

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0612947-1 A2**

(22) Data de Depósito: 18/05/2006
(43) Data da Publicação: 07/12/2010
(RPI 2083)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/395
A61K 39/00
C07K 17/00

(54) Título: **MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO FIBRÓTICA, MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE PULMONAR, MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE HEPÁTICA, MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE RENAL, MÉTODOS PARA TRATAR UMA DOENÇA FIBRÓTICA E MÉTODO PARA PREVENIR UMA DOENÇA FIBRÓTICA**

(30) Prioridade Unionista: 18/05/2005 US 60/682.005, 05/12/2005 US 60/741.867, 05/12/2005 US 60/741.867, 18/05/2005 US 60/682.005

(73) Titular(es): BIOGEN IDEC INC.

(72) Inventor(es): Alexander Ibraghimov, Sheila Violette, Tatiana Novobrantseva, Victor Koteliensky

(74) Procurador(es): PRISCILA PENHA DE BARROS THEREZA

(86) Pedido Internacional: PCT US2006019404 de 18/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/125140 de 23/11/2006

(57) Resumo: MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO FIBRÓTICA, MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE PULMONAR, MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE HEPÁTICA, MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE RENAL, MÉTODOS PARA TRATAR UMA DOENÇA FIBRÓTICA E MÉTODO PARA PREVENIR UMA DOENÇA FIBRÓTICA. A presente invenção é dirigida aos métodos para o tratamento de doenças fibróticas, tais como a fibrose de fígado, rim e pulmão, bem como as doenças fibróticas de outros tecidos do corpo. Os métodos da invenção compreendem a administração a um paciente com necessidade de tal tratamento de uma quantidade terapêuticamente eficaz de antagonista de célula B. Exemplos de antagonistas de célula B que podem ser usados na prática dos métodos da invenção incluem anticorpos contra antígenos de superfície da célula B (por exemplo, anticorpos contra CD20, e antagonistas de BAFF.

**“MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO FIBRÓTICA,
MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE PULMONAR, MÉTODO PARA
TRATAR A FIBROSE HEPÁTICA, MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE
RENAL, MÉTODOS PARA TRATAR UMA DOENÇA FIBRÓTICA E MÉTODO
5 PARA PREVENIR UMA DOENÇA FIBRÓTICA”**

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos para o tratamento da
fibrose ou doenças fibróticas. Mais especificamente, a invenção refere-se ao
10 uso de antagonistas de células B ou agentes depletore para tratar doenças
fibróticas.

TÉCNICA RELACIONADA

O dano tecidual pode resultar de uma variedade de estímulos
crônicos ou agudos, incluindo infecções, reações auto-imunes e lesão
15 mecânica. O processo de cicatrização normalmente envolve uma fase durante
a qual o tecido conjuntivo substitui o tecido parenquimatoso. (Wynn, *Nature
Reviews* 4:583-594 (2004)). Se este processo continua sem controle, no
entanto, pode resultar na formação de tecido cicatricial permanente e, em
alguns casos, pode finalmente levar a falência do órgão e morte.

20 Doenças fibróticas são condições patológicas, que se caracterizam
pelo acúmulo anormal e/ ou excessivo de material fibrótico (por exemplo, matriz
extracelular), após dano tecidual. Doenças fibróticas incluem doenças
fibroproliferativas que estão associadas a doenças cardiovasculares, tais como
doença cardíaca, doença cerebral e doença vascular periférica, bem como em
25 todos os principais sistemas de órgãos e tecidos, incluindo a pele, rins, pulmões,
fígado e tubo digestivo. (Wynn, *Nature Reviews* 4:583-594 (2004)). Apesar das
doenças fibróticas serem um grupo diversificado de patologias, acredita-se que na
maioria das doenças fibróticas, os mecanismos gerais que levam ao acúmulo do

tecido fibrótico possuem muitos elementos em comum.

A maioria dos métodos terapêuticos para tratar as doenças fibróticas visa à resposta inflamatória, que é acreditada por desempenhar um papel importante no desenvolvimento geral da fibrose. (Wynn, *Nature Reviews* 4:583-594 (2004)). Exemplos de estratégias farmacêuticas para o tratamento de doenças fibróticas incluem o uso de fármacos imunossuppressores, tais como corticosteróides, outros imunossuppressores tradicionais ou agentes citotóxicos e anti-fibróticos

Há, no entanto uma necessidade no estado da técnica de novas abordagens e mais especificamente dirigida para o tratamento das doenças fibróticas.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada, pelo menos em parte, à surpreendente descoberta de que a extensão da fibrose em uma lesão induzida experimentalmente é substancialmente reduzida em camundongos deficientes de células B ou com células B farmacologicamente depletadas, indicando com isso que a depleção de células B ou a diminuição da atividade de células B em animais é um método eficaz no tratamento de doenças fibróticas.

Conseqüentemente, a presente invenção inclui métodos para o tratamento de doenças fibróticas. Os métodos da invenção compreendem a administração a um paciente com necessidade de tal tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz de antagonista de célula B.

Desde que se acredita que a fibrose ocorre por um mecanismo biomolecular semelhante independentemente dos tecidos específicos envolvidos, a presente invenção pode ser usada para tratar qualquer condição fibrótica afetando qualquer tecido de um paciente. Por exemplo, a presente invenção pode ser usada para tratar, reduzir ou retardar a fibrose de pulmão (pulmonar), rim (renal), fígado (hepática), pele, vascular, intestino e tecido

corneal. Os presentes métodos podem ser usados para tratar uma doença fibrótica resultantes de qualquer tipo de dano tecidual incluindo danos teciduais resultantes de infecções, reações auto-imunes, dano mecânico, químico, do diabetes, da hipertensão e etc. Exemplos específicos de doenças fibróticas que
5 podem ser tratadas utilizando os métodos da invenção estão descritos em outros locais deste documento.

Os métodos da presente invenção podem ser usados também para prevenir o desenvolvimento de uma doença fibrótica em um paciente com risco de desenvolver uma doença fibrótica. Os pacientes com risco para
10 desenvolver uma doença fibrótica incluem, por exemplo, pacientes que tenham sido expostos a uma ou mais condições ambientais que são conhecidas por causar ou estimular o acúmulo de tecido cicatricial nos pulmões, rins e fígado. Exemplos de condições ambientais incluem, por exemplo, exposição à fumaça, exposição à poeira, exposição ao amianto, consumo excessivo de álcool,
15 exposição à radiação, exposição à bleomicina, exposição à sílica, bactérias, vírus e etc. Pacientes com risco de desenvolver uma doença fibrótica, em certos exemplos de realização, também incluem, por exemplo, indivíduos com *diabetes*, asma crônica, lúpus, esclerodermia, artrite reumatóide, doença vascular, glaucoma, neuropatia por IgA, síndrome de Alport, bem como
20 indivíduos que tenham sido submetidos a transplante pulmonar e / ou transplante renal.

Exemplos de antagonistas de células B que podem ser utilizados na prática dos métodos da presente invenção inclui qualquer molécula ou compostos (polipeptídeo, ligante, proteínas de fusão, anticorpos, moléculas
25 pequenas, etc) que possa inibir ou debilitar o crescimento, sobrevivência, proliferação ou função das células B (incluindo a secreção de imunoglobulinas), ou que possa causar a morte ou destruição das células B. De acordo com a presente invenção o antagonista de células B pode, mas não necessariamente,

depletar as células B. Exemplos de realizações preferidas selecionadas da presente invenção incluem o uso de antagonistas de células B que resultam na diminuição de pelo menos uma parte das células B circulantes ou outras células B, através da citotoxicidade celular dependente anticorpos (ADCC),
5 citotoxicidade dependente de complemento (CDC), ou apoptose. Para os propósitos da presente descrição tais antagonistas podem ser denominados agentes depletantes de células B.

Em certos exemplos de realizações da invenção, o antagonista de célula B ou o agente depletante é um anticorpo contra um antígeno de
10 superfície da célula B. Em um exemplo de realização particular preferido, o antagonista de célula B é um anticorpo contra CD20. Um exemplo de anticorpo anti- CD20 que possa ser utilizado na prática dos métodos da invenção é o rituximab (RITUXAN®).

Em outros exemplos de realizações, da invenção, o antagonista de
15 célula B é um antagonista BAFF ou de receptores de BAFF (BR3, BCMA, ou TACI), que é expresso em células B. Aqueles hábeis na técnica apreciarão que BAFF é um potente fator de sobrevivência para células B como eles transferem células da medula óssea para o baço durante os quais células B auto-reativas são particularmente susceptíveis a se tornarem patogênicas. Assim, utilizando um
20 antagonista BAFF para interromper as interações entre BAFF e BR pode infrarregular, interferir com, ou inibir a geração de células B potencialmente auto-reativas. A este respeito, antagonistas úteis podem incluir anticorpos anti-BAFF (como o belimumab), anticorpos anti-BR, moléculas pequenas que interagem com BAFF ou BR, ligantes baseados em antagonistas de polipeptídeo. Em exemplos de
25 realizações preferidas o antagonista de BAFF é uma molécula solúvel compreendendo a totalidade ou parte dos receptores BAFF ligados a uma região constante da imunoglobulina. Exemplos específicos de polipeptídeos antagonistas de BAFF são discutidos com mais detalhes a baixo.

A presente invenção inclui ainda métodos que constam da administração de múltiplos antagonistas de células B. Por exemplo, em determinados exemplos de realizações, um anticorpo contra CD20 (por exemplo, o rituximab) é administrado a um paciente, juntamente com um antagonista de BAFF.

A invenção inclui também métodos que compreende a administração de um ou mais antagonistas de células B e um ou mais agentes adicionais que são úteis no tratamento de uma ou mais doenças fibróticas. Por exemplo, a presente invenção também abrange métodos que compreende da administração de um ou mais antagonistas de células B e um ou mais antagonistas de receptores de integrina. Como aqueles conhecedores da técnica apreciarão antagonistas de receptores de integrina podem incluir peptídeos, anticorpos, ligantes solúveis ou moléculas pequenas que inibem a função da integrina ou receptores de integrina, por exemplo, anticorpos contra $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ (VLA - 4), $\alpha_4\beta_7$; etc. Um anticorpo exemplar que se liga especificamente ao receptor de integrina $\alpha_4\beta_1$ e que pode ser usado em combinação com um antagonista de célula B para o tratamento de uma doença fibrótica no contexto da presente invenção é o natalizumab (Tysabri®).

A presente invenção também abrange métodos que compreende a administração de um ou mais antagonistas de células B e um ou mais inibidor da via do TGF- β , tais como, por exemplo, um antagonista do ligante de TGF- β ou um antagonista de receptor de TGF- β (por exemplo, anticorpos monoclonais, proteína de fusão solúvel TGF- β RII-Fc, proteína de fusão LAP-Fc, inibidores de quinase do TGF- β RI ou RII, inibidores de moléculas pequenas, etc).

O técnico qualificado será capaz de identificar rapidamente outros agentes anti-fibróticos que sejam compatíveis com os ensinamentos do presente.

Outros objetos, características e vantagens da presente invenção serão evidentes para os técnicos hábeis no assunto pelas informações da descrição detalhada dos seguintes exemplos de incorporação preferidos do presente.

5

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIG. 1A exibe a população de células B no baço, cavidade peritoneal (PC) e fígado de um camundongo adulto. Os linfócitos foram isolados e corados com anti-IgD (eixo-X) e anti-IgM (eixo-Y). Porcentagens de células IgM⁺, IgD⁺ entre os linfócitos estão demonstrados nos gráficos. A FIG. 1B exibe os níveis de expressão de CD21, CD23 e CD5 em células B isoladas do baço, sangue, PC e fígado. A FIG. 1C exibe a quantidade de Anexina V vinculada às células B hepáticas e células B - esplênicas. A FIG. 1D exibe o grau de proliferação de células B intrahepática e células B esplênicas e a supregulação (*upregulation*) de CFSE e CD86 (B7.2), em resposta as vários estímulos.

15

A FIG. 2A exibe o grau de lesão hepática, avaliada pela libertação da enzima ALT específica de hepatócitos no soro 24 horas após uma única dose de CCl₄, em camundongos deficientes de célula B (J_H ^{-/-}) e em camundongo tipo selvagem (BALB/c). A FIG. 2B exibe a análise histológica do tecido hepático corado com o corante específico para colágeno "*Sirius Red*" em camundongos com deficiência de células B (J_H ^{-/-}) e em camundongo tipo selvagem (BALB/c) uma semana após a sexta dose semanal de um dos dois; óleo (Controle) ou CCl₄. As FIGS. 2C e 2D exibem a quantificação de colágeno pela coloração específica por "*Sirius Red*" (em unidades arbitrárias) em três experimentos representativos. Os experimentos 1 e 2 (FIG. 2C) exibem a extensão da deposição de colágeno intersticial uma semana após a sexta dose semanal de 3,5 mg/kg de CCl₄, e o experimento 3 (FIG. 2D) mostra o grau de deposição intersticial de colágeno uma semana após a sexta dose semanal de 1,75 mg/kg de CCl₄. A coluna de pontos representa uma série de secções de

25

um animal. Os valores médios são exibidos em barras.

A FIG. 3 exibe a análise histológica das secções de fígado de camundongos deficientes de célula B ($J_H^{-/-}$) e camundongos tipo selvagem (BALB /c), 1, 3 e 5 dias após uma única prova de provocação com CCl_4 . As secções foram submetidas à coloração de TUNEL específica para apoptose (duas primeiras linhas), coloração para actina de músculo liso (α -SMA) (duas linhas médias), ou coloração F4/80 específicas para macrófago (duas linhas inferiores).

A FIG. 4A exibe a análise histológica da deposição de colágeno no tecido hepático de camundongos com ausência de células B e células T ($RAG2^{-/-}$) e camundongos tipo selvagem após o tratamento com CCl_4 a longo prazo. A FIG. 4B exibe a quantificação da deposição de colágeno intersticial no fígado de camundongos $RAG2^{-/-}$ e camundongos tipo selvagem após o tratamento com CCl_4 a longo prazo.

A FIG. 5A exibe a quantificação da deposição de colágeno intersticial no tecido hepático em camundongos expressando a proteína LMP2a derivado do vírus Epstein-Barr e de camundongos tipo selvagem após o tratamento de 6 semanas com 1,75 mg/kg de CCl_4 . A FIG 5B exibe a quantificação da deposição de colágeno intersticial no tecido hepático em camundongos mlgM tg expressando Ig de superfície e camundongos do tipo selvagem após 6 semanas de tratamento com 1,75 mg/kg de CCl_4 .

A FIG. 6 exibe o percentual de actina de músculo liso em camundongos de tipo selvagem "B6BWT" (C57BL/6J) e de camundongos deficientes de células B "B6BKO" ($B6.129S2-Igh-6^{tm1Cgn}/J$) após 28 dias de uma das administrações de 60 mg/kg/7d ou 100 mg/kg/7d de bleomicina.

A FIG. 7 exibe a análise imuno-histoquímica do tecido pulmonar de camundongos do tipo selvagens (C57BL/6J) e de camundongos deficientes de células B ($B6.129S2-Igh-6^{tm1Cgn}/J$) após 28 dias de qualquer uma das

administrações de 100 mg/kg/7d de bleomicina ou de salina.

A FIG. 8 exibe o percentual de sobrevivência de camundongos do tipo selvagem (C57BL/6J, quadrados cheios) e de camundongos deficientes de células B (B6.129S2-*Igh*-6^{tm1Cgn}/J, quadrados abertos) após a administração de 100 mg/kg/7d de bleomicina ao longo de 28 dias.

As FIGs. 9A, 9B, 9C e 9D exibem o percentual de α - actina de músculo liso (FIG. 9A), fibrose intersticial (FIG. 9B), túbulos dilatados (FIG. 9C) e túbulos saudáveis (FIG. 9D) em camundongos do tipo selvagem "B6Bwt" (C57BL/6J) e de camundongos deficientes de células B (B6.129S2-*Igh*-6^{tm1Cgn}/J) submetidos a obstrução ureteral unilateral (Op) ou não operado (Unop).

A FIG. 10 exibe a análise histológica do tecido renal corado por tricrômio de Masson obtido a partir de camundongos tipo selvagem (C57BL/6J) e de camundongos deficientes de células B (B6.129S2-*Igh*-6^{tm1Cgn}/J) submetidos a obstrução ureteral unilateral (*Operated*) ou não operado.

A FIG. 11 exibe a contagem de células B nos pulmões nos camundongos tratados, sem bleomicina (controle), com bleomicina e com bleomicina mais anticorpo monoclonal anti-CD20.

A FIG. 12 exibe a contagem de células B esplênicas nos camundongos tratados, sem bleomicina (controle), com bleomicina e com bleomicina mais anticorpo monoclonal anti-CD20.

A FIG. 13 exibe a análise por citometria de fluxo de células B isoladas de pulmões de camundongos não tratados, ou de camundongos 9 dias após a instilação de bleomicina e tratados com um anticorpo anti-CD20 depletor de célula B, ou PBS.

A FIG. 14 exibe a quantificação da imuno-coloração de α - actina de músculo liso no tecido hepático de camundongos tratados com um anticorpo anti-CD20 depletor de células B, um anticorpo controle isotipo ou PBS, após 6 semanas de tratamento com 1,75 mg/kg de CCl₄. Losangos, quadrados,

triângulos e círculos representam os resultados obtidos para cada um dos camundongos tratados como indicado.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a métodos de tratamento para
5 atenuar, reduzir ou prevenir a fibrose ou doenças fibróticas. Os métodos da invenção compreendem em administrar a um paciente com necessidade de tal tratamento uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de célula B.

A expressão "doença fibrótica", conforme utilizado no presente documento refere-se a qualquer condição na qual o material do tecido fibrótico,
10 tecido cicatricial, tecido conjuntivo, e/ou matriz extracelular (ECM) se acumule sobre ou dentro de um ou mais órgãos do corpo em resposta a uma lesão nestes tecidos (por exemplo, infecção, reação auto-imune, lesões mecânicas, lesão químicas, *diabetes*, hipertensão, etc.) Conforme utilizado neste documento, a expressão "condições de fibrose" e a expressão "doenças
15 fibróticas" pretende ter o mesmo significado.

Exemplos de doenças fibróticas incluem, mas não estão limitados a:

(I) Doenças associadas com fibrose, por exemplo, fibrose pulmonar idiopática, fibrose induzida por radiação, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), esclerodermia, fibrose pulmonar induzida por bleomicina,
20 asma crônica, silicose, fibrose pulmonar induzida por amianto, lesão pulmonar aguda e desconforto respiratório agudo (incluindo a pneumonia induzida por bactérias, pneumonias induzidas por trauma, induzidas por vírus, induzidas por ventilação, induzida por sepse não-pulmonar, e induzida por aspiração);

(II) Nefropatias crônicas associada com lesões/fibrose (fibrose renal), por exemplo, lúpus, diabetes, esclerodermia, nefrite glomerular,
25 esclerose glomerular focal segmentar, nefropatia por IgA, hipertensão, transplante, lúpus e Alport;

(III) Fibrose intestinal, por exemplo, esclerodermia, e fibrose

intestinal induzida por radiação.

(IV) Fibrose hepática, por exemplo, cirrose, fibrose hepática induzida pelo álcool, esteatohepatite não alcoólica (NASH), lesão do ducto biliar, cirrose biliar primária, fibrose hepática induzidas por infecções virais (por exemplo, infecção crônica por HCV), e hepatite auto-imune;

(V) Fibrose de cabeça e pescoço, por exemplo, induzida por radiação;

(VI) Cicatriz corneal, por exemplo, LASIX, transplante de córnea, e trabeculotomia;

(VII) Cicatriz hipertrófica e quelóides, por exemplo, induzidas por queimaduras e cirurgias; e

(VIII) Outras doenças fibróticas, por exemplo, sarcoidose, esclerodermia, fibrose/lesões da medula espinhal, mielofibrose, reestenose vascular, aterosclerose, granulomatose de Wegener, doença mista do tecido conjuntivo e doença de Peyronie.

A expressão "um paciente que necessite de tal tratamento", conforme usado neste documento designa um humano ou animal não humano que necessita de tratamento para uma ou mais doença fibrótica como, por exemplo, qualquer uma das doenças fibróticas enumeradas acima. Um "um paciente que necessita de tal tratamento", pode ser um humano ou animal não-humano que possui acúmulo de material de tecido fibrótico, tecido cicatricial, e/ou matriz extracelular (por exemplo, colágeno, vimentina, actina, etc) sobre ou no interior de um ou mais órgãos do corpo. Um "um paciente que necessite de tal tratamento" pode ser, mas não necessariamente, um humano ou animal não-humano que recebeu o diagnóstico clínico de uma ou mais doença fibrótica. Um "um paciente que necessita de tal tratamento" pode ser um humano ou animal não-humano que apresenta um ou mais sintomas de fibrose. (Khalil e O'Connor, *Canadian Medical Journal* 171:153-160 (2004)). Por

exemplo, um "um paciente que necessita de tal tratamento" pode ser um humano ou animal não-humano que apresenta um ou mais sintomas de: uma doença fibrótica do fígado (por exemplo, causada por lesão ou cicatrização tecidual hepática, por exemplo, hepatites virais, abuso de álcool, drogas, 5 doenças metabólicas devido à sobrecarga de ferro ou cobre, ataque auto-imune dos hepatócitos ou do epitélio do ducto biliar, ou anomalias congênitas) (Friedman, *Biol. Chem.* 275:2247-2250 (2000)); uma doença fibrótica no pulmão (por exemplo, lesões ou cicatriz no tecido pulmonar causada por, ou relacionada a, uma resposta inflamatória no pulmão em resposta à um evento, 10 incluindo, por exemplo, pneumonia intersticial idiopática) (Garantziotis *et al.*, *J. Clin. Invest.* 114:319 -321 (2004)); esclerodermia da pele ou de outro(s) órgão(s) (Trojanowska, *Frontiers Biosci.* 7:d608-618 (2002); e/ou uma doença fibrótica do rim (por exemplo, lesão ou cicatrização no tecido renal relacionado à glomerulosclerose ou fibrose intersticial tubular) (Negri, *J. Nephrol.* 77:496- 15 503 (2004)).

