riechmann et al.** Nature, 1998, vol. 332, 323-27 [0037]
- **Verhoeyen et al.** Science, 1988, vol. 239, 1534-36 [0037]
- **Jakobovits et al.** Proc. Natl.Acad.Sci., 1993, vol. 90, 2551-55 [0038]
- **Jakobovits et al.** Nature, 1993, vol. 362, 255-58 [0038]
- **Bruggermann et al.** Year in Immuno., 1993, vol. 7, 33 [0038]
- **Mendez et al.** Nature Genetics, 1997, vol. 15, 146-156 [0038]
- **Hoogenboom et al.** J. Mol. Biol., 1991, vol. 227, 381 [0039]
- **Marks et al.** J. Mol. Biol., 1991, vol. 222, 581 [0039]
- **Tam et al.** J Am Chem Soc, 1983, vol. 105, 6442 [0048]
- **Merrifield.** Science, 1986, vol. 232, 341-347 [0048]
- **Barany ; Merrifield.** The Peptides. Academic Press, 1-284 [0048]
- **Barany et al.** Int JPep Protein Res, 1987, vol. 30, 705-739 [0048]
- **Coligan et al.** Curr Prot Immunol. Wiley Interscience, 1991 [0048] [0049]
- **Scott et al.** Science, 1990, vol. 249, 386 [0050]
- **Devlin et al.** Science, 1990, vol. 249, 404 [0050]
- **Lowman.** Ann Rev Biophys Biomol Struct, 1997, vol. 26, 401-24 [0050]
- **Wells ; Lowman.** Curr Opin Biotechnol, 1992, vol. 3, 355-62 [0051]
- **Smith et al.** J Virol, 1983, vol. 46, 584 [0059]
- **Engelhard et al.** Proc Nat Acad Sci (USA), 1994, vol. 91, 3224-7 [0059]
- **Better et al.** Science, 1988, vol. 240, 1041-43 [0061]

- **Stein ; Cohen.** Cancer Res., 1988, vol. 48, 2659 **[0069]**
- **van der Krol et al.** BioTechniques, 1988, vol. 6, 958 **[0069]**
- **Bosher et al.** Nature Cell Biol, 2000, vol. 2, E31-E36 **[0074]**
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, 1990 **[0076]**
- **Sidman et al.** Biopolymers, 1983, vol. 22, 547-556 **[0089]**
- **Langer et al.** J. Biomed. Mater. Res., 1981, vol. 15, 167-277 **[0089]**
- **Langer et al.** Chem. Tech., 1982, vol. 12, 98-105 **[0089]**
- **Eppstein et al.** PNAS (USA), 1985, vol. 82, 3688 **[0089]**

REIVINDICAÇÕES

1. Um antagonista de linfopoietina estromal tímica (TSLP) para utilização na redução ou na prevenção de fibrose num indivíduo que sofre de um distúrbio fibrótico, em que o antagonista:

- a) liga-se à linfopoietina estromal tímica ou liga-se ao receptor de linfopoietina estromal tímica; e
- b) é seleccionado do grupo que consiste num anticorpo, péptido ou polipéptido.

2. Um antagonista de TSLP, para utilização de acordo com a reivindicação 1, que é seleccionado de um anticorpo anti-TSLP, um receptor de TSLP solúvel e um heterodímero de receptor de IL-7/receptor de TSLP solúvel.

3. Um antagonista de linfopoietina estromal tímica, para utilização de acordo com a reivindicação 1, que é um anticorpo antagonista seleccionado do grupo que consiste num anticorpo humano, anticorpo humanizado, anticorpo de cadeia única ou fragmento de ligação a anticorpo.

4. Um agente de linfopoietina estromal tímica, para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou com a reivindicação 2, em que o agente de ligação a péptido ou polipéptido, o receptor solúvel ou o receptor heterodímero solúvel compreende ainda um domínio Fc.

5. Um antagonista de linfopoietina estromal tímica, para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o antagonista é um antagonista de receptor de linfopoietina estromal tímica.