De acordo com certos exemplos de realizações, "um paciente que necessita de tal tratamento" não tem e/ou não possui risco de ter uma doença auto-imune. Por exemplo, um "um paciente que necessita de tal tratamento" pode ser, mas não é necessariamente, um paciente que não 20 recebeu o diagnóstico clínico de uma ou mais doenças auto-imunes. Um "paciente que necessita de tal tratamento" pode ser, mas não é necessariamente, um paciente que não apresenta um ou mais sintomas de uma ou mais doenças auto-imunes. Conforme utilizado neste documento, a expressão "doença auto-imune" é uma doença ou disfunção não-maligna 25 decorrente e dirigida contra um antígeno e/ou tecido próprio do indivíduo. (Vide, por exemplo, a publicação do pedido de Patente US 2005/0095243). Deste modo, em certos exemplos de realização da presente invenção, um "paciente que necessite de tal tratamento" é um paciente que não tenha recebido um

diagnóstico clínico de, ou que não apresenta um ou mais sintomas de uma ou mais das seguintes doenças auto-imunes: Artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, lúpus eritematoso sistêmico (LES), doença de Wegener, doença intestinal, inflamatória, púrpura trombocitopênica idiopática (ITP), púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), trombocitopênia auto-imune, esclerose múltipla, psoríase, nefropatia por IgA, polineuropatia por IgM, miastenia grave, vasculite, pacientes com *diabetes mellitus*, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjörger ou glomerulonefrite.

Animais não humanos incluem, por exemplo, animais domésticos e de criação, bem como animais de zoológico, animais de esporte e animais de estimação (por exemplo, gatos, cães, cavalos, vacas, etc).

A expressão "quantidade terapeuticamente eficaz", conforme usado no presente documento designa uma quantidade de antagonista ou antagonista de célula B, que é eficaz para prevenir, atenuar, ou melhorar o tratamento dos sintomas da doença fibrótica em questão. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de célula B, como utilizada no presente, pode ser uma quantidade de antagonista de célula B suficiente para levar a uma diminuição em um ou mais marcadores de uma doença fibrótica. Exemplos de marcadores de doença fibrótica incluem, por exemplo, deposição de colágeno, deposição de α -actina de músculo liso, etc. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de antagonista de células B em certos exemplos de realização da presente invenção, é uma quantidade de antagonista de célula B suficiente para causar uma diminuição de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35 %, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, ou 100% na deposição de colágeno em relação ao nível de deposição de colágeno observado antes da administração do antagonista de célula B. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de antagonista de células B em outros exemplos de realização da presente invenção, é uma quantidade de

antagonista de célula B suficiente para causar uma diminuição de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, ou 100% na deposição de α -actina de músculo liso em relação à deposição de α -actina de músculo liso observada antes da
5 administração do antagonista de célula B. Ainda em outros exemplos de realização da presente invenção, uma quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade de antagonista de célula B suficiente para causar uma melhora de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40 %, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, ou 100% na função dos órgãos (por exemplo,
10 função hepática, função pulmonar, função renal) em relação ao função do órgão observados antes da administração do antagonista de célula B.

ANTAGONISTAS OU AGENTES DEPLETORES DE CÉLULAS B

A expressão "antagonista de células B", conforme utilizado no presente documento designa qualquer material ou agente capaz de inibir,
15 afetar, retardar, melhorar ou infraregular o crescimento, sobrevivência, multiplicação ou função das células B (por exemplo, através da redução ou prevenção da resposta humoral pela célula B), ou que causem a morte ou destruição na totalidade ou em parte de uma população de células B. No caso deste último, tal antagonista de célula B pode ser denominado agente depletor
20 de células B. Antagonistas de célula B pode ser peptídeos de sequência nativa ou sintética e moléculas pequenas que se ligam ou interagem com o antígeno de superfície da célula B ou interagem com moléculas de sinalização intracelular para inibir a função celular da célula B. Em alguns exemplos de reivindicações, o antagonista de célula B pode ser fundido ou conjugado com
25 um agente citotóxico. De acordo com outros exemplos de realização da invenção, o antagonista de célula B é uma proteína de fusão (por exemplo, BR-Fc) ou anticorpos, por exemplo, um anticorpo contra um ou mais antígenos da superfície da célula B.

Conforme mencionado acima, o antagonista de célula B pode ser um agente que depleta células B sob ou após a administração do antagonista de célula B ao paciente. Por exemplo, o antagonista de célula B pode causar uma depleção de 2% a 100% de células B em 24 a 100 horas após a
 5 administração do antagonista de célula B.

Por exemplo, o antagonista de célula B pode causar uma depleção de 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, 24%, 26%, 28%, 30%, 32%, 34%, 36%, 38%, 40%, 42%, 44%, 46%, 48%, 50%, 52%, 54%, 56%, 58%, 60%, 62%, 64%, 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 76%,
 10 78%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, ou 100% de células B periféricas dentro de 24 horas da administração do antagonista de célula B (Por exemplo, como estabelecido na patente US 6.399.061).

Alternativamente, o antagonista de células B pode causar uma depleção de 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, 24%, 26%,
 15 28%, 30%, 32%, 34%, 36%, 38%, 40%, 42%, 44%, 46%, 48%, 50%, 52%, 54%, 56%, 58%, 60%, 62%, 64%, 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, ou 100% de células B periféricas dentro de 48 horas da administração do antagonista de célula B.

Ainda em outro exemplo de realização, o antagonista de células B
 20 pode causar uma depleção de 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, 24%, 26%, 28%, 30%, 32%, 34%, 36%, 38%, 40%, 42%, 44%, 46%, 48%, 50%, 52%, 54%, 56%, 58%, 60%, 62%, 64%, 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, ou 100% de células B periféricas dentro de 72 horas da administração do
 25 antagonista de célula B. A capacidade dos antagonistas ou agentes depletadores de célula B para tratar doenças fibróticas podem ser avaliados utilizando um ou mais modelos de fibrose in vitro ou in vivo. Exemplos de modelos experimentais de fibrose incluem, por exemplo, modelos de fibrose induzido por

trauma (por exemplo, traumas cirúrgicos ou transplante de órgão, queimaduras, oclusão do ducto biliar, obstrução ureteral unilateral, isquemia e reperfusão, lesão pulmonar induzida por ventilação, lesões vasculares induzidas por balão, nefrectomia, irradiação, fistula aorto-caval traumática, e ritmo ventricular rápido); modelos de fibrose induzidas por toxina ou droga (por exemplo, bleomicina, amianto, sílica, ovalbumina, acetaldeído, tetracloreto de carbono, concanavalina A, cloreto de vinil, trinitrobenzeno sulfônico; oxazolona, ciclosporina A, Sulfato de níquel, e ceruleína); modelos de fibrose por doenças auto-imunes ou mediada pelo mau funcionamento do sistema imune (por exemplo, modelos de doenças por anticorpos ou imuno-complexos, rejeição do transplante, modelo de camundongo "*tight skin*", lesão por isquemia e reperfusão, induzida pela lesão enxerto versus hospedeiro, artrite reumatóide); modelos de fibrose induzida por doença infecciosa crônica (espécies de *Schistosoma* ou hepatites virais crônica, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi*); e modelos de camundongos geneticamente modificados ou modelos de camundongos com infecções virais. (Por exemplo, camundongos transgênicos e *knockout* para fator de crescimento transformador β (TGF- β) ou receptores de TGF- β , camundongos deficientes de moléculas de sinalização (por exemplo, camundongos com deficiência de SMAD-3 (*mothers-against-decapentaplegic-homologue-3*), camundongos deficientes de Col4A3 (Alport), camundongos com deficiência de moléculas que afetam a ativação do TGF- β (por exemplo, integrina- α 1 ou matriz metaloproteinase-9), e camundongos transgênicos com genes de citocinas, infectados por vírus e camundongos *knockout* (por exemplo, Fator de necrose tumoral, interleucina-4 (IL-4), IL-13 ou IL-10)). (Wynn, *Nature Reviews* 4:583-594). Antagonistas de célula B da invenção incluem, por exemplo, antagonistas de célula B que demonstram melhor os sintomas da fibrose ou reduzem, retardam, prejudicar e/ou diminuem o grau da lesão fibrótica ou reduzem um ou

mais marcadores da lesão fibrótica. A análise de um agente, incluindo um antagonista de célula B, pela sua capacidade de melhorar os sintomas da fibrose ou por reduzir a extensão da lesão fibrótica, em qualquer um dos modelos, de fibrose acima mencionados está dentro das habilidades e conhecimento dos técnicos hábeis no assunto.

ANTICORPOS

Os antagonistas ou agentes depletors de célula B da invenção podem ser um anticorpo. A expressão "anticorpo", como usado neste documento, inclui, por exemplo, anticorpos nativos, anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos, dois anticorpos intactos, fragmentos de anticorpos (por exemplo, fragmentos de anticorpos que se ligam e/ou reconhecem um ou mais antígenos), outros anticorpos construídos multivalentes, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos (Jakobovits *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits *et al*, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); Patente US 5.591.669 e 5.545.807), anticorpos e fragmentos de anticorpos isolados de bibliotecas de fagos (McCafferty *et al*, *Nature* 348:552-554 (1990); Clackson *et al*, *Nature* 352:624-628 (1991); Marks *et al*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991); Marks *et al*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Waterhouse *et al*, *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1993)). Métodos para a produção e utilização dos anticorpos são bem conhecidos no estado da técnica. (Vide, por exemplo, o documento WO 00/67796 e as referências aí citadas).

Dois anticorpos que são particularmente úteis como antagonista ou agente depletor de célula B em conjunto com a presente invenção é o rituximab, que é um anticorpo quimérico murino/humano, e o 2H7, um anticorpo murino humanizado contendo CDRs murino. O Rituximab está divulgado na

patente US 6.399.061 enquanto o 2H7 e variantes destes estão divulgadas no documento WO 04/056312. Cada um destes documentos está incorporado ao presente documento pela referência na sua totalidade.

Outros anticorpos anti-CD20 que são compatíveis com os ensinamentos no presente inclui o anticorpo murino 2B8 marcado por ítrio [90] denominado "Y2B8" ou "Ibritumomab Tiuxetan" ZEVALIN® disponível comercialmente pela Biogen-Idec (vide também patente US 5.736.137, incorporada ao presente pela referência); IgG2a "B1" murino, também denominado "Tositumomab", marcado, opcionalmente com I¹³¹ para gerar o anticorpo "I¹³¹-B138 (iodo I¹³¹ BEXXAR®) (Patente US 5.595.721, expressamente incorporada ao presente como referência); anticorpo monoclonal murino "1F5" (Press *et al.*, *Blood* 69 (2):584-591 (1987) e variantes deste incluindo anticorpos com "estrutura remendada" (*framework patched*) ou anticorpo 1F5 humanizado (documento WO 03/002607);, depósito ATCC HB-96450); HuMax-CD20TM (um anticorpo IgG1 inteiramente humano, patente pedido de patente US 2004/167319; documento WO04/035607, Genmab, Dinamarca); AME-133 (uma anticorpo CDR otimizado enxertado, Pedido de Patente US 2005/025764 e documento WO04/103404, *Applied Molecular Evolution*); HumaLymTM (um anticorpo humano completo, Intracel); e hA20 (um anticorpo IgG1 humanizado, Pedido de Patente US 2003/0219433; documento WO 00/74718, Immunomedics); e anticorpos monoclonais L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 ou NU-B2 disponíveis pela *International Leukocyte Typing Workshop* (Valentine *et al.*, em: *Leukocyte Typing III*) (McMichael, Ed., pág. 440, Oxford University Press (1987)).

A expressão "Fragmentos de anticorpos" compreende uma porção de anticorpo intacto, geralmente contendo a ligação de antígeno ou região variável deste. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, fragmentos de Fv, fragmentos Fv de cadeia única (scFv),

anticorpos com domínios deletados, diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpos de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticorpos.

A expressão "Anticorpos nativos" como utilizado no presente é
5 utilizado para designar glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 D, compostas de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto covalente, enquanto a quantidade de ligações dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isótopos de imunoglobulina. Cada cadeia
10 leve e pesada também contém pontes dissulfeto intracadeias regularmente espaçadas. Cada cadeia pesada contém, em uma extremidade, um domínio variável (V_H) seguido por uma série de domínios constantes. Cada cadeia leve contém um domínio variável em uma extremidade (V_L) e um domínio constante na sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve é alinhado ao
15 primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve é alinhado ao domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formam uma superfície intermediária entre os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada.

A expressão "variável" indica o fato de que certas porções dos
20 domínios variáveis diferem extensamente na seqüência entre os anticorpos e são utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo específico ao seu antígeno específico. A variabilidade não é, entretanto, distribuída regularmente ao longo dos domínios variáveis de anticorpos. Tal variabilidade é concentrada em três segmentos denominados regiões hipervariáveis, tanto nos domínios
25 variáveis de cadeia leve quanto de cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são denominadas regiões de estrutura (FRs). Os domínios variáveis de cadeias leve e pesada nativas compreendem quatro FRs cada um, adotando em grande parte uma configuração folha- β ,

conectadas por três regiões hipervariáveis, que formam alças que conectam e, em alguns casos, fazem parte da estrutura folha- β . As regiões hipervariáveis de cada cadeia são mantidas unidas em boa proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de
 5 ligação de antígenos de anticorpos (vide Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos). (1991)). Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem diversas funções efectoras, tais como a participação do anticorpo em
 10 citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

A digestão de anticorpos por papaína produz dois fragmentos de ligação de antígenos idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada qual com um único sítio de ligação de antígenos, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete a sua capacidade de rápida cristalização. O tratamento com
 15 pepsina gera um fragmento $F(ab')_2$ que contém dois sítios de ligação de antígenos e ainda é capaz de reticular o antígeno.

"Fv" é o menor fragmento de anticorpo, que contém um sítio completo de reconhecimento e de ligação de antígenos. Esta região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e em um de cadeia
 20 leve em forte associação não-covalente. É nesta configuração que as três regiões hipervariáveis de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação de antígenos sobre a superfície do dímero V_H-V_L . Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação de antígenos ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável isolado (ou a metade de um
 25 Fv que compreende apenas três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) possui a capacidade de reconhecer e se ligar ao antígeno, embora em afinidade mais baixa que o sítio de ligação completo.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia

leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos no carboxi-terminal do domínio CH1 de cadeia pesada, que inclui uma ou mais cisteínas da região de articulação do anticorpo. Fab'-SH é a denominação do presente para Fab', em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes contém(êm) pelo menos um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpos F(ab')₂ foram originalmente produzidos na forma de pares de fragmentos de Fab' que contêm cisteínas de articulação entre tais fragmentos. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos também são conhecidos.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um dentre dois tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) e lambda (λ), com base nas seqüências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

Dependendo da seqüência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, anticorpos podem ser atribuídos a classes diferentes. Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias delas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às classes diferentes de anticorpos são denominados α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente. As estruturas de subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

A expressão, fragmentos de anticorpos "Fv de cadeia única" ou "scFv" como utilizado no presente pretende designar fragmentos de anticorpos que compreendem os domínios V_H e V_L do anticorpo, em que esses domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídeos. Preferencialmente, o polipeptídeo Fv compreende adicionalmente de um ligante de polipeptídeo entre os domínios V_H e V_L que permite que o scFv forme a estrutura desejada

para se ligar aos antígenos. (Plückthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova Iorque, Estados Unidos, págs. 269-315 (1994)).

A expressão "diacoros" como utilizado no presente, refere-se a
5 pequenos fragmentos de anticorpos com dois sítios de ligação de antígenos, que compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) na mesma cadeia de polipeptídeo (V_H - V_L). Utilizando um ligante que é curto demais para permitir o pareamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, os domínios são obrigados a parear-se
10 com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígenos (Patente EP 404.097; Documento WO 93/11161, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)).

Anticorpos policlonais incluem anticorpos que são preferencialmente, elevados em animais por meio de múltiplas injeções
15 subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antígeno relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno relevante a uma proteína que seja imunogênica na espécie a ser imunizada, por exemplo, hemocianina do molusco *keyhole limpet*, albumina de soro, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja, utilizando um agente bifuncional ou derivatizante, por exemplo,
20 maleimidobenzoiléster sufossuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, onde R e R^1 são grupos alquila diferentes.

Para produzir os anticorpos policlonais, os animais são
25 imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos ou derivados por meio de combinação, por exemplo, de 100 μg ou 5 μg da proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injeção da solução de forma intradérmica em diversos

locais. Após um mês, os animais são estimulados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de peptídeo ou conjugado em adjuvante completo de Freund, por meio de injeção subcutânea em diversos locais. Após 7 a 14 dias, os animais são sangrados e o soro é analisado para a titulação de anticorpos.

- 5 Os animais são estimulados até atingir o platô do título. Preferencialmente, o animal é estimulado com o conjugado do mesmo antígeno, mas conjugado a uma proteína diferente e/ou através de um reagente reticulante diferente. Os conjugados podem também ser feitos em cultura de células recombinantes na forma de fusões de proteínas. Além disso, agentes agregantes, tais como o
- 10 alúmen (sulfato de alumínio), são adequadamente utilizados para amplificar a resposta imune.

A expressão “anticorpo monoclonal”, da forma como utilizado no presente, designa um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, por exemplo, cada anticorpo individual que

15 compreendem a população é idêntico e/ou se liga ao mesmo epítopo, exceto por possíveis variantes que surgem durante a produção do anticorpo monoclonal, em que tais variantes estão, geralmente, presentes em quantidades menores. Ao contrário das preparações de anticorpos policlonais que incluem tipicamente diferentes anticorpos direcionados contra diferentes

20 determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno. Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos por não serem contaminados por outras imunoglobulinas. O adjetivo “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente

25 homogênea, e não deve ser interpretada como requerida a produção de anticorpos por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser preparados por meio do método de hibridoma descrito primeiramente por

Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser fabricados por meio de métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, Patente US 4.816.567). Os “anticorpos monoclonais” podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos, utilizando as técnicas descritas, por exemplo, em
5 Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

A expressão “anticorpos monoclonais” como utilizado no presente inclui especificamente anticorpos “quiméricos” (imunoglobulinas), em que uma porção da cadeia leve e/ou pesada é idêntica ou homóloga a seqüências
10 correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica, ou pertencentes a uma classe ou subclasse específica de anticorpos, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a seqüências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde que
15 exibam a atividade biológica desejada (Patente US 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Os anticorpos quiméricos de interesse no presente incluem anticorpos “primatizados”, que compreendem seqüências de ligação de antígenos de domínio variável derivadas de primatas não-humanos (por exemplo, Macaco do Velho Mundo, tal como babuíno,
20 rhesus ou macaco cinomolgo) e seqüências de região constante humana (Patente US 5.693.780).

Como utilizado no presente, formas “humanizadas” de anticorpos não-humanos (por exemplo, murinos) são anticorpos quiméricos que contêm uma seqüência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Na maior
25 parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor), nas quais os resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não-humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não-

humano que possui a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região estrutural (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentro pelo menos um e, tipicamente, dois domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as alças hipervariáveis correspondem aos de uma imunoglobulina não-humana e todas ou substancialmente todas as FRs são as de uma sequência de imunoglobulina humana, exceto pela(s) substituição(ões) de FR indicada(s) acima. O anticorpo humanizado também compreenderá, opcionalmente, pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. (Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992); Documento WO 00/67796).

A expressão "região hipervariável", quando utilizada no presente, designa os resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação de antígenos. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos de uma "região de determinação de complementaridade" ou "CDR" (por exemplo, resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos. (1991)) e/ou os resíduos de uma "alça hipervariável" (por exemplo, os resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917

(1987)). Resíduos de "estrutura" ou "FR" são os resíduos de domínios variáveis diferentes dos resíduos de região hipervariável, conforme definido no presente.

ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE DA CÉLULA B

Em certos exemplos de realização da invenção, os antagonistas de célula B são anticorpos contra um antígeno de superfície da célula B. Conforme utilizado neste documento, a expressão "antígeno de superfície de células B" no presente refere-se a qualquer antígeno expresso na superfície da célula B, em alguns exemplos de realização da invenção, o "antígeno de superfície de células B" é um antígeno que é expresso na superfície das células B em indivíduos saudáveis. Em outros exemplos de realização, o "antígeno de superfície de células B" é um antígeno que é expresso na superfície das células B de pessoas que sofrem de uma doença. Ainda em outros exemplos de realização o "antígeno de superfície de células B" é um antígeno que é expresso na superfície das células B tanto em indivíduos saudáveis quanto em indivíduos que sofrem de uma doença. De acordo com alguns exemplos de realização da invenção, o antígeno de superfície de células B é expresso em células B a uma maior escala (por exemplo, 2x maior, 3x maior, 4x maior, 5x maior, 10x maior, 100x maior, ou mais) do que em células não B. Alternativamente, o antígeno de superfície de células B, de acordo com certos exemplos de realização, pode ser expresso em células B na mesma medida ou em menor escala do que em células não B. Certos antígenos de superfície de células B podem ser expressos constitutivamente sobre células não B e/ou expressa em células B ativadas. Em determinados exemplos de realização da invenção, o antígeno de superfície da célula B está expresso apenas nas células B.

Exemplos de marcadores de células B incluem os marcadores de superfície de leucócitos CD 10, CD 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD52, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77,

CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 e CD86. Outros marcadores de superfície de células B incluem receptores "Toll Like" (por exemplo, "TLR-7 e TLR-9) receptores de quimiocinas (por exemplo, CXCR3) e APRIL (Medema *et al*, *Cell Death Differ.* 70:1121-1125 (2003)) Os

5 receptores BAFF (BAFFR/BR3, BCMA e TACI) podem também ser considerados antígenos de superfície de célula B para os propósitos da presente divulgação.

De acordo com certos exemplos de realização da invenção, o antígeno de superfície da célula B é CD19. O antígeno "CD19" refere-se a um

10 antígeno de ~ 90kDa identificado, por exemplo, como HD237-CD19 ou anticorpo B4 (Kiesel *et al* - *Leukemia Research II* 12:1119 (1987)). O CD 19 é encontrado na diferenciação de todas as linhagens de células tronco a partir da fase até um ponto pouco antes da diferenciação terminal em células plasmáticas. Ligação do antígeno de superfície da célula B ao antígeno CD 19

15 pode causar internalização do antígeno CD 19.

O antagonista de célula B pode ser, por exemplo, o Lym-1, um anticorpo IgG2a que reconhece células B; B2, um anticorpo direcionado contra o antígeno CD21; B3, um anticorpo dirigido contra o antígeno CD22; ou J5, um anticorpo dirigido contra o antígeno CD10 (Patente US 5.843.398). Anticorpos

20 anti-CD22 que são úteis como antagonistas de células B no contexto da presente invenção estão descritos, por exemplo, nas patentes US 5.484.892, US 5.789.557, US 5.789.554, documento WO 98/42378, documento WO 00/20864, documento WO 98/41641, e em Campana, D. *et al.*, *J. Immunol.* 134:1524 (1985), Dorken *et al.*, *J. Immunol.* 150:4719 (1993) e Engel *et al.*, *J.*

25 *Immunol.* 150:4519 (1993). Neste aspecto, o anticorpo anti-CD22 epratuzumab é particularmente útil na presente invenção.

Exemplos adicionais de anticorpos CD22 que possam ser utilizados como antagonistas de células B no contexto da presente invenção

estão descritos, por exemplo, nas Patentes US 5.484.892, US 5.789.557, US 6.846.476, e nos documentos WO 98/42378, WO 00/20864, e WO 98/41641.

De acordo com certos exemplos de realização da invenção, o antígeno de superfície de célula B é CD23. CD23 é um receptor para IgE de baixa afinidade. CD23 é conhecido por regular a adesão celular mediada por IgE e liberação de histamina, inibição da apoptose em células B e regulação do crescimento de células mielóides. Vide, por exemplo, Conrad, *Annu Rev Immunol* 5:623-645 (1990); Delespesse *et al Adv. Immunol.* 49:149-191 (1991); Bonnefoy *et al., Curr Opin Immunol* 5:944-947 (1993). Anticorpos específicos para CD23 e seu uso são discutidos em, por exemplo, Rector *et al. Immunol.* 55:481-488 (1985); Suemura *et al., J. Immunol.* 137:1214-1220 (1986); Noro *et al., J. Immunol* 737:1258-1263 (1986); Bonnefoy *et al. J. Immunol* 138:2970-2978 (1987); Flores-Romo *et al. Science* 2(57:1038-1046 (1993); Sherr *et al. J. Immunol.* 742:481-489 (1989); Pene *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 55:6880-6884 (1988); e Bonnefoy *et al.* (documento WO87/07302); Bonnefoy *et al.* (documento W096/12741)); Bonnefoy *et al. Eur. J. Immunol.* 20:139-144 (1990); Sarfati *et al. J. Immunol.* 141:2195-2199 (1988) e Wakai *et al. Hybridoma* 12:25-43 (1993); Vide, também as Patentes US 7.008.623, US 6.893.638 e US 6.011.138.

De acordo com certos exemplos de realização da invenção, o antígeno de superfície de célula B é CD80. O CD80 (também conhecido como "B7.1") revelou-se crucial na geração de respostas imune. (Azuma *et al., J. Exp. Med.* 777:845-850 (1993); Freeman *et al., J. Immunol.* 143:2714-2722 (1989); Hathcock *et al, Science* 262:905-911 (1993); Hart *et al, Immunol.* 79:616-620 (1993)). Anticorpos específicos para CD80 foram descritos, incluindo, por exemplo, um anticorpo IgG1 primatizado específico para CD80 humano designado de "IDEC-114". (Patentes US 5.736.137, US 6.113.898).

De acordo com certos exemplos de realização preferidos da

invenção, o antígeno de superfície da célula B é CD20. O antígeno "CD20" é uma fosfoproteína não glicosilada de ~35 kDa, encontradas na superfície de mais de 90% das células B do sangue periférico ou dos órgãos linfóides. O CD20 é expresso precocemente no desenvolvimento da célula pré-B e permanece até a diferenciação da célula no plasma. O CD20 está presente tanto nas células B normais, quanto nas células B malignas. Outros nomes do antígeno CD20 na literatura incluem "antígeno restrito de linfócitos B" e "Bp35". O antígeno CD20 está descrito, por exemplo, em Clark *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:1766 (1985).

ANTICORPOS CONTRA CD20

O antagonista de célula B da invenção pode ser um anticorpo contra CD20. Qualquer anticorpo contra CD20 conhecido no estado da arte que funciona como um antagonista de células B pode ser utilizado no contexto da presente invenção. (Vide, por exemplo, Patentes US 6.682.734, 6.538.124, 6.528.624, 6.455.043, 6.410.391, 6.399.061, 6.368.596, 6.287.537, 6.242.195, 6.224.866, 6.171.586, 6.194.551, 6.120.767, 6.015.542, 6.090.365, 5.849.898, 5.843.439, 5.843.398, 5.776.456, 5.736.137, 5.721.108, 5.677.180, 5.595.721; Pedidos de patente US , 2005/0069545, 2005/0053602, 2005/0025764, 2004/0167319, 2004/0093621, 2003/0219433, 2003/0157108, 2003/0147885, 2003/01339301, 2003/0103971, 2003/0095963, 2003/0082172, 2003/0068664, 2003/0026801, 2003/0021781, 2002/0197256, 2002/0197255, 2002/0128448, 2002/0058029, 2002/0041847, 2002/0012665, 2002/0009444, 2002/0006404, 2002/0004587; Pedidos de patentes internacionais WO00/09160, WO00/27428, WO00/27433, WO00/44788, WO01/10462, WO01/10461, WO01/10460, WO02/04021, WO01/74388, WO01/80884, WO01/97858, WO02/34790, WO02/060955, WO2/096948, WO02/079255, W098/56418, W098/58964, W099/22764, W099/51642, W000/42072, WO00/67796, WO01/03734, WO01/77342, WO00/20864, WO01/13945, WO00/67795, WO00/74718, WO00/76542,

WO01/72333, WO02/102312, WO03/002607, WO049694, WO03/061694, WO95/0377Q; e pedido de patente Europeu 330,191 e 332,865).

Exemplos de anticorpos que ligam ao CD20 estão definidos, por exemplo, no pedido de patente US 2005/0053602e inclui "C2B8", que é também denominado "Rituximab" ("RITUXAN®") (Patente US 5.736.137); o anticorpo murino 2B8 marcado por ítrio [90] denominado "Y2B8" ou "Ibritumomab Tiuxetan" ZEVALIN® (Patente US 5.736.137); IgG2a "B1" murino, também denominado "Tositumomab", marcado, opcionalmente com I¹³¹ para gerar o anticorpo "I¹³¹-B1" (iodo I¹³¹ tositumomab, BEXXAR®) (US 5.595.721); anticorpo monoclonal murino "1F5" (Press *et al.*, *Blood* 69 (2):584-591 (1987) e 1F5 humanizado ou "estrutura remendada" (*framework patched*) (documento WO 03/002607); depósito ATCC: HB-96450); anticorpo 2H7 murino e 2H7 quimérico (US 5.677.180); 2H7 humanizado; huMax-CD20 (Genmab, Dinamarca); AME-133 (Applied Molecular Evolution); e os anticorpos monoclonais L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 ou NU-B2 disponíveis por meio do International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al.*, em: *Leukocyte Typing III*) (McMichael, Ed., pág. 440, Oxford University Press (1987)).

Os termos "rituximab" ou "RITUXAN®" no presente indicam o anticorpo monoclonal, humano/murino, quimérico geneticamente elaborado direcionado contra o antígeno CD20 e denominado "C2B8" na US 5.736.137, incluindo seus fragmentos que retêm a capacidade de se ligar ao CD20.

Em certos exemplos de realização, os anticorpos anti-CD20 se ligam ao CD20 humano e primata. Em um exemplo de realização específico, os anticorpos que se ligam ao CD20 são humanizados ou quiméricos que se ligam ao CD20 e incluem rituximab (RITUXAN ®), m2H7 (2H7 murino), hu2H7 (2H7 humanizado) e todas as suas variantes funcionais, incluindo, sem se limitar, hu2H7.vl6 (v é utilizado para versão), v31, v73, v75, v114, v511, bem como variantes deficiente de fucose. As seqüências de algumas variantes do

anticorpo hu2H7 são definidas no documento WO 04/056312, a qual é incorporada ao presente pela referência na sua totalidade, e são fornecidas a baixo, com a sequência de aminoácido N-terminal em negrito sendo que a sequência líder é removida no polipeptídeo maduro:

5 hu2H7.v16 L cadeia [232 aa] (SEQ ID N°:1):

MGWSCIIFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHW
YQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
QQWSFNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA
10 CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

hu2H7.v16 H cadeia [471 aa] (SEQ ID N°:2):

MGWSCIIFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNM
HWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCARVYYSNSYWYFDWWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
15 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIERTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
20 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

hu2H7.v31 H cadeia [471 aa] (SEQ ID N°:3):

MGWSCIIFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNM
HWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCARVYYSNSYWYFDWWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
25 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
ATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTL

PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

A cadeia L da v31 é a mesma que o da v16 acima, ou seja, SEQ
ID Nº: 1.

5 O termo "2H7v.16 humanizado", conforme usado no presente
documento, refere-se a um anticorpo intacto ou fragmento de anticorpo
contendo a sequência da cadeia leve variável:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLrYAPSNL
ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIK

10 R(SEQ ID Nº:4);

E a sequência pesada variável:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
YPGNGDTSYNQKFGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYY
NSY WYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID Nº:5).

15 Se o anticorpo 2H7v.16 humanizado é um anticorpo intacto, este
consta preferencialmente da sequência de aminoácido da cadeia leve v16:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAPSNL
ASGVPSRPSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNS

20 QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID Nº:6);

E da sequência de aminoácido da cadeia pesada v16:

EVQLVESGGGLVQPGGSLPvLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGDTSYNQKFGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYY
25 NSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWISLT

LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID N°:7).

- Anticorpos variantes 2H7 exemplares, contendo a seqüência de aminoácidos da v16 exceto nas posições da substituição dos aminoácidos que estão indicados na tabela abaixo. A não ser que seja de outra forma indicado, as variantes 2H7 terão a mesma cadeia pesada que a v16.

TABELA 1

2H7 Versão	Mudanças na Cadeia pesada (V _H)	Mudanças na Cadeia Leve (V _L)	Mudanças no Fc
31	—	—	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A,N100A	S92A	
114	D56A,N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A,N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A,N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A,N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	—	—	K334L
588	—		S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A,N100Y, S100aR	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A

Uma variante do mAb 2H7 humanizado anterior é o 2H7v.31 com a mesma seqüência da cadeia L como na SEQ ID Nº: 6 acima, com a seqüência da cadeia H:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAI
 5 YPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYS
 NSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTV
 10 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID Nº:8)

O anticorpo murino anti-CD20 humano, m2H7, tem a seqüência V_H:

QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRQGLEWIGAI
 15 YPNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVYYYSN
 SYWYFDVWGTTGTTVTVS (SEQ ID Nº:9);

E a seqüência V_L:

QrVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYLHWYQQKPGSSPKPWIYAPSN
 LASGVPARFSGSGSGTSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGAGTKLE
 20 LK (SEQ ID Nº: 10).

Outro anticorpo 2H7 humanizado preferido consta da seqüência do domínio leve variável do 2H7.v511:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNL
 ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGKVEIK
 25 R (SEQ ID Nº:11)

e a seqüência do domínio pesado variável do 2H7.v511:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAI
 YPNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWYYYSYR

Y WYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID N°: 12).

Se o anticorpo 2H7.v511 humanizado é um anticorpo intacto, este pode constar da seqüência aminoácido da cadeia leve:

QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLAS
 5 GVPSRPSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR
 TVAAPSWIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 C (SEQ ID N°:20)

e da seqüência aminoácido da cadeia pesada da SEQ ID N°:7 ou:

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAI
 YPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYS
 YRYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 15 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAPIAATISKAKGQPPVEPVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID N°: 13).

A menos que seja indicado, as seqüências aqui informadas do
 20 anticorpo 2H7v.l6 humanizado e seus variantes são de polipeptídeos maduros,
 ou seja, sem a a seqüência líder. (Pedido de Patente US 2005/0095243).

ANTAGONISTAS BAFF, ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DE BAFF, E OUTROS

ANTAGONISTAS DE CÉLULA B

BAFF (também conhecido como BLyS, TALL - 1, THANK,
 25 TNFSF13B, ou zTNF4) é um membro da superfamília do TNF1 ligante que é
 essencial para a sobrevivência e maturação das células B. a superexpressão
 de BAFF em camundongos transgênicos leva a hiperplasia de célula B e ao
 desenvolvimento de doença auto-imune grave (Mackay, *et al.* (1999) *J. Exp.*

Med. 190, 1697-1710; Gross, *et al.* (2000) *Nature* 404, 995 -999; Khare, *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3370-33752-4). O BAFF atua em células B através da ligação de três membros da superfamília dos receptores TNF, TACI, BCMA, e BR3 (também conhecido como BAFF-R) (Gross, *et al.*, *Supracitado*;
 5 Thompson, JS, *et al.*, (2001) *Science* 293, 2108-2111; Yan, M., *et al.* (2001) *Curr. Biol.* 11:1547-1552; Yan, M., *et al.* (2000) *Nat. Immunol.* 1:37-41; Schiemann, B., *et al.* (2001) *Science* 293:2111-2114). Dos três receptores BAFF, apenas BR3 é específico para BAFF; os outros dois também se ligam ao membro da família do TNF, APRIL. BR3 é uma proteína transmembrana tipo III
 10 de 184 resíduos expresso na superfície de células B. (Pedido de Patente US 2005/0095243).

De acordo com certos exemplos de incorporações da invenção, o antagonista de célula B é um antagonista BAFF ou um antagonista de receptor BAFF. O termo "antagonista de BAFF", como usado no presente documento,
 15 inclui qualquer molécula capaz de se ligar, associar, e/ou interagir com uma sequência de polipeptídeo nativo de BAFF e bloquear parcial ou totalmente, inibir, ou neutralizar a sequência nativa da sinalização de BAFF. Em exemplos de realização selecionados, a presente invenção inclui o uso de anticorpos ou fragmentos, que se ligam ou se associam a BAFF. Aqueles hábeis na técnica
 20 apreciarão que a sinalização da sequência nativa do polipeptídeo BAFF promove, entre outras coisas, a sobrevivência e a maturação da célula B. Por exemplo, um ligante de BAFF biologicamente ativo potencializa qualquer uma ou a combinação dos seguintes eventos *in vitro* ou *in vivo*: (i) um aumento da sobrevivência das células B, (ii) um maior nível de IgG e/ou IgM, (iii) um aumento
 25 no número de células plasmáticas; e (iv) processamento do NF-KB2/100 em NF-KB p52 em células B esplênicas (por exemplo, Batten *et al.* *J. Exp. Med.* 192:1453-1465 (2000); Moore, *et al.* *Science* 285:260-263 (1999); Kayagaki *et al.*, *Immunity* 77: 515-524 (2002). Assim, a inibição, bloqueio ou neutralização

da sinalização de BAFF resulta na, dentre outras coisas, redução do número de células B. Conseqüentemente, um antagonista de BAFF, de acordo com determinados aspectos da invenção, irá bloquear, inibir ou neutralizar parcial ou totalmente uma ou mais atividades biológicas *in vitro* ou *in vivo* de um polipeptídeo BAFF e, assim, reduzir ou inibir a atividade das células B. Vários ensaios úteis para testar antagonistas BAFF estão descritos; nos pedidos de Patente 2005 / 0095243.

Peptídeos úteis como antagonistas de BAFF incluem, por exemplo, peptídeos referidos como TALL-1 12-3 no documento WO 02/092620, com a seguinte seqüência de aminoácidos:

MLPGCKWDLLIKQWVCDPLGSGSATGGSGSTASSGSGSATHMLPGCKWDL
 IKQWVCDPLGGGGGVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 EVTCWWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTvjL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALFNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID Nº:14).

Este peptídeo, bem como outros exemplos de peptídeos divulgado no documento WO 02/092620, se liga a BAFF e inibe a ligação do BAFF aos seus receptores, BR3, TACI e BCMA. Os peptídeos antagonistas de BAFF estabelecidos no documento WO 02/092620 pode, por exemplo, em certas incorporações, estar acoplado a um Fc ou PEG.

Peptídeos antagonistas de BAFF adicionais podem incluir peptídeos ou polipeptídeos que contenham uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo constituído pela: ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID Nº: 15), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID Nº: 16), ECFDLLVRRWVPCMLG (SEQ ID NO: 17), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEQ ID Nº: 18), e ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID Nº: 19), e polipeptídeos que contenham uma seqüência de aminoácidos que é idêntica em pelo menos 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% a qualquer uma das SEQ ID N°:15,16,17,18 ou 19.

Peptídeos antagonistas de BAFF adicionais que podem ser usados na prática dos métodos da presente invenção incluem polipeptídeos que constam da seqüência de aminoácidos da Fórmula I, II ou Formula III, conforme definido no pedido de Patente US 2005/0095243.

Em alguns exemplos de realização da invenção, o antagonista BAFF é um anticorpo anti-BAFF, imunoadesina ou moléculas pequenas. A imunoadesina, em certos exemplos de realização contém uma região de ligação de BAFF de um receptor de BAFF (por exemplo, um domínio extracelular do BR3, BCMA ou TACI) construído sob a forma solúvel. Em um exemplo de realização preferido, a imunoadesina é BR3 - Fc, ou polipeptídeos que possuem uma das seqüências da SEQ ID N°: 15, 16, 17, 18 ou 19 (conforme definido no pedido de Patente US 2002/0037852, US 2003/0059937, US 2005/0095243 e US 2005/0163775). Em outros exemplos de realização a imunoadesina é uma forma solúvel de TACI ou BCMA (por exemplo, TACI-Fc, ou BCMA-Fc).

Os técnicos no assunto irão apreciar que os anticorpos ou fragmentos, que se ligam ou se associam especificamente ao BAFF, também são compatíveis com os ensinamentos do presente e são de técnicas conhecidas, por exemplo, no pedido de Patente US 2003/0059937. Um exemplo de anticorpo, de acordo com este aspecto da invenção é o LymphoStat-B™ (belimumab) (Human Genome Sciences, Inc.), um anticorpo monoclonal humano que reconhece e inibe especificamente a atividade biológica do BAFF.

De acordo com alguns outros exemplos de realização da invenção, o antagonista de célula B é um antagonista do receptor BAFF. O termo "antagonista de receptor BAFF", conforme utilizado no presente inclui

qualquer molécula que se liga ou se associa a um polipeptídeo de seqüência nativa do receptor BAFF (por exemplo, BR3, TACI ou BCMA) e/ou bloqueia, inibe ou neutraliza parcial ou totalmente a sinalização da seqüência nativa de BAFF através dos receptores. Desta forma, em um exemplo de realização
5 específico da invenção, o antagonista de célula B compreende um anticorpo ou fragmento deste, polipeptídeo ou moléculas pequenas que se liga especificamente com Btk, TACI, BCMA (pedido de Patente US 2002/0081296) ou BAFF-R (pedido de Patente US 2002/0165156). Outros exemplos de antagonistas de célula B incluem, por exemplo, anticorpos, polipeptídeos ou
10 moléculas pequenas que inibem a interação dos motivos ITAM da Ig- α /Ig- β com os seus anticorpos alvos, polipeptídeos ou moléculas pequenas que inibem a ativação da via clássica ou alternativa do NF-KB, e anticorpos, polipeptídeos ou moléculas pequenas que inibem a OCA-B, CD40, LT-P e etc.

CONJUGADOS E OUTRAS MODIFICAÇÕES DE ANTAGONISTAS DE CÉLULA B

15 De acordo com certos exemplos de realização da invenção, o antagonista de célula B é conjugado com um agente citotóxico.

Agentes quimioterápicos úteis para a geração de antagonistas de células B conjugados com agentes citotóxicos são bem conhecidas no estado da arte.