6. Um antagonista de linfopoietina estromal tímica, para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1

a 4, em que o distúrbio fibrótico é seleccionado do grupo que consiste em escleroderma, doença pulmonar intersticial, fibrose pulmonar idiopática, fibrose que surge a partir de hepatite crónica B ou C, fibrose induzida por radiação e fibrose que surge a partir da cura de ferimento.

7. Um antagonista de linfopoietina estromal tímica, para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, para utilização com um segundo antagonista a uma citocina pró-fibrotica, em que a citocina é seleccionada de factor de transformação do crescimento β (TGF- β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-9 (IL-9), interleucina-13 (IL-13), factor estimulante de colónia de macrófagos/granulócitos (GM-CSF), factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), interleucina-6 (IL-6), oncostatina M (OSM), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), proteína quimiotática de monócito 1 (CCL2/MCP-1), e quimiocina regulada por activação e pulmonar (CCL18/PARC).

8. Um antagonista de linfopoietina estromal tímica, para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 na forma de uma composição farmacêutica, em que o antagonista de linfopoietina estromal tímica está em mistura com um portador farmacêuticamente aceitável.

9. A utilização de um agente que reduz a quantidade ou a actividade de linfopoietina estromal tímica em tecido no fabrico de um medicamento para modular a acumulação de fibroblastos e deposição de colagénio num indivíduo que sofre de um distúrbio fibrótico, em que o agente é seleccionado do grupo que consiste num anticorpo anti-TSLP, um receptor de TSLP solúvel, um heterodímero de receptor de IL-7/receptor de TSLP solúvel, um oligonucleótido antisense

que reconhece TSLP ou receptor de TSLP e ARN de interferência.

10. A utilização de um agente de acordo com a reivindicação 9, em que a quantidade de linfopoietina estromal tímica ou receptor de linfopoietina estromal tímica é reduzida.

11. Utilização de um antagonista de linfopoietina estromal tímica no fabrico de um medicamento para reduzir ou prevenir a fibrose num indivíduo que sofre de um distúrbio fibrótico, em que o antagonista:

- a) liga-se à linfopoietina estromal tímica ou liga-se ao receptor de linfopoietina estromal tímica; e
- b) é seleccionado do grupo que consiste num anticorpo, péptido ou polipéptido.

Titulação da dose de TSLP por i.d.: Grupo 2

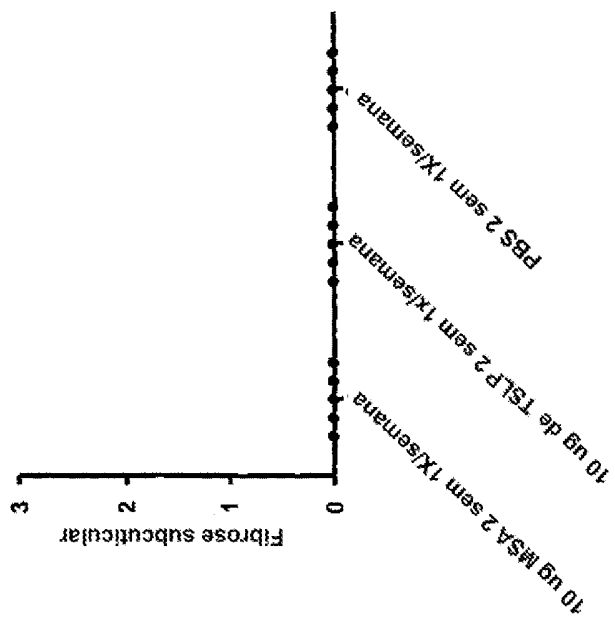


Figura 1B

Titulação da dose de TSLP por i.d.: Grupo 1

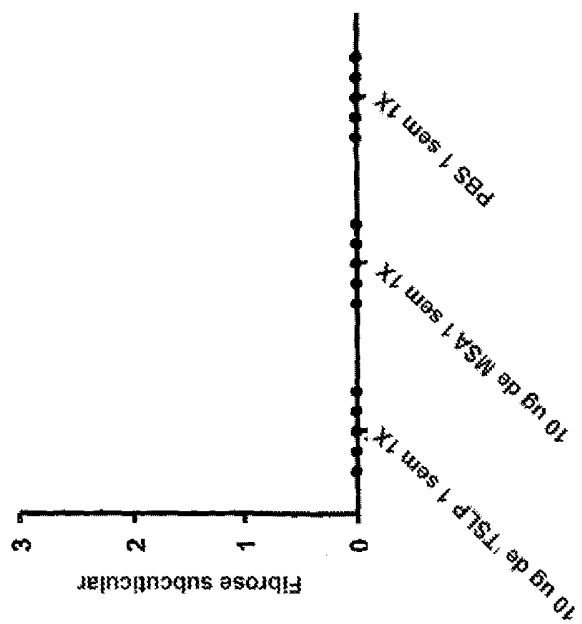


Figura 1A

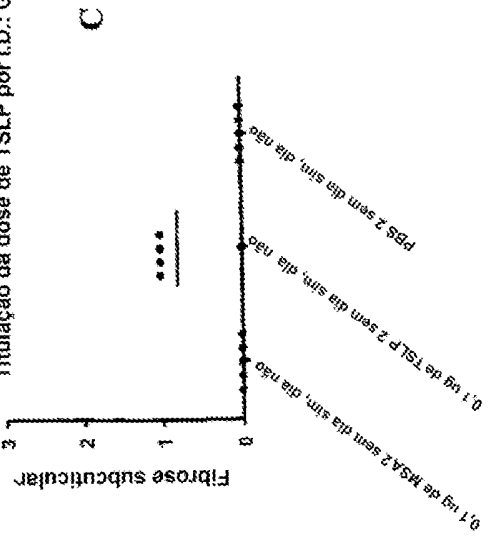
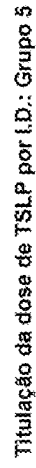
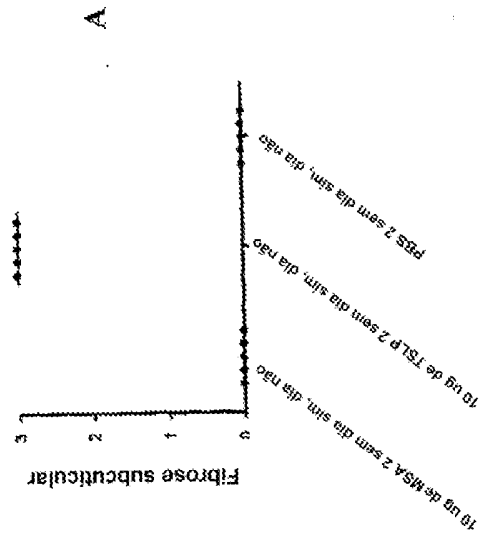
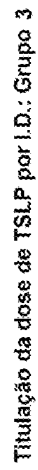
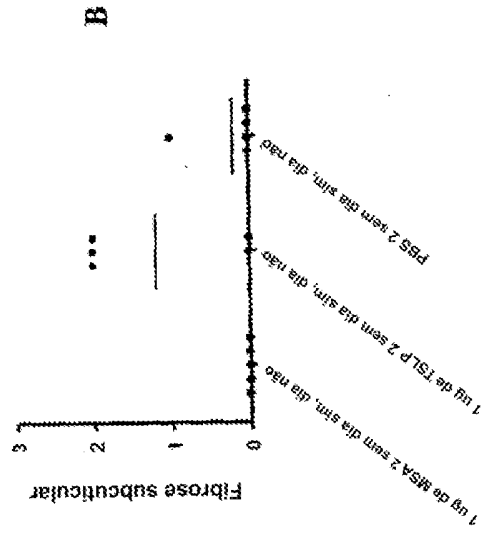
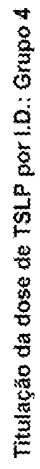


Figura 2