20 Conjugados de um antagonista de célula B e uma ou mais toxinas de moléculas pequenas, tais como caliqueamicina, maitansina (patente US 5.208.020), tricoteno e CC1065, também são contemplados no presente. Em uma realização da presente invenção, o antagonista de célula B é conjugado a uma ou mais moléculas de maitansina (por exemplo, cerca de 1 a cerca de 10
25 moléculas de maitansina por molécula antagonista de célula B). A maitansina pode ser convertida, por exemplo, em May-SS-Me, que pode ser reduzido em May-SH3 e reagido com antagonista modificado (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992)) para gerar um conjugado de antagonista e maitansinóide.

Alternativamente, o antagonista de célula B é conjugado a uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família caliqueamicina de antibióticos é capaz de produzir rupturas de DNA de fita dupla em concentrações sub-picomolares. Análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser utilizados incluem, mas não se limitam a, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG e θ_1^I (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993) e Lode *et al.*, *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998)).

Toxinas enzimaticamente ativas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem a cadeia A diftérica, fragmentos ativos não-ligantes da toxina diftérica, cadeia A da exotoxina (da *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de rícino, cadeia A da abrina, cadeia A da modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor da *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor da *Saponaaria officinalis*, gelonina, mitogellina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Vide, por exemplo, o documento WO 93/21232, publicado em 28 de outubro de 1993. Maitansinóides podem também ser conjugados a um antagonista de célula B.

A presente invenção contempla adicionalmente um antagonista de célula B conjugado a um composto com atividade nucleolítica (por exemplo, uma ribonuclease ou uma endonuclease de DNA, tal como uma desoxirribonuclease; DNase).

Uma série de isótopos radioativos está disponível para a produção de antagonistas de célula B radioconjugados. Exemplos incluem At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioativos de Lu.

Os conjugados do antagonista de célula B e agente citotóxico podem ser fabricados utilizando uma série de agentes acopladores de proteínas bifuncionais, tais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), cicloexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometila),

iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCL), ésteres ativos (tais como suberato de di-succinimidila), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis-(para-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados bis-diazônio (tais como bis-(para-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolieno) e compostos fluorados bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Pode-se preparar, por exemplo, uma imunotoxina rícina, conforme descrito em Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado por carbono 14 (MX-DTPA) é exemplo de um agente quelante para conjugação de radionucleotídeo ao antagonista de célula B. Vide o documento WO 94/11026. O ligante pode ser um "ligante clivável" que facilita a liberação do fármaco citotóxico na célula. Pode-se utilizar, por exemplo, um ligante de ácido lábil, ligante sensível a peptidase, ligante de dimetila ou ligante que contém dissulfeto (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992)).

Alternativamente, uma proteína de fusão que compreende o antagonista de célula B e agente citotóxico pode ser elaborada, por exemplo, por meio de técnicas recombinantes ou síntese de peptídeos.

Em ainda outro exemplo de realização, o antagonista de célula B pode ser conjugado a um "receptor" (tal como a estreptoavidina) para ser utilizado em uma pré-localizador, onde o conjugado antagonista de célula B-receptor é administrado ao paciente, seguido pela remoção do conjugado não-ligado na circulação, utilizando um agente de limpeza e, em seguida, é administrado um "ligante" (por exemplo, a avidina) que é conjugada a um agente citotóxico (por exemplo, um radionucleotídeo).

Os antagonistas de célula B de acordo com a presente invenção podem também ser conjugados a uma enzima ativadora de pró-fármacos, que converte um pró-fármaco (por exemplo, um agente quimioterápico de peptidila,

vide o documento WO 81/01145) em um fármaco anticancerígeno ativo. Vide, por exemplo, o documento WO 88/07378 e a patente US 4.975.278. O componente de enzima de tais conjugados inclui qualquer enzima capaz de agir sobre um pró-fármaco, de forma tal a convertê-lo em sua forma citotóxica
5 mais ativa.

Enzimas que são úteis no método de acordo com a presente invenção incluem, mas não se limita a, fosfatase alcalina útil para a conversão de pró-fármacos que contenham fosfato em fármacos livres; arilsulfatase útil para a conversão de pró-fármacos contendo sulfato em fármacos livres; citosina desaminase útil para a conversão de 5-fluorocitosina atóxica no
10 fármaco anti-cancerígeno, 5-fluorouracila; proteases tais como serratia protease, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L) que são úteis para a conversão de pró-fármacos contendo peptídeos em fármacos livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para a conversão de pró-fármacos que contêm substituintes D-aminoácidos; enzimas
15 de clivagem de carboidratos tais como O-galactosidase e neuraminidase úteis para a conversão de pró-fármacos glicosilados em fármacos livres; β -lactamase útil para a conversão de fármacos derivados com β -lactamas em fármacos livres; e penicilina amidases, tais como penicilina V amidase ou penicilina G amidase, úteis para a conversão de fármacos derivados nos seus nitrogênios
20 amina com grupos fenoxiacetil ou fenilacetil, respectivamente, em fármacos livres. Alternativamente, anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos no estado da técnica como "abzimas", podem ser utilizados para converter os pró-fármacos de acordo com a presente invenção em fármacos
25 ativos livres (vide, por exemplo, Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)). Conjugados de antagonista de célula B-abzima podem ser preparados conforme descrito no presente para o fornecimento da abzima a uma população de células ou tecido.

As enzimas de acordo com a presente invenção podem ser ligadas covalentemente ao antagonista de célula B por meio de métodos bem conhecidos no estado da técnica, tais como o uso dos reagentes reticulantes heterobifuncionais discutidos acima. Alternativamente, as proteínas de fusão
5 que compreendem pelo menos o sítio de ligação de antígenos de um antagonista de acordo com a presente invenção ligado a pelo menos uma porção funcionalmente ativa de uma enzima de acordo com a presente invenção podem ser construídas utilizando métodos de DNA recombinante bem conhecidos no estado da técnica (vide, por exemplo, Neuberger *et al.*, *Nature*,
10 312:604-608 (1984)).

Outras modificações do antagonista de célula B são contempladas no presente. O antagonista de célula B pode ser ligado, por exemplo, a um dentre uma série de polímeros não-proteináceos, tais como polietilenoglicol (PEG), polipropilenoglicol, polioxialquilenos ou copolímeros de
15 polietilenoglicol e polipropilenoglicol.

Um exemplo de polímero que pode ser usado para conjugação de um antagonista de célula B é uma polialquileno (PEG). Frações de PEG, por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 polímeros de PEG, podem ser conjugados a cada antagonista de célula B para aumentar sua meia vida sérica, quando comparado com um antagonista de
20 célula B sozinho. As frações do PEG não são antigênicas e são biologicamente inertes. Frações do PEG utilizados na prática da invenção podem ser ramificadas ou não ramificadas (de cadeia linear).

O número de frações do PEG ligado ao antagonista de célula B e a massa molecular das cadeias individuais do PEG podem variar. Em geral,
25 quanto maior o peso molecular do polímero, menos cadeias de polímero estão anexadas ao polipeptídeo. Normalmente, a massa total do polímero anexado ao antagonista de célula B é de 20 kDa a 40 kDa. Assim, se uma cadeia do polímero encontra-se anexada, o peso molecular da cadeia é geralmente de

20-40 kDa. Se duas cadeias encontram-se anexadas, o peso molecular de cada cadeia é geralmente de 10-20 kDa. Se três cadeias encontram-se anexadas, o peso molecular é geralmente de 7-14 kDa.

Os polímeros, por exemplo, PEG, podem ser acoplados ao antagonista de célula B através da exposição de um grupo reativo adequado no polipeptídeo. O(s) grupo(s) reativo(s) exposto(s) pode(m) ser, por exemplo, um grupo amino N-terminal ou um grupo amino épsilon de um resíduo de lisina interna, ou de ambos. Um polímero ativado pode reagir e fazer uma ligação covalente em qualquer grupo de aminoácidos livre no antagonista de célula B. Grupos carboxílicos livres, grupos carbonil devidamente ativados, hidroxila, guanidila, imidazol, frações de carboidratos oxidados e grupos mercapto do antagonista de célula B (se disponível) também podem ser utilizados como grupos reativos para a ligação do polímero.

Em uma reação de conjugação, é tipicamente empregada cerca de 1,0 a 10 moles de polímero ativado por mol de polipeptídeo, dependendo da concentração de polipeptídeo. Normalmente, a relação escolhida representa um equilíbrio entre a maximização da reação enquanto minimiza reações paralelas (muitas vezes não específicas), que pode prejudicar a atividade farmacológica desejada do antagonista de célula B. De preferência, pelo menos 50% da atividade biológica (como demonstrado, por exemplo, em qualquer um dos ensaios aqui descritos ou de técnicas conhecidas), do antagonista de célula B é mantida, e de preferência aproximadamente 100% é mantida.

O polímero pode ser conjugado com a utilização de antagonista de célula B utilizando a química convencional. Por exemplo, um grupo polialquilenoglicol pode ser acoplado a um grupo amino de lisina épsilon do antagonista de célula B. A ligação às cadeias laterais da lisina pode ser executada com um éster ativo N-hidroxissuccinimida (NHS) como o succinato

de succinimidil PEG (SS-PEG) e o propionato de succinimidil (SPA-PEG). Frações adequadas de polialquilenoglicol incluem, por exemplo, carboximetil-NHS e norleucina-NHS, SC. Estes reagentes são comercialmente disponíveis. Outros ligantes de PEG amino reativos podem ser substituídos pelo grupo succinimidil. Estes incluem, por exemplo, isotiocianatos, nitrofenilcarbonatos (PNP), epóxido, carbonatos de benzotriazol, SC-PEG, tresilato, aldeído, epóxido, carbonilimidazol e carbonato PNP. As condições são geralmente otimizadas para maximizar a seletividade e extensão da reação. Tais condições de otimização da reação estão dentro das habilidades dos técnicos no assunto.

A PEGilação pode ser realizada por qualquer uma das reações de PEGilação conhecidas na técnica. Vide, por exemplo, *Focus on Growth Factors* 3:4-10, 1992 e Pedidos de patente europeia EP 0154316, EP 0401384. A PEGilação pode ser realizada através de uma reação de acilação ou uma reação de alquilação com uma molécula reativa de polietileno glicol (ou de um polímero análogo reativo solúvel em água).

A PEGilação por acilação geralmente envolve a reação de um éster ativo derivado de polietileno glicol. Qualquer molécula de PEG reativa pode ser empregada na PEGilação. PEG esterificados em N-hidroxysuccinimida (NHS) são freqüentemente utilizados como éster de PEG ativado. Como utilizado no presente o termo "acilação" inclui, sem se limitar, os seguintes tipos de ligações entre as proteínas terapêuticas e os polímeros solúveis em água, como o amido PEG, carbamato, uretano, e similares. Vide, por exemplo, *Bioconjugate Chem.* 5:133-140, 1994. Os parâmetros de reação são geralmente selecionados para evitar que as condições de temperatura, solvente, e pH possa prejudicar ou desativar o antagonista de célula B.

Geralmente, o vínculo de ligação é um amido e, normalmente, pelo menos, 95% do produto resultante é mono-, di- ou tri-PEGilado. No entanto, algumas espécies com graus maiores de PEGilação pode ser

constituída nos montantes dependendo das condições de reação específicas utilizadas. Opcionalmente, espécies pegiladas purificadas são separadas da mistura, particularmente espécies que não reagiram, por métodos convencionais de depuração, incluindo, por exemplo, diálise, precipitação por salificação, ultrafiltração, cromatografia de troca iônica, cromatografia de
5 filtração em gel, cromatografia de troca hidrofóbica e eletroforese.

A PEGilação por alquilação geralmente envolve a reação de um aldeído terminal derivado do PEG com um antagonista de célula B da invenção na presença de um agente redutor. Além disso, é possível manipular as
10 condições da reação para favorecer substancialmente a PEGilação apenas no grupo N-amino terminal do antagonista de célula B, ou seja, uma proteína monoPEGilado. Em qualquer um dos casos de mono- PEGilação ou poli-PEGilação, os grupos de PEG normalmente são ligados à proteína através de um grupo $-CH_2-NH$. Com especial referência ao grupo $-CH_2$, este tipo de
15 ligação é conhecido como ligação "alquila".

A derivatização através de alquilação redutora para produzir um produto mono-PEGilado marcado no segmento N-terminal explora a reatividade diferencial de diferentes tipos de grupos de aminoácidos primários (lisina *versus* o N-terminal) disponíveis para a derivação. A reação é realizada em um
20 pH que permite aproveitar as diferenças do pKa entre os grupos amino-épsilon dos resíduos de lisina do grupo amino N-terminal das proteínas. Por tais derivatizações seletivas, a fixação de um polímero solúvel em água que contém um grupo reativo, por exemplo, um aldeído, para uma proteína é controlada: conjugação com o polímero ocorre predominantemente no N-terminal da
25 proteína e nenhuma alteração significativa de outros grupos reativos, como o grupo amino das cadeias laterais de lisina, ocorre.

As moléculas de polímero usadas tanto no acesso da acilação quanto na alquilação são selecionadas entre polímeros solúveis em água. O

polímero selecionado é tipicamente modificado para ter um único grupo reativo, como um éster ativo de acilação ou um aldeído de alquilação, a fim de que o grau de polimerização possa ser controlado, assim como previsto para os presentes métodos. Um exemplo de aldeído PEG reativo a é o polietilenoglicol propionaldeído, que é estável em água, ou o mono C1-C10 alcóxi ou derivados de arilóxi (vide, por exemplo, Harris *et al.*, Patente US 5.252.714). O polímero pode ser ramificado ou de cadeia linear. Para as reações de acilação, o(s) polímero(s) selecionado(s) tem(têm) tipicamente um único grupo éster reativo. Para a alquilação redutora, o(s) polímero(s) selecionado(s) têm tipicamente um único grupo aldeído reativo. Geralmente, o polímero solúvel em água não será selecionado pela ocorrência natural dos resíduos glicosilados, uma vez que estas são feitas geralmente de forma mais conveniente pelos sistemas de expressão recombinante em mamíferos.

Métodos para preparar um antagonista de célula B PEGilado da invenção geralmente inclui os passos: (a) reação do antagonista de célula B da invenção com o polietileno glicol (como, por exemplo, um éster reativo ou aldeído derivado do PEG), sob condições em que a molécula torna-se ligada a um ou mais grupos de PEG, e (b) obtenção do(s) produto(s) da reação. Em geral, as condições de reação ótimas para a reação de acilação será determinada caso a caso, com base nos parâmetros conhecidos e resultado desejado. Por exemplo, uma maior relação de PEG a proteína, geralmente leva a uma maior percentagem de produto poli-PEGilado.

A alquilação redutora para produzir uma população substancialmente homogênea de antagonista de célula B/mono-polímero geralmente inclui as etapas de: (a) reação de um antagonista de célula B da invenção com uma molécula de PEG reativa sob condições redutoras de alquilação, em um pH adequado para as modificações seletivas *pen-nit* do grupo amino N-terminal do NgR; e (b) obtenção do(s) produto(s) da reação.

Para uma população substancialmente homogênea de antagonista de célula B/mono-polímero, as condições redutoras da alquilação são aquelas que permitem a fixação seletiva do polímero solúvel em água ao grupo N-terminal do antagonista de célula B da invenção. Essas condições de reação geralmente possibilita diferenças de pKa entre os grupos amino das cadeias laterais da lisina e do grupo amino N-terminal. Para os propósitos da presente invenção, o pH está geralmente na faixa de 3-9, e tipicamente entre 3-6.

Antagonistas de célula B da invenção podem incluir um marcador, por exemplo, um grupo lisina que pode ser introduzida por proteólise. Assim, o grupo lisina pode ser seletivamente modificado pela primeira reação a uma His-Tag modificada com ligante de baixo peso molecular tais como o reagente de Traut (*Pierce Chemical Company*, Rockford, IL), que vai reagir tanto com a lisina quanto com o N-terminal, e, em seguida, liberando seu marcador (*tag*). O polipeptídeo conterá então um grupo SH livre, que podem ser modificado seletivamente com um PEG contendo um grupo principal contendo um tiol reativo como, por exemplo, um grupo maleimida, um grupo vinilsulfona, um grupo haloacetato, ou um SH livre ou protegido.

O reagente de Traut pode ser substituído por qualquer ligante que irá criar um sítio de ligação específico para o PEG. Por exemplo, o reagente de Traut pode ser substituído por SPDP, SMPT, SATA, ou SATP (*Pierce Chemical Company*, Rockford, IL). Paralelamente poderia se reagir à proteína com uma ligante amino-reativo que insere uma maleimida (por exemplo, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS, ou GMBS), um grupo haloacetato (SBAP, SIA, SLAB), ou um grupo vinilsulfona e reagir o produto resultante com um PEG que contenha um SH livre.

Em alguns exemplos de realização, a fração de polialquilenoglicol é acoplada a um grupo de cisteína do antagonista de célula B. O acoplamento pode ser efetuado utilizando, por exemplo, um grupo maleimida, grupo

vinilsulfona, grupo haloacetato ou um grupo tiol.

Opcionalmente, o antagonista de célula B é conjugado com um grupo polietileno glicol através de uma ligação lábil. A ligação lábil pode ser clivada, por exemplo, por hidrólise bioquímica, proteólise, ou clivagem sulfídrica. Por exemplo, a ligação pode ser clivada sob condições *in vivo* (fisiológica).

As reações podem ocorrer por qualquer método adequado para reagir os materiais biologicamente ativos com polímeros, geralmente a cerca do pH 5,8, por exemplo, pH 5, 6, 7 ou 8, se os grupos reativos estão no grupo alfa amino no N-terminal. Geralmente o processo envolve a elaboração de um polímero ativado e depois reagindo este com as proteínas para produzir uma proteína solúvel adequada para a formulação.

Os antagonistas de célula B descritos no presente podem também ser formulados como lipossomos. Os lipossomos contendo o antagonista de célula B são preparados por meio de métodos conhecidos na técnica, conforme descrito, por exemplo, em Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); Patentes US 4.485.045 e US 4.544.545; e documento WO 97/38731. Lipossomos com maior tempo de circulação são descritos na Patente US 5.013.556.

Lipossomos particularmente úteis podem ser gerados por meio do método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídeos que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Lipossomos são extraídos através de filtros com tamanho de poro definido para gerar lipossomos com o diâmetro desejado. Os fragmentos Fab' de um anticorpo de acordo com a presente invenção podem ser conjugados aos lipossomos descritos em Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) por meio de reação de intercâmbio de dissulfetos. Um agente quimioterápico é

opcionalmente contido no interior do lipossomo. Vide Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81^o (19) 1484 (1989).

É (são) contemplada(s) modificação(ões) de seqüência de aminoácidos da proteína ou peptídeos do antagonista de célula B descritos
5 no presente. Pode-se desejar, por exemplo, aprimorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do antagonista de célula B.

Variantes de seqüências de aminoácidos do antagonista de célula B são preparadas através da introdução de substituições de nucleotídeos apropriadas no ácido nucléico do antagonista de célula B, ou através da
10 síntese de peptídeos. Ditas modificações incluem, por exemplo, deleções e/ou inserções e/ou substituições de resíduos nas seqüências de aminoácidos do antagonista de célula B. Pode ser realizada qualquer combinação com deleção, inserção e substituição para chegar à construção final, desde que dita construção possua as características desejadas. As substituições de
15 aminoácidos podem também alterar processos pós-traducional do antagonista de célula B, tais como a substituição do número ou posição de sítios de glicosilação.

Um método útil para a identificação de certos resíduos ou regiões do antagonista de célula B que são locais preferidos para
20 mutagênese é denominado "mutagênese de varredura de alanina", conforme descrito por Cunningham e Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Na presente invenção, um resíduo ou grupo de resíduos alvo é identificado (por exemplo, resíduos carregados, tais como arg, asp, his, lys e glu) e substituído por um aminoácido neutro ou negativamente carregado
25 (de maior preferência alanina ou polialanina). Ditos sítios de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são então refinados pela introdução de outras variantes ou adicionais nos ou para os sítios de substituição. Desta forma, embora o sítio para a introdução de

uma variação de sequência de aminoácido seja previamente determinado, a natureza da mutação *per se* não necessita ser previamente determinada. Para analisar o desempenho de uma mutação em um dado sítio, por exemplo, varredura de ala ou mutagênese aleatória é conduzida no códon
5 ou região alvo e as variantes de antagonista de célula B expressas são selecionadas para a atividade desejada.

As inserções de seqüências de aminoácidos incluem fusões de carbóxi e/ou amino terminais que variam em comprimento de um resíduo até polipeptídeos que contenham 100 ou mais resíduos, bem como
10 inserções intra-sequenciais de resíduos de aminoácidos isolados ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um antagonista de célula B com um resíduo metionila N-terminal ou o antagonista de célula B fundido a um polipeptídeo citotóxico. Outras variantes de inserção do antagonista de célula B incluem a fusão ao N- ou C-terminal do antagonista
15 de célula B a uma enzima ou um polipeptídeo que aumente a meia-vida do antagonista de célula B no soro.

Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácidos. Ditas variantes possuem pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula do antagonista de célula B substituída por um resíduo diferente.
20 Os sítios de maior interesse para mutagênese do antagonista de célula B incluem as regiões hipervariáveis, mas também são contempladas substituições de FR.

Substituições conservadoras são exibidas na Tabela 2 sob o título de "substituições preferidas". Caso estas substituições resultem em mudança da atividade biológica, mudanças mais substanciais, denominadas "exemplos
25 de substituições" na Tabela 2, ou conforme descrito adicionalmente, abaixo com referência a classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos são selecionados.

TABELA 2

Resíduo Original	Exemplos De Substituições	Substituições Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são atingidas através da seleção de substituições que difiram significativamente no seu efeito sobre a manutenção (a) da estrutura da cadeia

principal de polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, na forma de folha ou em conformação helicoidal; (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo; ou (c) do volume da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com base nas propriedades comuns da cadeia lateral:

(1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: gly, pro; e

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Substituições não-conservadoras causarão a substituição de um membro de uma dessas classes por outra classe.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação adequada do antagonista de célula B pode também ser substituído, geralmente com serina, para aprimorar a estabilidade oxidativa da molécula e prevenir reticulamento anormal. Por outro lado, ligação(ões) de cisteína pode(m) ser adicionada(s) ao antagonista de célula B para aprimorar sua estabilidade (particularmente quando o antagonista de célula B for um fragmento de anticorpo, tal como fragmento Fv).

Um tipo particularmente preferido de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo parental. Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para desenvolvimento adicional terá(ão) propriedades biológicas aprimoradas em relação ao anticorpo parental do qual é(são) gerado(s). Uma forma conveniente para a geração de ditas variantes de substituição envolve a maturação de afinidade utilizando exibição de fago. Em resumo, diversos sítios de regiões hipervariáveis (por exemplo, 6 a 7 sítios) sofrem mutações para

gerar todas as substituições amino possíveis em cada sítio. As variantes de anticorpos geradas desta forma são exibidas de forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos na forma de fusões para o produto gene III de M13 embalado em cada partícula. As variantes exibidas por fago são então

5 selecionadas de acordo com a sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação), da forma descrita no presente. A fim de identificar possíveis sítios de regiões hipervariáveis para modificação, mutagênese de varredura de alanina pode ser realizada para identificar resíduos de regiões hipervariáveis que contribuem de forma significativa para a ligação de antígenos. Alternativa

10 ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura de cristal do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e o antígeno. Ditos resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas desenvolvidas no presente. Após a geração de ditas variantes, o quadro de variantes é

15 submetido à seleção conforme descrito no presente e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais testes relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

Outro tipo de variante de aminoácido do antagonista de célula B altera o padrão original de glicosilação do antagonista de célula B. Por

20 alteração, designa-se a deleção de uma ou mais unidades de carboidrato encontradas no antagonista de célula B e/ou adição de um ou mais sítios de glicosilação que não estejam presentes no antagonista de célula B.

A glicosilação de polipeptídeos é tipicamente N-ligada ou O-ligada. N-ligado designa a ligação da unidade carboidrato à cadeia lateral de

25 um resíduo de asparagina. As seqüências de tripeptídeos asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido exceto a prolina, são as seqüências de reconhecimento para a ligação enzimática da unidade carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Por essa razão, a presença de

qualquer uma dessas seqüências de tripeptídeos em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação potencial. Glicosilação O-ligada designa a ligação de um dos açúcares, N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um ácido hidroxiamino, mais comumente serina ou treonina, embora também possam ser
5 utilizadas 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina.

A adição de sítios de glicosilação ao antagonista de célula B é alcançada de forma conveniente através da alteração da seqüência de aminoácidos, de forma que contenha uma ou mais das seqüências de tripeptídeos descritas acima (para sítios de glicosilação N-ligados). A alteração
10 pode também ser realizada através da adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina à seqüência do antagonista de célula B original (para sítios de glicosilação O-ligados).

Quando o anticorpo compreende uma região Fc, o carboidrato ligado a tal anticorpo pode ser alterado. Por exemplo, anticorpos com uma
15 estrutura de carboidrato madura que não contém fucose ligada a uma região Fc do anticorpo, são descritos no pedido de patente US 2003/0157108. Anticorpos com N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisseccionada no carboidrato ligado a uma região Fc do anticorpo são indicados no documento WO 03/011878 e na patente US 6.602.684. Anticorpos com pelo menos um resíduo de galactose no
20 oligossacarídeo ligado a uma região Fc do anticorpo são relatados no documento WO 97/30087. Vide, também os documentos WO 98/58964 e WO 99/22764 referentes a anticorpos com carboidrato alterado ligados a sua região Fc.

Moléculas de ácidos nucléicos que codificam variantes da seqüência de aminoácidos do antagonista de célula B são preparadas através
25 de uma série de métodos conhecidos na técnica. Ditos métodos incluem, mas sem limitar-se a, o isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes de seqüências de aminoácidos de ocorrência natural) ou preparação através de mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou sítio-dirigida),

mutagênese por PCR e mutagênese de cassete de uma variante preparada anteriormente ou uma versão não-variante do antagonista de célula B.

Pode ser desejável modificar o antagonista de célula B de acordo com a presente invenção com relação à função efetora, por exemplo, de forma a aumentar a citotoxicidade mediada por célula dependente de antígeno (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) do antagonista de célula B. Isso pode ser alcançado através da introdução de uma ou mais substituições de aminoácidos em uma região Fc do antagonista de célula B. Alternativa ou adicionalmente, resíduo(s) de cisteína pode(m) ser introduzido(s) na região Fc, de forma a permitir a formação de ligação de dissulfeto intercadeias nessa região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode possuir capacidade de internalização aprimorada e/ou morte celular mediada por complemento aprimorada e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Vide Caron *et al.*, *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, B., *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com atividade antitumoral aprimorada podem também ser preparados através da utilização de reticulantes heterobifuncionais, conforme descrito em Wolff *et al.*, *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, pode ser construído um anticorpo que possui regiões Fc duplas e pode, portanto, apresentar capacidades aprimoradas de ADCC e lise mediada por complemento. Vide Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989). O documento WO 00/42072 descreve anticorpos com função ADCC aprimorada na presença de células efetoras humanas, em que os anticorpos compreendem substituições de aminoácidos na região Fc.

Os anticorpos com ligação C1q alterada e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) estão descritos no documento WO 99/51642, patentes US 6.194.551 B1, US 6.242.195 B1, US 6.528.624 B1 e US 6.538.124. Os anticorpos compreendem uma substituição de aminoácido em

uma ou mais das posições de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 e/ou 334 de sua região Fc.

Para aumentar a meia vida do antagonista de célula B no soro, pode-se incorporar um epítipo de ligação do receptor recuperado ao antagonista de célula B (especialmente um fragmento de anticorpo), conforme descrito, por exemplo, na patente US 5.739.277. Da forma como utilizada no presente, a expressão "epítipo de ligação do receptor recuperado" designa um epítipo da região Fc de uma molécula de IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄) que é responsável pelo aumento da meia vida em soro in vivo da molécula de IgG. Anticorpos com substituições em uma de suas regiões Fc e maior meia-vida em soro também estão descritos no documento WO 00/42072.

Anticorpos elaborados com três ou mais (preferencialmente quatro) sítios de ligação de antígenos funcionais também são contemplados (pedido de patente US 2002/0004587).

15 **FORMULAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DOS ANTAGONISTAS DE CÉLULA B**

Os antagonistas de célula B da invenção são preferencialmente administrados aos pacientes sob a forma de formulações terapêuticas. As formulações terapêuticas dos antagonistas de célula B utilizados de acordo com a presente invenção são preparadas para a armazenagem por meio da mistura de um antagonista de célula B que possua o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis opcionais (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são atóxicos para pacientes nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos, antioxidantes que incluem ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; álcool

fenólico, butílico ou benzílico; alquilparabenos tais como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; cicloexanol; 3-pentanol e meta-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros
5 hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares, tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contra-íons formadores de sais tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos
10 protéicos de Zn); e/ou tensoativos não-iônicos, tais como Tween®, Pluronic® ou polietilenoglicol (PEG).

Exemplos de formulações de anticorpos anti-CD20 estão descritos no documento WO 98/56418. Essa publicação descreve uma formulação líquida de múltiplas doses que compreende 40 mg/ml de rituximab,
15 25 mM de acetato, 150 mM de trehalose, álcool benzílico a 0,9%, polissorbato 20 a 0,02% em pH 5,0 que possui uma vida mínima de armazenagem de 2 anos a 2-8 °C. Outra formulação anti-CD20 de interesse compreende 10 mg/ml de rituximab em 9,0 mg/ml de cloreto de sódio, 7,35 mg/ml de diidratocitrato de sódio, 0,7 mg/ml de polissorbato 80 e Água Estéril para Injeção, pH 6,5.

20 As formulações liofilizadas adaptadas para administração subcutânea estão descritas na patente US 6.267.958. Tais formulações liofilizadas podem ser reconstituídas com um diluente apropriado até uma alta concentração de proteína e a formulação reconstituída pode ser administrada por via subcutânea no mamífero a ser tratado no presente.

25 A formulação do presente pode também conter mais de um composto ativo, conforme o necessário para a indicação específica sendo tratada, preferencialmente, aqueles com atividades complementares que não se prejudiquem entre si. Pode ser desejável, por exemplo, fornecer

adicionalmente um agente citotóxico, agente quimioterápico, citocina, inibidor da via do TGF- β (por exemplo, anticorpo monoclonal, peptídeo, antagonistas de moléculas pequenas, inibidor da ativação do TGF- β), receptor de integrina, ou agente imunossupressor (por exemplo, um que aja sobre células T, tal como a ciclosporina ou um anticorpo que se ligue a células T, por exemplo, um que se ligue a LFA-1). A quantidade eficaz desses outros agentes depende da quantidade de antagonista presente na formulação, do tipo de doença, disfunção ou tratamento e de outros fatores.

Os antagonistas de célula B podem também ser inseridos em microcápsulas preparadas, por exemplo, por meio de técnicas de coacervação ou polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou de gelatina e microcápsulas de poli-(metacrilato de metila), respectivamente, em sistemas de fornecimento de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Tais técnicas estão descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A., Ed. (1980).

Podem ser fabricadas preparações de antagonista de célula B de liberação controlada. Exemplos apropriados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contenham o antagonista de célula B, que se encontram na forma de artigos moldados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação controlada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli-(metacrilato de 2-hidroxietila) ou poli-(álcool vinílico)), polilactídeos (patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de γ -etila, etilenovinilacetato não-degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico e ácido glicólico, tal como LUPRON DEPOT® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico e ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é facilmente conseguido por meio de filtragem através de membranas de filtragem estéreis.

O antagonista de célula B é administrado por qualquer meio apropriado, que inclui administração parenteral, subcutânea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal. As infusões parenterais incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. Além disso, o antagonista de célula B pode ser adequadamente administrado por meio de infusão de pulso, por exemplo, com doses decrescentes de antagonista de célula B. Preferencialmente, a dosagem é fornecida por meio de injeções intravenosas, dependendo, em parte, se a administração é breve ou crônica.

Em algumas incorporações exemplares da invenção, os antagonistas de célula B são administrados ao paciente (por exemplo, por via intravenosa), em uma dose entre 1 mg/m² e 500 mg/m². O antagonista de células B pode, por exemplo, ser administrado em uma dosagem de 1 mg/m², 2 mg/m², 3 mg/m², 4 mg/m², 5 mg/m², 10 mg/m², 15 mg/m², 20 mg/m², 25 mg/m², 30 mg/m², 35 mg/m², 40 mg/m², 45 mg/m², 50 mg/m², 55 mg/m², 60 mg/m², 65 mg/m², 70 mg/m², 75 mg/m², 80 mg/m², 85 mg/m², 90 mg/m², 95 mg/m², 100 mg/m², 105 mg/m², 110 mg/m², 115 mg/m², 120 mg/m², 125 mg/m², 130 mg/m², 135 mg/m², 140 mg/m², 145 mg/m², 150 mg/m², 155 mg/m², 160 mg/m², 165 mg/m², 170 mg/m², 175 mg/m², 180 mg/m², 185 mg/m², 190 mg/m², 195 mg/m², 200 mg/m², 205 mg/m², 210 mg/m², 215 mg/m², 220 mg/m², 225 mg/m², 230 mg/m², 235 mg/m², 240 mg/m², 245 mg/m², 250 mg/m², 255 mg/m², 260 mg/m², 265 mg/m², 270 mg/m², 275 mg/m², 280 mg/m², 285 mg/m², 290 mg/m², 295 mg/m², 300 mg/m², 305 mg/m², 310 mg/m², 315 mg/m², 320 mg/m², 325 mg/m², 330 mg/m², 335 mg/m², 340 mg/m², 345 mg/m², 350 mg/m², 355 mg/m², 360 mg/m², 365 mg/m², 370 mg/m², 375 mg/m², 380 mg/m², 385 mg/m², 390 mg/m², 395 mg/m² ou 400 mg/m².

O antagonista de célula B pode ser administrado de acordo com uma grande variedade de cronograma de dosagens. (vide, por exemplo, pedido de Patente US* 2006/0002930). O antagonista de células B pode, por exemplo, ser administrado uma vez por dia por um determinado período de tempo (por exemplo, de quatro a oito semanas, ou mais), ou de acordo com um cronograma semanal (por exemplo, um dia por semana, dois dias por semana, três dias por semana, quatro dias por semana, cinco dias por semana, seis dias por semana ou sete dias por semana) por um determinado período de tempo (por exemplo, de quatro a oito semanas, ou mais). Um exemplo específico de um cronograma de dosagem de "uma vez por semana" é administração do antagonista de célula B nos dias 1, 8, 15 e 22 do período de tratamento. Em exemplos de realizações alternativos o antagonista de célula B pode ser administrado intermitentemente, durante um período de meses. O antagonista de células B pode, por exemplo, ser administrado semanalmente durante três semanas consecutivas duas vezes por ano (ou seja, repetir a posologia semanal, de seis em seis meses). Será apreciado que tais regimes de administração possam ser prolongados por períodos maiores (na ordem de anos) para manter o efeito terapêutico benéfico fornecido pelos primeiros tratamentos. Em outros exemplos de realização, tais terapias de manutenção do tratamento podem ser realizadas na seqüência de um regime posológico agudo designado para reduzir os sintomas imediatos da doença fibrótica.

A quantidade de antagonista de célula B administrado de cada vez por todo o período de tratamento pode ser a mesma; alternativamente, a quantidade administrada de cada vez durante o período de tratamento pode variar (por exemplo, a quantidade administrada num dado momento pode ser maior ou menor do que a quantidade administrada anteriormente). Por exemplo, a dose administrada durante a terapia de manutenção pode ser menor do que a dose administrada durante a fase aguda do tratamento. O

cronograma de dosagem adequado depende da situação específica que será perceptível para aqueles hábeis na técnica.

Além da administração de proteína de antagonistas de célula B ao paciente, o presente pedido contempla a administração de antagonistas de
5 célula B por meio de terapia gênica. Tal administração de ácido nucléico codificador do antagonista de célula B é englobada pela expressão “administração a um paciente com necessidade de tal tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz de antagonista de célula B”. Vide, por exemplo, o documento WO 96/07321 referente à utilização da terapia gênica
10 para gerar anticorpos intracelulares.

Existem duas abordagens principais para a colocação do ácido nucléico (opcionalmente contido em um vetor) nas células do paciente: *in vivo* e *ex vivo*. Para fornecimento *in vivo*, o ácido nucléico é injetado diretamente no paciente, normalmente no local em que é necessário o antagonista de célula B.
15 Para tratamento *ex vivo*, as células do paciente são removidas, o ácido nucléico é introduzido nessas células isoladas e as células modificadas são administradas ao paciente diretamente ou, por exemplo, encapsuladas em membranas porosas que são implantadas no paciente (vide, por exemplo, as patentes US 4.892.538 e US 5.283.187). Existe uma série de técnicas
20 disponíveis para a introdução de ácidos nucléicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo da transferência ou não do ácido nucléico para células cultivadas *in vitro* ou *in vivo* nas células do hospedeiro desejado. Técnicas apropriadas para a transferência de ácido nucléico para células de mamíferos *in vitro* incluem a utilização de lipossomos, eletroporação,
25 microinjeção, fusão celular, DEAE-dextrano, método de precipitação de fosfato de cálcio etc. Um vetor comumente utilizado para fornecimento *ex vivo* do gene é um retrovírus.

Exemplos de técnicas de transferência de ácido nucléico *in vivo*

atualmente preferidas incluem transfecção com vetores virais (tais como adenovírus, vírus Herpes simplex I ou vírus adeno-associado) e sistemas com base em lipídeos (lipídeos úteis para transferência mediada por lipídeos do gene são, por exemplo, DOTMA, DOPE e DC-Chol). Em algumas situações, é

5 desejável fornecer a fonte de ácido nucléico com um agente que dirija as células alvo, tal como um anticorpo específico para uma proteína de membrana da superfície celular ou a célula alvo, um ligante para um receptor sobre a célula alvo etc. Ao empregar-se lipossomos, as proteínas que se ligam a uma proteína de membrana da superfície celular associada à endocitose podem ser

10 utilizadas para dirigir e/ou facilitar a absorção, por exemplo, de proteínas capsídicas ou seus fragmentos trópicos para um tipo celular específico, anticorpos para proteínas que sofrem internalização na ciclização e proteínas que dirigem localização intracelular e aumentam a meia vida intracelular. O método de endocitose mediada por receptor é descrito, por exemplo, por Wu *et*

15 *al.*, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987); e Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3410-3414 (1990). Para análise dos protocolos de terapia gênica e marcação gênica atualmente conhecidos, vide Anderson *et al.*, *Science* 256:808-813 (1992). Vide também o documento WO 93/25673 e as referências nele mencionadas.

20 COMBINAÇÕES DE ANTAGONISTAS DE CÉLULA B E OUTROS AGENTES

Em certos exemplos de realização da invenção, vários tipos de antagonista de célula B são combinados entre si e administrado a um paciente para tratar uma ou mais condição de fibrose. Por exemplo, a invenção inclui métodos para o tratamento de doenças fibróticas que compreende administrar

25 a um paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo contra o CD20 (por exemplo, o rituximab) e um antagonista BAFF como descrito no presente e em outros locais como no pedido de Patente US 2005/0095243 que está incorporada ao presente em sua totalidade pela referência. Quando vários

antagonistas de célula B são administrados a um paciente, os diferentes antagonistas de célula B podem ser administrados em conjunto em uma única composição farmacêutica, ou, de preferência, pode ser administrado seqüencialmente em doses separadas em qualquer ordem.

5 A presente invenção também inclui métodos para o tratamento de doenças fibróticas que compreende administrar a um paciente com necessidade de tal tratamento uma combinação composta por um primeiro e um segundo agente, onde o primeiro agente é uma antagonista de célula B e, o segundo agente é um agente útil para tratar uma ou mais doenças fibróticas,
 10 mas não é necessariamente um antagonista de célula B. Por exemplo, de acordo com certos exemplos de realização da invenção, um antagonista de célula B é administrado a um paciente juntamente com um antagonista de um ou mais receptores de integrina (por exemplo, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$ e etc.), incluindo anticorpos, polipeptídeos antagonistas e/ou antagonistas
 15 de moléculas pequenas específicas para um ou mais receptores de integrina (por exemplo, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, etc). (Patentes US 6.652.856 e US 6692741, e pedidos de Patentes US 2004/0248837, US 2004/0208878, US 2002/0004482, US 2005/0255102, US 2005/0226885). Um exemplo de anticorpo que se liga especificamente ao receptor de integrina
 20 $\alpha_4\beta_1$, e que pode ser usado em combinação com uma antagonista de célula B para o tratamento de uma doença fibrótica, no âmbito da presente invenção é o natalizumab (Tysabri®), conforme definido no pedido de patente US 2005/0276803.

Em certos exemplos de realização deste aspecto da invenção, o
 25 segundo agente que é administrado com um antagonista de célula B é, por exemplo, um esteróide, um agente citotóxico, colquicina, oxigênio, antioxidante (por exemplo, N-acetilcisteína), agente quelante de metal (Por exemplo, tetratiomolibdato), IFN- γ , ou antitripsina-alfa. O segundo agente, em

determinados exemplos de realização, pode ser um inibidor da Btk, incluindo, por exemplo, moléculas pequenas inibidoras de Btk. O segundo agente, em determinados exemplos de realização, pode ser um inibidor de TWEAK, incluindo, por exemplo, anticorpos e moléculas pequenas inibidoras de TWEAK. Ainda em outros exemplos de realização, o segundo agente pode englobar uma antagonista LTBR (por exemplo, um anticorpo ou proteína de fusão solúvel); vide USPN 7.030.080 e 7.001.921; ou de um antagonista da TRAIL - R2.

De acordo com certos exemplos de realização deste aspecto da invenção, o segundo agente que é administrado com o antagonista de célula B pode ser, por exemplo, um inibidor da via de sinalização do TGF- β . Exemplos de inibidores da via de sinalização do TGF- β que podem ser utilizados no âmbito da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, anticorpos, peptídeos de sequência sintética ou nativa e moléculas pequenas que inibem ou antagonizam um ou mais componentes da via de sinalização do TGF- β , incluindo, por exemplo, Ang II, IL-1, IL-4, IL-10, IL-13, MIF, PDGF, RAGE, AGE, TNF- α , trombospondina-1, VLA-1, SMAD-2, SMAD-3 (pedido de Patente US 2003/0139366), SMAD-4, ERK, p15, Ink4b, p21 Waf1, p27Kip1, p38, CTGF (pedido de Patente US 2004/0248206), PAI-1, PTHrP, Endotelina-1, Farnesóide X, HGF, IGF-1, MMP-1, MMP-9, PGE2, Hidroxilase propil, procolágenos, fibrilina, TEVIP, CXCR4, CXCL12, CCR2, CCL2, CCL-7 e CCL-22. Outros exemplos de inibidores da via de sinalização do TGF- β que podem ser utilizados no âmbito da presente invenção incluem, por exemplo, antagonista de receptor e TGF- β ligante, incluindo, por exemplo, anticorpos, proteína de fusão TGF- β RII-Fc solúvel, proteína de fusão PAL-Fc, inibidores da quinase TGF- β RI ou RII, inibidores de moléculas pequenas a jusante do TGF- β RII.

Outros agentes que podem ser administrados com um antagonista de célula B, no âmbito da presente invenção incluem, por exemplo,

pirfenidona, antagonistas da endotelina, inibidores do TNF-alfa, inibidores de PDGF, inibidores de CTGF, antagonistas de CD40 ligante (USPN 6.506.383), BCMA-Ig, inibidores da P38 MAP quinase, prednisona, Cytoxan, e azatioprina.

- Exemplos específicos de produtos clínicos que podem ser usados em combinação com um antagonista de célula B para tratar uma doença fibrótica no contexto da atual invenção incluem aqueles listados na Tabela 3.

TABELA 3

Nome do Produto	Descrição	Desenvolvido por
trastuzumab (Herceptin®)	Anticorpo anti-Her2/neu	Genentech
pertuzumab (Omnitarg™)	Anticorpo anti-Her2	Genentech
cetuximab (Erbix®)	Anticorpo quimérico anti-EGFR	Imclone
gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®)	Anticorpo anti-CD33 (p67)	Celltech/Wyeth
alefacept (Amevive®)	Fusão anti-LFA-3 Fc	Biogen Idec
infliximab (Remicade®)	Anticorpo anti-TNF- α	Centocor
adalimumab (Humira®)	Anticorpo anti-TNF- α	Abbott
etanercept (Enbrel®)	Fusão anti-TNF- α – Fc	immunex/Amgen
natalizumab (Tysabri®)	Anticorpo anti- $\alpha_4\beta_7$ (VLA-4) e $\alpha_4\beta_7$	Biogen Idec
bevacizumab (Avastin™)	Anticorpo anti-VEGF	Genentech
omalizumab (Xolair™)	Anticorpo anti-IgE	Genentech
efalizumab (Raptiva™)	Anticorpo anti-CD 11	Genentech/Xoma
labetuzumab (CEA-Cide™)	Anticorpo anti-antígeno carcino-embriônico (CEA)	immunomedics
epratuzumab (LymphoCide™)	Anticorpo anti-CD22	immunomedics
visilizumab (Nuvion®)	Anticorpo anti-CD3	PDL

Nome do Produto	Descrição	Desenvolvido por
HuZAF™	Anticorpo anti-gama interferon	PDL
imatinib mesylate (Gleevec™)	Inibidor de Bcr-Abl tirosina quinase	Novartis
bosentan (Tracleer®)	Inibidor endotelina	Actelion
interferon gamma-lb (Actimmune®)	Estimulador do sistema imune	Intermune
abatacept (Orencia®)	Proteína de fusão CTLA-4-Fc	Bristol-Myers Squibb

KITS

A presente invenção inclui também kits para tratar doenças fibróticas. Os kits da invenção constam de um ou mais frascos onde pelo menos um dos frascos contém um antagonista de célula B. Qualquer um dos

5 antagonistas de célula B descritos em outros locais do presente poderá ser incluído no kit da invenção. Os kits da invenção pode também incluir um ou mais recipientes constando de um ou mais agentes adicionais que podem ser administrados em combinação com um antagonista de célula B para tratar uma doença fibrótica. Esses agentes estão descritos em outros locais do presente.

10 Os kits pode opcionalmente incluir um ou mais conjuntos de instruções para o tratamento de uma doença fibrótica. As instruções podem incluir, *inter alia*, informação relativas a quantidade de antagonista de célula B e/ou outros agentes a serem administrados ao paciente, o tempo e a frequência de administração, as vias de administração sugeridas, bem como, as

15 características e/ou sintomas mostrado pelos pacientes que receberam a administração do antagonista de célula B e/ou outros agentes.

Será de evidente imediato aos técnicos no assunto que outras modificações e adaptações adequadas aos métodos e aplicações aqui

descritas são óbvias e podem ser feitas sem sair do escopo da invenção e de qualquer incorporação. Tendo agora descrita em detalhes a presente invenção, a mesma será mais claramente entendida pela referência aos seguintes exemplos, que são incluídas aqui somente para fins de ilustração e não como

5 forma de limitação da invenção.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

ATENUADO A FIBROSE HEPÁTICA NA AUSÊNCIA DE CÉLULAS B

INTRODUÇÃO

10 As características de doenças hepáticas crônicas como, por exemplo, degeneração hepática induzida pelo álcool, infecção por hepatite C, esteatohepatite não-alcoólica, são inflamações crônicas, danos celulares, regeneração e fibrose. Todas essas características podem ser incitadas por danos hepáticos induzido tetracloreto de carbono (CCl₄). (Jungermann e Katz,

15 *Physiol. Rev.* 69:708-764 (1989); Friedman, *Semin. Liver Dis.* 19:129 - 140 (1999)). Neste exemplo, a fibrose induzida por CCl₄ foi avaliada em camundongos tipo selvagens deficientes de célula B.

Em um modelo alternativo, a lesão hepática é induzida por uma toxina biliar um α -naftilisotiocianato (ANIT), mimetizando a cirrose biliar e a

20 colangite esclerosante. (Tjandra *et al Hepatology* 57:280-290 (2000)). A ANIT, semelhantemente ao CCl₄, induz a uma hepatotoxicidade não imune-direcionada seguido por respostas inflamatórias e fibróticas, porém em uma outra localização anatômica hepática em comparação ao CCl₄.

Após 6 semanas de tratamento com CCl₄, a análise histoquímica

25 mostrou redução significativa na deposição de colágeno nos camundongos deficientes de célula B, em comparação aos camundongos similarmente tratados do tipo selvagem. Além disso, foi analisado camundongos com número normal de células B, mas com deficiência de células T, e foi

estabelecido que células B contribuem para a fibrose de maneira independente das células T. Camundongos JH ^{-/-} tratados mostraram resultados semelhantes ao que diz respeito à deposição colágeno.

MATERIAL E MÉTODOS

5

CAMUNDONGO

Salvo se indicação de outra maneira, os camundongos foram mantidos em um biotério livre de agentes patogênicos na Biogen Idec (Cambridge, MA). Todos os procedimentos animais foram aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* da Biogen Idec. Os camundongos machos das linhagens listadas na Tabela 4 tinham que pesar 20g ou mais e ter pelo menos 6 semanas de idade para serem incluídos no estudo.

TABELA 4

Mutante	Controle	Fonte Comercial
JH ^{-/-} (001147-M)	BALB/c (BALB)	Taconic, Germantown, NY
MHCII ^{-/-} (ABBN12-M)	C57BL/6Tac (B6)	Taconic
b2m ^{-/-} (B2MN12-M)	C57BL/6Tac (B6)	Taconic
RAG2 ^{-/-} (000601-M)	BALB/c (BALB)	Taconic
TCR5 ^{-/-} (002120)	C57BL/6 (000664)	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME
BAFFtg *	C57BL/6 (000664)	The Jackson Laboratory
mIgM-Tg ^{fl}	BALB/c (BALB)	Taconic
LPM2a ^s	BALB/cAnNCrIBr	Charles River, Wilmington, MA

* Vide, Mackay *et al*, *J. Exp. Med.* 190:1697-1710 (1999).

[¶] Vide, Chan *et al*, *J. Exp. Med.* 759:1639-1648 (1999).

[§] vide, Casola *et al*, *Nat. Immunol* 5:317-327 (2004).

MODELOS DE LESÃO POR CCl₄ E ANIT

Uma mistura de CCl₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), com óleo mineral (Sigma-Aldrich), foi entregue por gavagem em um volume não excedendo 0,2ml com uma agulha de alimentação. Experimentos foram realizados utilizando uma dose de 3,5mg/kg ou 1,75mg/kg de CCl₄. A última dose foi preferida porque reduziu a morbidade / mortalidade e ainda induziu mudanças na alanina aminotransferase (ALT) no soro e níveis de deposição de colágeno comparável à dose mais elevada. Para uma experiência de período prolongado, camundongos foram gavados uma vez por semana durante 6 semanas. Experimentações a curto prazo, incluíram a administração de CCl₄.

ANIT (1-naftil isotiocianato, Sigma - Aldrich Corp) foi dissolvido em óleo mineral (Sigma - Aldrich) a 30 mg/ml. Os camundongos foram gavados com 50 mg/Kg duas vezes por semana, durante 8 semanas.

Níveis séricos de ALT foram mensurados 24 horas após a administração de CCl₄. Uma semana após a 6ª semana de gavagem ou no dia indicado após a gavagem única, camundongos foram sacrificados e três diferentes lobos do fígado foram excisados e incubados em 4% de PFA em PBS por 2 dias antes do emblocamento para as análises imuno-histoquímicas adicionais.

ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS HEPÁTICOS

Os camundongos foram eutanasiados por inalação de CO₂. A veia porta hepática foi canulada com uma agulha 25G e perfundida com 10 ml de PBS frio. Após a remoção da vesícula biliar, o fígado foi cortado em segmentos e passada através de uma peneira de 70µm (BD Falcon, Bedford, MA), em 50 ml de RPMI/5% FBS gelado. O fígado foi centrifugado a 300g por 10 minutos a 4°C em um tubo de 50 ml por fígado. O *pellet* foi ressuspenso em 10 ml de

0,02% de colagenase IV (Sigma - Aldrich Corp), em RPMI 1640 e deixado por 45 minutos a 37 °C. e 30 ml de RPMI/5% FBS gelado foi adicionado a cada tubo, e então centrifugado por 3 minutos a 30g. O *pellet* foi descartado. O sobrenadante foi centrifugado durante 10 minutos a 300g a 4°C. A *pellet* de células foram ressuspensas em 6 ml de RPMI 1640 gelado (ou em 45% percoll) (Amersham Biosciences, Suécia) e colocado sob metrizamida 24% (Sigma-Aldrich Corp), em PBS (ou com 70% Percoll, respectivamente) . Seguido pela centrifugação a 1000g durante 20 minutos a 4 °C. Lymphocytes na interface foram colhidas, lavadas com RPMI/5% FBS e utilizadas para as análises posteriores.

O grau de contaminação dos linfócitos intrahepáticos por linfócitos do sangue é provavelmente mínimo, como os resultados indicam um aumento específico das células NK-T do fígado e uma relação diferente de inserções N nucleotídeos nas junções V-D e D-J nos linfócitos B intra-hepáticos (3,5 e 4,4) , Em comparação as células B do sangue (4,5 e 3,4, vide também Resultados).

ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS B DO BAÇO, SANGUE E CAVIDADE PERITONEAL

Os baços foram moídos através de uma malha de Nylon (Cell Strainer; BD Falcon, Bedford, MA) para obter uma suspensão de célula única em DMEM, 5% FCS, e 2 mM de L-glutamina. Eritrócitos foram lisados pela incubação em tampão de lise (140 mM de NH₄Cl, 17 mM de Tris-HCl, pH 7,65) por 3 minutos no gelo. O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA (BD Pharmingen, San Diego, CA). Para isolar os linfócitos, 200 µl de sangue foi colocado sob- Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Suécia) e centrifugadas a 1000g em RT durante 20 minutos. Linfócitos foram coletados a partir da interface. A cavidade peritoneal (PC) foi lavada com 5 ml de DMEM, 5% FCS, e 2 mM de L-glutamina para recolher leucócitos da PC. Após estes procedimentos, os linfócitos foram lavados duas vezes em DMEM, 5% FCS, e 2 mM de L-glutamina e centrifugados por 300g a 4 ° C e ressuspensos em

PBS/BSA/azida para análise por citometria de fluxo ou para estudos de proliferação em meios de cultura.

CITOMETRIA DE FLUXO

A coloração por fluorescência foi realizada como descrito anteriormente. (Forster e Rajewsky, *Eur. J. Immunol.* 17:521-528 (1987)). A AnexinaV, 7AAD, e anticorpos específicos para IgM, IgD, CD19, CD23, CD5, CD69, CD86, B220, MHCII, CD43, Mac-1, CD4, CD8 (BD Pharmingen, San Diego CA) ou CD21 (Ebioscience, San Diego, CA), foram utilizados. Anticorpos foram conjugado com FITC, PE, APC, PerCP, Cy-Chrome ou biotina. Foram detectados anticorpos biotinilados com estreptoavidina conjugados com PerCP. Células coradas foram fixadas e analisadas utilizando o FACScalibur (BD Biosciences).

ESTIMULAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS B MARCADAS COM CFSE

Para gerar uma solução de estoque, CFSE (Molecular Probes) foi dissolvido a 5mM em DMSO e armazenado a -80 °C. As células B esplênicas foram purificadas pelo enriquecimento com partículas MACS aliada a anticorpos anti-B220 (Miltenyi Biotec) sobre colunas magnéticas LS (Miltenyi Biotec), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram então lavadas duas vezes com RPMI 1640, e ressuspensas em 5×10^7 células/ml em uma concentração de 5mM de CSFE em RPMI 1640 morno por 10 min a 37 °C. As células foram então lavadas 3 vezes em RPMI 1640/5% FCS gelado, ressuspensas em RPMI 1640/5% FCS/ β ME/L- glutamina em 2×10^5 /100 μ L e transferidos para uma placa de 96 poços com 100 μ L por poço). Outros 100 μ L de RPMI foram adicionados aos reagentes estimulantes a uma quantidade de 2 vezes a concentração final. Os estímulos utilizados foram F(ab')₂ puro, fragmento cabra anti-IgM de camundongo (2,5 μ g/ml; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA), IL-4 (25U/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN), anticorpo anti-CD40 de camundongo (0,25 μ g/ml, Ebioscience), anticorpo anti-RP105

(10,5 µg/ml, Ebioscience), LPS (20 µg/ml, Sigma-Aldrich Corp).

IMUNO-HISTOQUÍMICA

Anticorpos específicos para alfa actina de músculo liso (clone 1A4, DakoCytomation, Carpinteria, CA), foi utilizado em uma diluição de 1:50
 5 com 30 minutos incubação. A recuperação antigênica mediante exposição do epítopo ao calor foi realizada em 10 mM de tampão Citrato, pH 6,0 por 30 segundos a 125°C, mantida a 90°C durante 10 segundos e levados a temperatura ambiente por mais 20 minutos antes de imuno-coloração. A ligação do anticorpo primário aos elementos do tecido foram detectados
 10 através de um kit de biotilação MM (Biocare Medical, Walnut Creek, CA), com o substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por 1 minuto.

O anticorpo específico F4/80 (clone CLA3-1, Serotec Inc., Raleigh, NC), foi utilizado em uma concentração de 20µg/ml por 30 minutos. As
 15 secções de tecido foram pré-tratadas com Proteinase K (DakoCytomation, Dinamarca) durante 5 minutos a temperatura ambiente. A ligação do anticorpo primário foi detectada utilizando um kit Vector Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA), utilizando o substrato DAB. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por 1 minuto.

20 A coloração por TUNEL foi realizada utilizando o kit de detecção de apoptose *In situ* ApopTag (Chemicon International, Temecula, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Células apoptóticas marcadas foram detectadas utilizando DAB/ cloreto de níquel como substrato. As lâminas foram contra-coradas durante 5 minutos com Verde Metila (Vector Laboratories,
 25 Burlingame, CA).

As fibras Colágenas foram detectadas pela coloração de *Sirius Red* (Luna, *Histopathologic Methods and Color Atlas of Special Stains and Tissue Artifacts: American HistoLabs Incorporated*. Pág 767. (1992)); A

coloração de H&E foi realizada conforme descrito em outros locais (Luna, *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. Nova Iorque: McGraw-Hill Book Company (1968)).

PCR E ANÁLISE DO REARRANJO DO GENE DE IG

5 O DNA foi extraído a partir de células CD19⁺selecionadas positivamente a partir de partículas magnéticas (Miltenyi Biotec), de acordo com o protocolo do fabricante do kit de isolamento Genomic DNA (Qiagen, Valencia, CA). O DNA (2 µl, equivalente a cerca de 10³ células B), foi usado para amplificação das articulações VDJ. Duas etapas de amplificação foram realizadas utilizando *primers*
 10 VHA, VHB e VHE 5 específicos para J558L, Q52 e 7183 famílias de V_H e *primer* JH4E 3' (16) para a primeira etapa e *primer* JH1 ou JH4A 3' para a segunda etapa do PCR (denominada *nested PCR*). Todos os *primers* foram sintetizados pela Biogen Idec. Vinte ciclos foram realizados para a primeira etapa (1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, e 1,5 minutos a 72 °C), e 30 ciclos foram realizados para a segunda
 15 etapa (1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 63 °C, e 1,5 minutos a 72 °C), utilizando 2µl da reação da primeira etapa como modelo. O fragmento de 0,4kD esperado foi purificado do gel e subclonado no vetor pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). O DNA a partir de diferentes colônias foi preparado e seqüenciado usando *primers* específicos de vetores padrões.

QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO INTERSTICIAL

20 Um total de 3 seções de um fígado (cada um de um lobo diferente), de cada animal foi corado. Fotos em preto e branco da coloração de *Sirius Red* foram feitas sob luz polarizada em ampliação de 5 vezes. Fotos foram realizadas de tal forma que o tecido hepático ocupou toda a área capturada pela câmara para garantir que o a área total da imagem fosse
 25 idêntica em cada foto (4-10 fotos por animal). Vasos que continham colágeno constitutivamente foram eletronicamente removidos de cada imagem. A quantidade aproximada de coloração branca (colágeno intersticial), foi

quantificado pelo *software* de análise de imagem MetaMorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). Quantificação é exibida em unidades arbitrárias (1 correlaciona a 1000 *pixels*). A quantidade absoluta de área branca não pode ser comparada diretamente entre os diferentes experimentos, uma
5 vez que variava a intensidade da coloração de *Sirius Red*.

RESULTADOS

CÉLULAS B REPRESENTAM A MAIOR POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS NO FÍGADO

As células B têm sido extensivamente estudadas no fígado embrionário, o principal local da hematopoiese no desenvolvimento
10 embrionário. No entanto, pouco se sabe sobre hepática as células B hepáticas nos adultos. Neste exemplo, células B intra-hepáticas (DH) foram fenotipicamente e funcionalmente caracterizadas.

Após o enriquecimento da população de linfócitos do fígado perfundido com PBS, a proporção de células IHB foi quantificada pela
15 coloração para CD 19, um marcador específico da linhagem B. Em ambos os camundongos BALB/c e C57BL/6, as células B representam cerca de 50% dos linfócitos IH (intervalo de 30-60%, FIG. 1A e dados não apresentados). O número absoluto de células B isoladas de um fígado foi $\sim 2 \times 10^6$. CD19⁺ de células IHB que mostram expressar IgM, IgD, B220, MHCH, e CD62L em níveis
20 semelhantes aos seus homólogos esplênicos (FIG. 1A e B e dados não apresentados). Células IHB não expressam CD43 e Mac-1 marcadores típicos de células BI ou células B imaturas (dados não apresentados). células IHB expressam CD5 em quantidades mais elevadas do que o detectado em células B do sangue, mas em quantidades inferiores ao observado em células B da
25 cavidade peritoneal (FIG. 1B). Altos níveis de CD5 são indicativos da ativação de células B convencionais. (Cong *et al.*, *Int. Immunol.* 3:467-476 (1991)). Células IHB expressam CD23, mas a um nível menor que células B esplênicas ou células B sanguíneas. A expressão de CD21 na superfície também é

ligeiramente menor para células IHB do em células B esplênicas, mas superior em células B do sangue (FIG. 1B). Tomadas em conjunto, no que se refere à expressão desses marcadores, as células B do fígado são mais semelhantes às de células B folicular esplênicas.

5 CÉLULAS B HEPÁTICAS SÃO FUNCIONALMENTE COMPETENTES

Como fígado é freqüentemente considerado como um destino para os linfócitos degenerados (Crispe *et al*, *Immunol. Rev.* 174:47-62 (2000)), foi determinado se células IHB são pró-apoptóticas usando anexina V, que se liga ao fosfolípido fosfatidilserina (PS), se transloca do interior para a camada
10 externa da membrana celular como células que sofrem apoptose. A anexina V vinculada em até 30% de células B hepáticas, em comparação com ~15% de células B esplênicas (FIG. 1C e dados não apresentados). Assim, a maior parte das células B hepáticas, não mostra uma predisposição a apoptose, bem como o maior número de células apoptóticas no fígado, em comparação com baço
15 pode estar relacionada com diferenças no isolamento d linfócitos.

A capacidade proliferativa de linfócitos B em resposta a reticulação de receptores mitogênicos e de células B é uma importante característica funcional, que difere substancialmente dos outros subtipos de célula B. (Morris e Rothstein, *J. Exp. Med.* 777:857-861 (1993); Philips *et al.*
20 *Immunol. Cell. Biol.* 7 (5:332-342 (1998); Erickson *et al* 2001. *J. Immunol.* 166:1531-1539 (2001)). Células B hepática e esplênica foram comparadas pela sua extensão da proliferação e supraestimulação de moléculas co-estimulatórias, como o CD86 (B7.2) e MHCH, em resposta a vários estímulos. Curiosamente, a resposta proliferativa das células IHB foi muito semelhante ao
25 dos linfócitos B esplênicos (FIG. 1D): a resposta a estimulação de receptores Toll Like 4, RP105 e CD40 foi a mesma, enquanto resposta a reticulação com IgM foi maior na ausência, mas não na presença da IL-4. A maior resposta proliferativa a reticulação com IgM só pode refletir melhor sobrevivência da

células IHB em cultura sem um fator exógeno de sobrevivência como a IL-4, e é consistente com um estado de célula IHB ativada sugerido pela supraregulação de CD5 (FIG. 1B). A extensão da supraregulação de MHCH, CD86 e CD5 por todos os estímulos testados foi muito semelhante para as

5 células B hepática e esplênica (FIGS. 1B, D e dados não apresentados).

CÉLULAS IHB PARECEM CÉLULAS B2 ESPLÊNICAS E NÃO SÃO DE ORIGEM

EMBRIONÁRIA DO FÍGADO

Células B hepáticas adultas podem representar geração de células B residuais hepáticas a partir de células embrionárias de fígado.

10 Alternativamente, células IHB podem ser derivadas da medula óssea (BM), assim como células B derivadas do baço de um organismo adulto. Para abordar a origem das células B intrahepáticas, a análise genéticas do rearranjo de seus VDJ foram realizadas. Poucas inserções de nucleotídeos não-moldado (N, P) são vistas nas junções VDJ de células B neonatais geradas no fígado

15 embrionário, semelhante ao que foi relatado para células B1. (Feeney, *J. Exp. Med.* 172:1377-1390 (1990); Gu *et al.*, *EMBO J.* 9:2133-2140 (1990); Meek, *Science* 250:820-823 (1990)). Em contraste, células B esplênicas e do sangue adultas possuem extensas adições nucleotídeos não-moldado. (Kantor *et al.*, *J. Immunol.* 755:1175-1186 (1997); Kepler *et al.*, *J. Immunol.* 757:4451-4457

20 (1996)). As seqüências CDR3 obtidas a partir de linfócitos adultos de fígado agrupados foram comparadas com as células B derivadas do baço de camundongos com 2 dias de idade ou células B do sangue de camundongos adultos. Células IHB de adultos se diferem acentuadamente em relação às células B de neonatais e lembram células B2 sanguíneas do baço ou células B

25 do sangue recirculantes em suas seqüências VDJ. O número médio de nucleotídeos N, P em células B de neonatais é 0,5 para a junção VD e 0,1 para a junção DJ. Esta é notavelmente diferente de 3,5 (ou 4,5), para VD e 4,4 (ou 3,4) para as junções DJ de células B adultas no fígado (ou sangue).

Curiosamente, células B do fígado e sangue adultos também parecem diferir no tamanho das junções VD e DJ; esta diferença está na fronteira de ser estatisticamente significativa; $p = 0,1$, no teste T de Student. Células IHB têm menos N, P nucleotídeos em suas junções VD do que em suas junções DJ, o
 5 inverso do que é relatado para células B2 em adultos. (Kantor *et al. Immunol.* 755:1175-1186 (1997)). A diferença no comprimento das inserções N, P nas células IHB de sangue adultos poderiam ser resultado da seleção de células B intrahepática. Além disso, a diferença reforça a noção de que células B hepáticas representam uma verdadeira população intra-hepática sem
 10 contaminação significativa por células B do sangue periférico.

PAPEL DA CÉLULA B NA FIBROSE HEPÁTICA

Para avaliar o papel fisiológico das células B que podem desempenhar um papel importante no fígado, a doença hepática foi induzida e a progressão da doença foi comparada em camundongos deficientes de
 15 células B e camundongos WT. O modelo de lesão hepática induzida por CCl_4 foi utilizado, onde uma pronunciada lesão necro-inflamatória, ocorreu em cada administração de CCl_4 , seguida por uma resposta de reparação crônica. Este modelo foi considerada como tendo uma vantagem sobre muitos outros modelos de lesão hepática amplamente utilizados (por exemplo, por
 20 *Schistosoma*, LPS, ConA), porque o insulto tóxico induz a hepatotoxicidade geral, em vez de, alvejar *a priori* uma parte específica do sistema imunológico. No entanto, curiosamente, verificou-se que a células B do fígado são particularmente sensíveis à aplicação de CCl_4 . Uma quantidade de Célula IHB diminuíram em aproximadamente 10 vezes 1 dia após o tratamento com CCl_4
 25 em oposição a outros linfócitos intrahepáticos (células NK-T, células T), que permaneceram inalterados neste ponto (dados não apresentados). No dia 5 após a injeção de CCl_4 , o número de células B números foi recuperado (dados não apresentados).

Para testar se células B têm um papel na lesão e reparação hepática, foi utilizados camundongos deficientes de células B com hepatotoxicidade induzida por CCl₄. A linhagem de camundongos deficientes de células B foi escolhida para conduzir a análise da deleção alvo na região J_H do gene da imunoglobulina de cadeia pesada, que se opõe montagem da codificação do gene da cadeia pesada, assim, evita a geração de célula B e anticorpos. (Chen *et al.*, *Int. Immunol.* 5:647-656 (1993)). Estes camundongos deficientes de células B são mencionados neste documento como camundongos JH^{-/-}.

A extensão da lesão dos hepatócitos induzidas pelo CCl₄, avaliada pela liberação específica da enzima ALT pelos hepatócitos no soro 24 horas após o tratamento com CCl₄, foi semelhante nos camundongos JH^{-/-} e camundongos BALB/c WT (FIG. 2A). É também evidente a partir de análise histológica (FIG. 3 e vide abaixo). Curiosamente, porém, houve uma grande diferença em termos de quantidade de fibras de colágeno depositada; camundongos JH^{-/-} tinham cerca de 6-8 vezes menos deposição de colágeno intersticial comparados com camundongos WT uma semana após a sexta dose semanal qualquer 1,75 ou 3,5 mg/Kg de CCl₄ (FIGs. 2B e 2C). Não houve alterações significativas observadas quanto ao número ou localização de macrófagos F4/80⁺ e produção de actina de músculo liso por miofibroblastos após 6 tratamentos com CCl₄ (dados não apresentados). Assim, células B parecem constituir uma população de células não-redundantes necessárias para o desenvolvimento de modificações fibróticas no fígado em resposta ao tratamento com CCl₄.

Para testar se a função das células B está limitada ao caso específico da lesão induzida pelo CCl₄ ou, em vez disso, desempenha um papel mais geral na reparação do tecido hepático, a hepatotoxicidade foi induzida com 1-naftilisotiocianato (ANIT), como o ANIT causas destruição do

figado por um mecanismo distinto do induzido pelo CCl₄. A hepatotoxicidade induzida pelo ANIT manifesta-se como necrose dependente de neutrófilo nas células epiteliais do ducto biliar e células parenquimatosas hepática. (Hill *et al.*, *Toxicol. Sci.* 47:118-125 (1999)). Após 8 semanas do tratamento com ANIT, verificou-se que os camundongos JH -/- tinham uma deposição de colágeno cerca de 7 vezes menor do que camundongos WT. Deste modo, a fibrose é menor na ausência de células B em, pelo menos, dois sistemas de modelo.

Para analisar se aumento do número de células B acima do normal leva a fibrose mais acentuada, foram utilizados camundongos BAFF-tg que demonstram um aumento de 20-30% no número de células B (Mackay *et al.* - *J. Exp. Med.* 190:1697-1710 (1999)), em comparação com os camundongos correspondentes C57B1/6 WT controle. Após seis tratamentos com CCl₄, a fibrose foi desenvolvida nos camundongos BAFF-tg e C57B1/6 controle. Esta fibrose foi caracterizada por menos deposição de fibras de colágeno comparado ao camundongo BALB/c (dados não apresentados e Shi *et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 94:10663-10668 (1997)). Curiosamente, porém, os camundongos BAFF transgênicos tinham cerca de duas vezes a quantidade de depósito de colágeno comparado como os seus homólogos WT C57B1/6 (FIG. 2D).

20 CAMUNDONGOS DEFICIENTES DE CÉLULA B E WT RESPONDEM DIFERENTEMENTE A UMA ÚNICA LESÃO INDUZIDA POR CCL₄.

Para entender o que efeitos agudos ativam para levar a mudanças na deposição de colágeno após 6 semanas de tratamento, a cinética das mudanças no tecido foi analisada nas secções de figado dos camundongos deficiente de célula B e camundongos controle 1, 3 e 5 dias após uma única provocação com CCl₄. Curiosamente, a coloração por TUNEL, detectando células apoptóticas, mostrou que, apesar de semelhante lesão inicial no dia 1, camundongos JR -/- não tinham células apoptóticas no dia 3,

enquanto que em camundongos WT algumas células em apoptose ainda são detectadas em até 5 dias após lesão (FIG. 3). Quando as seções de tecido foram coradas com marcador específico para macrófago F4/80, verificou-se que, precocemente no dia 1, houve um pequeno aumento no número de macrófagos nos camundongos JH $-/-$ em comparação aos camundongos WT, que se torna muito importante nos dias 3 e 5 (FIG. 3). Assim, afigura-se que, na ausência de células B, macrófagos estão em melhores condições para limpar hepatócitos degenerados. Como a maior fonte celular de fibras colágeno é a população de miofibroblastos (Rockey *et al. Clin. Liver Dis.* 4:319-355 (2000)), a actina de músculo liso que marca miofibroblastos no fígado lesado também foi monitorada. Miofibroblastos são detectáveis no dia 3, com níveis similares tanto nos camundongos deficientes de célula B quanto nos camundongos controle. Pelo dia 5, no entanto, camundongos WT demonstram muito mais miofibroblastos (FIG. 3). Com repetidas lesões, a incapacidade dos macrófagos removerem eficientemente hepatócitos degenerados pode levar a um excesso de estimulação dos miofibroblastos e eventualmente resultar no maior deposição de colágeno observado após lesão prolongada. Em um estudo recente (Duffield *et al., J. Clin. Invest.* 115:56-65 (2005)), foi demonstrado que macrófagos desempenham um papel distinto, oposto durante a lesão e reparação hepática. Parece que, na ausência de células B, os macrófagos que contribuem para a recuperação da cicatriz inflamatória estão preferencialmente ativados.

CÉLULAS T CD4⁺, CD8⁺ OU $\gamma\delta$ NÃO INFLUENCIAM EM GRAU SIGNIFICANTE A

FIBROSE HEPÁTICA

Para avaliar se camundongos deficientes em células T também têm um defeito na fibrogênese, uma série de experimentos de lesões hepáticas induzida por CCl₄ foram realizados com camundongos deficientes tanto de células B quanto de células T (RAG2 $-/-$), células T CD4⁺ (A β 3 $-/-$), células T

CD8⁺ ($\beta 2m^{-/-}$), ou células T $\gamma\delta$ (TCR $\delta^{-/-}$). Para cada linhagem de camundongo mutante, uma linhagem controle do mesmo antecedente genético foi utilizada (vide, Materiais e Métodos). Destes, apenas camundongos RAG2 -/- mostraram quantidades desiguais de deposição de colágeno após o tratamento a longo prazo com CCl₄ comparativamente ao homólogos WT adequado (FIG. 4 e dados não apresentados). Camundongos RAG2 -/-, com ausência de todos linfócitos que exigem rearranjo de DNA para montar seus receptores, demonstraram aproximadamente uma redução de 3-4 vezes em comparação com o acúmulo de colágeno intersticial nos camundongos WT (FIG. 4B). Este resultado é muito semelhante ao resultado obtido em camundongos apenas com deficiência de células B, e não implica um papel proeminente para células T no modelo de fibrose hepática por CCl₄.

O PAPEL DA CÉLULA B NA FIBROSE HEPÁTICA É INDEPENDENTE DE ANTICORPOS

Células B podem mediar efeitos locais, como apresentação de antígeno, liberação de citocinas, e/ou contato célula-célula regulado por moléculas co-estimuladoras, e efeitos de longo intervalo através de anticorpos. Como animais deficientes de células T (vide acima), não demonstraram diferenças na deposição de colágeno, é pouco provável que a apresentação de antígenos da célula B a células T influencie na fibrose hepática.

Para determinar se regulação da fibrose hepática por célula B exigem imunoglobulinas, foram utilizadas duas linhagens de camundongos que possuem número normal de células B, mas com deficiência nos níveis séricos de Ig ou que possuem níveis de Ig gravemente reduzidos. Camundongos expressando proteínas LMP2a derivadas do vírus *Epstein-Barr* de um gene incorporado no local do elemento J do *locus* da IgH (alelo D_HLMP2a (Casola *et al* - *Nat. Immunol.* 5:317-327 (2004)) deficiente tanto de imunoglobulinas de superfície quanto de imunoglobulinas circulantes, enquanto camundongos expressam um transgene mIgM na linhagem de camundongo antecedente JH-/-

no codificador de superfície, mas não secretam Ig. (Chan *et al.*, *J. Exp. Med.* 189:1639-1648 (1999)).

Como demonstrado na FIG. 5A, após 6 semanas de tratamento com 1,75 mg/kg CCl₄, níveis semelhantes de deposição de colágeno foram observados nos camundongos expressando proteína LMP2a derivada do vírus Epstein-Barr e seus controles WT BALB/cAnNCrIBr. Além disso, camundongos transgênicos mIgM-tg (JH -/-) expressando Ig de superfície, mas não Ig secretada (Chan *et al* - *J. Exp. Med.* 189:1639 - 1648 (1999)), mostraram o mesmo grau de fibrose hepática induzida por CCl₄ como o camundongo controle WT BALB/c (FIG. 5B). Assim, os efeitos da célula B sobre a patologia da fibrose hepática induzida por CCl₄ é independente de anticorpos. É importante realçar que o grau de fibrose nos camundongos WT BALB/c nestes experimentos é menor do que nos anteriores (FIGS. 2, 4, 5) potencialmente devido a diferentes condições habitacionais e/ou infecção concomitante destes animais: Tanto as colônias de camundongos LMP2a e mIgM foram positivos para *H. hepaticus*; portanto, estes camundongos, assim como as linhagens WT correspondentes foram mantidas em instalações de quarentena.

DISCUSSÃO

Neste exemplo, está demonstrado que células B intra-hepáticas representam uma população de tamanho considerável com características fenotípicas e funcionais semelhantes ao das células B2 convencionais. Células IHB expressam CD5 em maior grau do que células B2 convencionais e elas proliferam melhor *in vitro* em resposta a reticulação com IgM sem suplementação com IL-4 (FIG. 1), implicando no *status* de células IHB ativadas. Apesar do fato de fígados adultos serem conhecidos por conterem células tronco hematopoiéticas pluripotentes c-kit⁺ que podem dar origem a muitas linhagens de leucócitos (Watanabe *et al* - *J. Exp. Med.* 184:681-693 (1996); Taniguchi *et al* - *Nat . Med.* 2:198-203 (1996)), a maioria das células B no

fígado adulto parecem ser derivadas da medula óssea em contraste com auto-propagação embrionárias derivadas da linhagem de células B1 do fígado. (Herzenberg, *Immunol. Rev.* 175:9-22 (2000)). Células IHB são igualmente de origem da medula: junções VD J das células B intra-hepáticas contêm extensas
 5 inserções de nucleotídeos N, com extensão total média semelhante às células B2 convencionais. Notavelmente, a expressão terminal do deoxiribonucleotidil tranferase (TdT), a enzima responsável pela inserção do N nucleotídeo, não foi estudado no fígado de adultos (Benedict *et al. Immunol. Rev.* 775:150-157 (2000)), Assim, formalmente, existe uma possibilidade improvável de que a
 10 célula B no fígado de adultos são geradas em uma forma dependente de TdT.

Neste exemplo é mostrado que células B desempenham um papel importante no desenvolvimento da fibrose hepática independente de anticorpo, acrescentando outro modelo de doença igualmente dependente da função da célula B local. Um papel imperativo das células B também foi demonstrada por
 15 diabetes auto-imune em camundongos diabéticos não obesos (NOD). Camundongos NOD deficientes de célula B *Igμnull* e camundongos NOD com células B depletadas não desenvolvem insulite ou *diabetes mellitus* insulino dependente, reforçando a idéia de que as células B são cruciais para o início e/ou ativação de células T auto-reativas. (Serreze *et al. J. Exp. Med.* 184:2049-
 20 2053 (1996); Noorchashm *et al, Diabetes* 46:941-946 (1997)). Células B também se demonstraram necessárias para o desenvolvimento da nefrite lúpica no poligênico, Modelo MRL fas-intacto e faz-deficiente de auto-imunidade sistêmica. (Chan *et al. J. Exp. Med.* 189:1639-1648 (1999); Chan *et al., J. Immunol.* 160:51-59 (1998); Chan *et al. J. Immunol.* 163:3592 - 3596
 25 (1999)). Em ambos os casos, um mecanismo independente de anticorpo revelou-se crucial para o envolvimento da célula B. (Chan *et al., J. Exp. Med.* 189:1639-164 (1999); Wong *et al., Diabetes* 53:2581-2587 (2004))

Neste exemplo, foram utilizados camundongos que são

constitutivamente desprovido de células B para o estudo do envolvimento das células B na patologia fibrótica. Embora normal a fisiologia macroscópica, camundongos com deficiência de células B faltam redes de dendritos foliculares (Fu *et al.*, *J. Exp. Med.* 187:1009-1018 (1998); Gonzalez *et al.*, *J. Exp. Med.* 187:991-1001 (1998); Endres *et al.*, *J. Exp. Med.* 187:159-168 (1999)), epitélio associados a folículos nas placas de Peyer no intestino (Golovkina *et al.* - *Science* 285 (5):1965-1968 (1999)) , E um subconjunto de células NK-T não canônica. (Treiner *et al.*, *Nature* 422:164-169 (2003)). Camundongos com menos células B também têm defeitos na função das células T CD4⁺ (Baumgarth *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 97:4766-4771 (2000)), e talvez algumas outras deficiências funcionais ou de desenvolvimento ainda não descritas. Assim, os resultados obtidos com os camundongos deficiente de células B indicam que as células B afetam indiretamente a patogênese da fibrose hepática.

Visto que, camundongos deficientes de células T não mostram qualquer diferença no desenvolvimento da fibrose hepática (dados não apresentados), é improvável que uma deficiência de células T CD4⁺ conte para forte atenuação da fibrose hepática observada nos camundongos JH -/-. No entanto, uma subclasse de célula B dependente de células NK-T que expressa Val9 contendo invariante TCR (Treiner *et al.*, *Nature* 422:164-169 (2003)), residente no fígado murino (Shimamura *et al.*, *FEBS Lett.* 516:91 - 100 (2002)), poderia contribuir para a redução fibrose observada nos camundongos deficientes de célula B. Células NK-T são conhecidas pela sua capacidade de responder de forma rápida e produzir citocinas tanto do tipo TH1 quanto do tipo TH2. (Godfrey *et al.*, *J. Clin. Invest.* 774:1379-1388 (2004)). Essas qualidades permitem que células NK-T participem da regulação da resposta imunológica. (Godfrey *et al.*, *J. Clin. Invest.* 774:1379-1388 (2004)). Não houve diferenças acentuadas no desenvolvimento da fibrose hepática nos camundongos CD1 -/-

(dados não apresentados), com ausência de células V α 14 TCR NK-T convencional. Infelizmente, não há camundongo mutante disponível que permita uma abordagem do papel das células não-canônicas V α 19 invariante NK-T na fibrose hepática. No entanto, animais RAG-/- mostraram inibição da

5 fibrose em uma extensão semelhante aos camundongos deficientes de células B, o papel dos tipos celulares que exigem o rearranjo de genes para o seu desenvolvimento (diversas linhagens de células B e T) está implícito. Assim, em conjunto os dados sugerem tanto as células NK-T não CD 1 restritas que

10 exigem células B para o seu desenvolvimento (Treiner *et al.*, *Nature* 422:164-169 (2003)) ou a função autônoma das células B tem um papel importante na fibrose manifestada no modelo de hepatotoxicidade induzida pelo CCl₄.

Usando duas linhagens de camundongos gerados anteriormente (camundongo com inserção de LMP2a e mlgM-Tg) deficiente na produção de imunoglobulina, demonstrou-se que os anticorpos não estão necessários no

15 desenvolvimento da fibrose hepática induzida por CCl₄. Camundongos LMP2a possuem o número de células B normal e a ausência tanto de anticorpos secretados quanto de imunoglobulinas expressas na superfície. (Casola *et al.*, *Nat. Immunol.* 5:317-327 (2004)). LMP2A não só mimetiza a sinalização de BCR, mas também desencadeia vias adicionais de sinalização (Ikeda *et al.*, *J.*

20 *Virol.* 77:5529-5534 (2003); Portis e Longnecker, *J. Virol.* 77:105-114 (2003)), Deste modo, foi avaliada a fibrogênese no camundongo mlgM-Tg (JH -/-) que expressa um BRC transgênico na superfície e têm de 300-500 vezes o título de anticorpo reduzido comparado com camundongos normais (Chan *et al.*, *J. Exp. Med.* 189:1639-1648 (1999)). Ambas as linhagens de camundongos

25 desenvolveram fibrose hepática, a um nível semelhante ao dos controles. Assim, o papel das células B na patologia fibrose hepática parece ser independente de anticorpos, sugerindo que ela seja mediada por funções (ex. secreção de citocinas e/ou contato célula-célula) de células B locais por

oposição aos efeitos potencialmente de longo duração mediada por células B localizadas em outras partes do organismo. É improvável que o papel da apresentação de antígeno das células B desempenha um papel significativo na fibrose hepática, como camundongos convencionais deficientes em células T

5 mostraram fibrogênese semelhantes aos seus homólogos WT. Além disso, células B LMP2a B não têm a capacidade de se ligar, internalizar e apresentar antígenos, porque falta receptores de células B na superfície e também mostram depósitos de colágeno semelhantes aos camundongos WT. Em conjunto, estes dados sugerem que o tecido hepático reparado é afetado pela

10 função local das células B, que podem ser mediadas em parte pelas células IHB definidas no presente. Formalmente, é possível que células B – dominem o(s) mecanismo(s) de *clearance* no fígado. No entanto, o número de células B é muito pequeno em comparação ao número de hepatócitos.

Os resultados apresentados no presente exemplo estão de acordo com relatos de que o grau de lesão hepática em resposta ao CCl₄ foi

15 significativamente mais suave em ratos esplenectomizados comparado a ratos operados *sham* (Chen *et al.*, *Chin. Med. J. (Engl)* 111:779-783 (1998)), e em camundongos SCID em antecedente BALB/c, comparado com os controles adequados. (Shi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 24:10663-10668 (1997)). No

20 entanto, a fibrose hepática induzida pelo parasita *Schistosoma mansoni* é maior em camundongos deficientes de célula B em comparação com camundongos controle. (Ferru *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 48:233-240 (1998)). As diferenças no mecanismo da indução da fibrose pelo dano repetido aos hepatócitos (como é o caso do CCl₄ e ANIT) ou pelo baixo nível de infecção

25 pelo parasita poderia explicar a discrepância.

A função das células B também tem sido associada com fibrose na pele, tanto em camundongos quanto em humanos. No modelo de camundongos *tight-skin* (TSK/+), bem como em pacientes com

esclerose sistêmica, a ativação crônica de células B resultantes do aumento da expressão de CD 19 leva a fibrose da pele e a auto-imunidade. (Saito *et al.*, *J. Clin. Invest.* 109:1453-1462 (2002)). Além disso, uma linhagem de célula B estabelecida a partir do tecido pulmonar de um

5 paciente com esclerodermia exibe uma proliferação e resposta inflamatória aumentada que são susceptíveis a ativação de mudanças fibróticas. (Kondo *et al.*, *Cytokine* 13:220-226 (2001)).

Em suma, este exemplo descreve o isolamento e caracterização de uma população de células B no fígado de adultos e demonstra diretamente

10 um papel importante das células B na reparação do tecido após a lesão hepática. Este exemplo demonstra que ainda que as células B estão envolvidas na patologia das doenças fibróticas. Assim, os resultados aqui apresentados indicam que os antagonistas de célula B revelaram-se eficazes no tratamento de doenças fibróticas.

EXEMPLO 2

FIBROSE PULMONAR EM UM MODELO DE CAMUNDONGO DEFICIENTE DE CÉLULA B

INTRODUÇÃO

A fibrose pulmonar pode ser induzida em modelos animais, por exposição a bleomicina. A administração intratraqueal de bleomicina em

20 roedores é o modelo mais utilizado de fibrose pulmonar. A bleomicina é um agente citotóxico que provoca danos endoteliais e epiteliais, em parte através da geração de radicais livres e indução de citocinas inflamatórias. (Sleijfer, *Chest* 120:617-624 (2001)). Fibroblastos são ativados, e em duas semanas, há

25 demonstrado que o camundongo deficiente de célula B, após a exposição sistêmica prolongada a bleomicina, exibiu melhor sobrevida e fibrose pulmonar reduzida em comparação com camundongos do tipo selvagem tratados identicamente.

MATERIAL E MÉTODOS

CAMUNDONGOS

Camundongos C57BL/6J: tipo selvagens com função normal das células;

5 Camundongos deficientes de células; B6A29S2-Igh-6^{tm1Cgn}/J:

EXPOSIÇÃO PROLONGADA A BLEOMICINA

No dia 0, camundongos tipo selvagens ou deficientes de célula B foram implantados assepticamente com uma mini bomba osmótica subcutânea de 7 dias Alzet® contendo solução salina (n= 7, wt, n = 5, ko) ou solução de
10 bleomicina com doses de 60 mg/Kg (n=12, wt, n=10, ko), ou 100 mg/Kg (n=8, wt, n=10, ko) (dose total administrada durante 7 dias).

MEDIÇÕES

O peso corporal e os sinais clínicos foram monitorados por um 1 mês. Os camundongos foram eutanizados no Dia 28 e os pulmões removidos,
15 instilados e fixados em formalina tamponada 10%. Os pulmões foram corados com Tricrômio de Masson para identificar o colágeno/fibrose presente, e foi realizada uma imuno-histoquímica de actina para identificar o grau potencial de futura fibrose. A proporção da área tecidual ocupada por colágeno ou actina foi determinada histo-morfométricamente usando o *software* Metamorph®.

RESULTADOS

A administração de 60 mg/kg/7d de bleomicina produziu apenas uma modesta acumulação de actina no Dia 28. Camundongos tipo selvagem e deficientes de célula B apresentaram níveis semelhantes de actina (FIG. 6).

A administração de 100 mg/kg/7d de bleomicina produzido uma
25 acumulação de actina de moderada a extensa no 28º dia. Animais tipo selvagem demonstraram redução na sobrevida níveis de actina estatisticamente maior do que camundongos *knockout* de célula B (FIGS. 6, 7 e 8).

Os resultados destes experimentos demonstram que a ausência

de linfócitos B₂ reduz a extensão da fibrose pulmonar e aumenta a sobrevivência após a exposição prolongada à bleomicina em camundongos C57BL/6. Conseqüentemente, estes resultados sustentam ainda a utilização de antagonistas de células B para tratar doenças fibróticas e, em particular, doenças fibróticas do sistema pulmonar.

EXEMPLO 3

FIBROSE RENAL EM MODELO DE CAMUNDONGO DEFICIENTE DE CÉLULA B

INTRODUÇÃO

A obstrução ureteral unilateral (UUO) é um modelo de nefropatia obstrutiva que produz progressiva compressão do tecido, degeneração tubular, e fibrose glomerular e intersticial. (Miyajima *et al*, *Kidney International* 55:2301-2313 (2000)). Neste exemplo, demonstra-se que camundongos deficientes de célula B exibem uma fibrose renal reduzida em resposta à UUO em comparação com camundongos do tipo selvagem.

MATERIAL E MÉTODOS

CAMUNDONGOS

Camundongos C57BL/6J: tipo selvagens com função normal das células;

Camundongos deficientes de células: B6A29S2-Igh-6^{tm1Cgn}/J

OBSTRUÇÃO URETERAL UNILATERAL

No Dia 0, sob condições assépticas e sob anestesia com cetamina/xilazina o ureter esquerdo foi isolado, ligado e seccionado entre as ligaduras nos camundongos do tipo selvagem (n = 10) ou nos camundongos deficientes de células B (n= 10). Camundongos tipo selvagens (n= 5) ou camundongos deficientes de células B (n= 5) não operados também foram incluídos como controles normais.

MEDIÇÕES

O peso corporal e os sinais clínicos foram monitorados durante os

10 dias da progressão de pico doença. Os camundongos foram eutanizados no Dia 10 e ambos os rins removidos e fixados em formalina tamponada 10%. Os Rins foram corados com Tricrômio de Masson para identificar o colágeno/fibrose presente, e foi realizada uma imuno-histoquímica de actina para identificar o grau potencial de futura fibrose. A proporção da área tecidual ocupada por colágeno ou actina foi determinada histo-morfométricamente usando o *software* Metamorph®.

RESULTADOS

Após a UUO, camundongos deficientes de células B apresentaram uma redução estatisticamente significativa de 29% na coloração de actina, comparado aos camundongos tipo selvagem homólogos (FIG. 9A) e uma redução estatisticamente significativa de 62% no acúmulo de colágeno intersticial (FIG. 9B). Será apreciado que estas condições patológicas constituem dois marcadores clássicos para a medição e quantificação de condições fibróticas.

Após a UUO, camundongos deficientes de células B também exibiram uma redução significativa da dilatação tubular (FIG. 9C) e aumentaram significativamente a coloração de túbulos saudáveis (FIG. 9D). O aumento da coloração de túbulos saudáveis foi observado em camundongos deficientes de células B, mesmo na ausência da lesão (FIG. 9D; vide também FIG. 10).

Os resultados destes experimentos demonstram que a ausência de linfócitos B reduz a extensão da fibrose renal após a lesão induzida pela UUO.

A observação de que a extensão das lesões fibróticas induzida experimentalmente, em múltiplos modelos é substancialmente menor em camundongos que são deficientes de células B (vide Exemplos 1-3) sustentam fortemente a utilização de antagonistas de célula B para tratar uma série de doenças associadas com indicações de patologia inflamatória/fibrótica.

EXEMPLO 4

ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD20 E CONTAGEM NO AUMENTO DE CÉLULAS B DO PULMÃO E BAÇO CAUSADO PELO TRATAMENTO COM BLEOMICINA

INTRODUÇÃO

5 Conforme demonstrado no Exemplo 2, a fibrose pulmonar é induzida em modelos animais, pela exposição à bleomicina, e a extensão da fibrose pulmonar induzida pela bleomicina é menor em camundongos deficientes de célula B. Neste exemplo, é mostrado que camundongos tratados com bleomicina apresentam um aumento de células B em seus pulmões, e, 10 sobretudo, esta aumento de células B induzido pela bleomicina é significativamente menor em camundongos que são tratados com um anticorpo anti-CD20. Estes resultados fornecem um apoio adicional para a utilização de antagonistas de célula B para tratar doenças fibróticas.

MATERIAL E MÉTODOS

15 Neste exemplo, camundongos C57B1/6 machos de 9 semanas de idade foram utilizados para os experimentos. No Dia 0 os camundongos foram anestesiados com cetamina/Xilazina IP, e receberam 0,025 unidades em um volume de 50µl IT de Bleomicina usando um *PennCenntury Aerosolizer*. O *PennCenntury Aerosolizer* foi inserido pela boca e traquéia. 20 Os camundongos receberam anticorpo monoclonal anti-CD-20 murino (designado "18B12", desenvolvido pela Biogen Idece, pedido de Patente US 60/741491), ou PBS, por via intraperitoneal nos dias -7 (7 dias antes da administração de bleomicina) e no dia 7. Um grupo separado de camundongos recebeu apenas PBS intratraquealmente e nenhum outro 25 tratamento.

Os animais foram eutanizados por CO₂ no Dia 9 e pulmões e baço foram recolhidos. Os pulmões e baço foram cortadas em segmentos com tesoura, homogeneizados e depois transferidos para um tubo de

centrífuga de 50 ml. 40 ml de RPMI1640/5% FBS gelado foi adicionado ao tubo e centrifugadas durante 10 minutos a 300 x g (1200 RPM no IEC Centra 8R com rotor padrão), a 4 °C para sedimentos e retirar detritos celulares. O *pellet* foi ressuspenso em 10 ml de meio de digestão por 40-60 minutos a 37 ° C.

Para isolar a população de células enriquecida de linfócitos 30 ml de RPMI 1640 sem soro gelado foi adicionado a cada tubo para chegar ao volume final de 40 ml. Os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 300 x g (1200 RPM no IEC Centra 8R com rotor padrão), 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspenso em um volume final de 6 ml em 45% de Percoll em RPMI 1640 sem soro gelado, suplementado com 70% de Percoll em PBS para obter um gradiente.

A interface foi colhida e adicionada a 10 vol de RPMI 1640 sem soro gelado e os tubos centrifugados durante 10 minutos a 400 x g (1500 RPM no IEC Centra 8R com rotor padrão), 4 °C. Células expressando CD5 e CD19 foram analisadas com o uso de FACS. (Figuras 11, 12 e 13).

RESULTADOS

Como mostrado nas figuras 11 e 13, camundongos tratados com bleomicina apresentaram um aumento de células B (CD 19⁺) nos pulmões, e este aumento foi significativamente menor nos camundongos que receberam anticorpos anti-CD20 além da bleomicina. Como mostrado na Figura 12, o tratamento com o anticorpo anti-CD20 também reduziu eficazmente o número de células B no baço. Conforme mencionado no Exemplo 2, acima, a fibrose pulmonar pode ser induzida em modelos animais, por exposição a bleomicina. Estes resultados suportam a conclusão de que, antagonistas de célula B, como um anticorpo anti-CD20, são eficazes no tratamento de doenças fibróticas.

EXEMPLO 5

UM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD20 É PROTETOR CONTRA A FIBROSE

HEPÁTICA INDUZIDA PELO CCl₄

INTRODUÇÃO

5 Conforme demonstrado no Exemplo 1, fibrose hepática é induzida em modelos animais pela exposição ao CCl₄, bem como a extensão da fibrose hepática induzida pelo CCl₄ é reduzida em camundongos deficientes de célula B. Neste exemplo, é demonstrado que a fibrose hepática induzida por CCl₄ é significativamente reduzida em camundongos tratados com anticorpos anti-
10 CD20. Estes resultados fornecem ainda mais evidências para o uso de antagonistas de célula B para tratar doenças fibróticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Um anticorpo depletor de células B anti-CD20 murino (designado "18B12", desenvolvido pela Biogen Idec, pedido de Patente US. 60/741491) foi
15 testado em um modelo de fibrose hepática em camundongo, induzida pela administração do químico tetracloreto de carbono (CCl₄). Uma dose de 1,75 ml/Kg de CCl₄ preparado em óleo mineral foi administrado uma vez por semana durante seis semanas e os camundongos foram tratados concomitantemente (via intraperitoneal), apenas com PBS, 250 µg de anticorpo monoclonal anti-
20 CD20, ou 250 µg de um anticorpo monoclonal isotipo controle. Camundongos foram injetados com PBS e anticorpos e uma semana antes da administração da primeira dose de CCl₄ e um dia antes de cada dose subsequente de CCl₄. Sete dias após a sexta dose de CCl₄, os camundongos foram sacrificados e os fígados foram excisados e imuno-corados para marcar a expressão de actina
25 de músculo liso, um marcador de fibrose.

RESULTADOS

Como demonstrado na Figura 14, o grau de fibrose hepática (como indicado pela marcação de actina de músculo liso), em animais tratados

com o anticorpo anti-CD20 foi de, aproximadamente, 20% menor do que nos animais controle que receberam PBS, e cerca de 28% menor do que em animais controle recebendo anticorpo monoclonal isotipo controle. Mais uma vez, este exemplo mostra a aplicabilidade dos métodos da presente invenção para tratar, retardar ou impedir o aparecimento ou progressão de doenças fibróticas, em especial no fígado.

EXEMPLO 6

MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS FIBRÓTICAS

Um paciente com diagnóstico de um ou mais sintomas de uma doença fibrótica é tratado de acordo com este exemplo. Exemplo de doenças fibróticas para ser tratada no presente inclui, por exemplo, doenças pulmonares associadas lesão/fibrose, nefropatias crônicas associada com lesões/fibrose (fibrose renal), fibrose intestinal, fibrose hepática (incluindo, por exemplo, cirrose), fibrose de cabeça e pescoço, cicatriz corneana, vasculopatias, doenças auto-imunes associadas à fibrose, como, por exemplo, esclerodermia, lúpus, e doença enxerto contra hospedeiro.

Um paciente com diagnóstico de um ou mais sintomas de doença fibrótica é tratado

O paciente é tratado com rituximab ou 2H7 humanizado, ou um fragmento (por exemplo, um Fab, F(ab').sub.2, Fv, scFv ou diacorpo) de rituximab ou 2H7 humanizado.

Preferivelmente, o anticorpo é administrado por via intravenosa (IV), para o paciente, de acordo com qualquer um dos seguintes esquemas de dosagens:

- (A) 50 mg/m² no dia 1; 150 mg/m² nos dias 8,15 e 22;
- (B) 150 mg/m² no dia 1; 375 mg/m² nos dias 8,15 e 22; ou
- (C) 375 mg/m² no dia 1, 8,15 e 22.

Os pacientes tratados com o anticorpo CD20 demonstrarão uma

melhora nos sintomas da doença fibrótica.

Em um esquema de dosagem alternativo, o paciente é tratado com rituximab conforme definido no esquema (A) acima e com um anticorpo para $\alpha_v\beta_6$ como descrito na Patente USPN 6316601, que está incorporada ao presente na sua totalidade pela referência. Novamente o paciente demonstrará melhora nos sintomas da doença fibrótica.

Em outro esquema de dosagem alternativo, o paciente é tratado com rituximab conforme estabelecido no esquema de dosagem (B). O nível de células B periféricas do paciente é monitorado bem como a quantidade de deposição de colágeno no órgão de interesse. Oito meses depois, como a reconstituição da reposta imune por células B do paciente e/ou é alcançado a quantidade de deposição colágeno a um nível predeterminado, o paciente é tratado novamente com rituximab, de acordo com o esquema de dosagem (A).

Tendo agora a presente invenção completamente descrita com detalhes com o objetivo de ilustrar e exemplificar a fim de esclarecer o entendimento, será óbvio para aqueles hábeis no assunto que as mesmas podem ser realizadas através de modificações ou alterações da invenção dentro de uma gama de condições, formulações e outros parâmetros equivalentes, sem afetar o escopo da invenção ou qualquer exemplo de realização específico apresentado no presente, e que essas modificações ou alterações se encontrarão dentro do escopo das reivindicações anexas.

Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes mencionados nesta especificação são indicativas do nível de qualificação dos técnicos no assunto ao qual pertence esta invenção, e são incorporadas ao presente pela referência à mesma proporção que cada publicação, patente ou pedido de patente foi especificamente e individualmente indicada para ser incorporada ao presente pela referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Tatiana Novobrantseva
 Shelia Violette
 Victor Koteliensky
 Alexander Ibraghimov

<120> Métodos para Tratamento de Condições Fibróticas

<130> 2159.0530002

<150> US 60/682,005

<151> 18-05-2005

<150> US 60/741,867

<151> 12-05-2005

<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 232

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
 35 40 45

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 50 55 60

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 85 90 95

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn
 100 105 110

Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 2

<211> 471

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe
 115 120 125

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

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 3
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe
 115 120 125
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

```
<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

```
<210> 6
<211> 213
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7
<211> 452
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 8

<211> 452

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	20	25	30	
Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	100	105	110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	115	120	125	
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	130	135	140	
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155	160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	180	185	190	
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	195	200	205	
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	210	215	220	
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	225	230	235	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	245	250	255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	260	265	270	
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	275	280	285	

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 9
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ala Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 12
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 13
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	100	105	110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	115	120	125	
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	130	135	140	
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155	160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	180	185	190	
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	195	200	205	
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	210	215	220	
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	225	230	235	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	245	250	255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	260	265	270	
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	275	280	285	
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ala	Thr	290	295	300	
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	305	310	315	320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	325	330	335	
Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	340	345	350	
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	355	360	365	
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	370	375	380	
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	385	390	395	400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	405	410	415	

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly
 450

<210> 14
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14

Met Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys
 1 5 10 15

Asp Pro Leu Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala
 20 25 30

Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Met Leu Pro Gly Cys Lys Trp
 35 40 45

Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys Asp Pro Leu Gly Gly Gly Gly
 50 55 60

Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 65 70 75 80

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 85 90 95

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Trp Trp Asp Val Ser
 100 105 110

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 115 120 125

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 130 135 140

Tyr Arg Trp Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 145 150 155 160

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 165 170 175

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 180 185 190

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 195 200 205

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 210 215 220

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 225 230 235 240

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 245 250 255

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 260 265 270

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 275 280 285

Pro Gly Lys
 290

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ala Trp Val Pro Cys Ser Val Leu
 1 5 10 15

Lys

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Pro Cys Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Arg

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Arg Trp Val Pro Cys Glu Met Leu
 1 5 10 15

Gly

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ser Trp Val Pro Cys His Met Leu
 1 5 10 15

Arg

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 19

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Ala Cys Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Arg

<210> 20
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ala Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO FIBRÓTICA, em que o dito método compreende a administração a um paciente com necessidade de tal tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz
5 de antagonista de célula B.
2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que o antagonista de célula B mencionado é um anticorpo contra o antígeno de superfície da célula B.
3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, em que o
10 antígeno de superfície da célula B mencionado é CD20.
4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, em que o antígeno de superfície da célula B mencionado é selecionado a partir do grupo que consiste de CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD52, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a,
15 CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86, TLR-7, TLR-9, CXCR3, APRIL, BR3, BCMA e TACI.
5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, em que o dito anticorpo é um anticorpo monoclonal.
6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, em que o
20 anticorpo mencionado é um anticorpo monoclonal contra o CD20.
7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, em que o anticorpo mencionado é um anticorpo murino quimérico/ monoclonal humano contra CD20.
8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, em que o
25 anticorpo mencionado contra CD20 é rituximab (RITUXAN®).
9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, em que o dito anticorpo é um anticorpo humanizado.
10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, em que o dito

anticorpo é um anticorpo humano completo.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, compreende adicionalmente a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de BAFF ao paciente mencionado.

5 12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, em que o dito antagonista de BAFF é um polipeptídeo contendo uma seqüência de aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste de ECFDLLWAWVPCSVLK (SEQ ID Nº: 15), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID Nº:16), ECFDLLVRRWVPCMLG (SEQ ID Nº 17), ECFDLLVRSWVPCMLR
10 (SEQ ID Nº: 18), e ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID Nº: 19).

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, em que o dito antagonista de BAFF compreende de uma proteína de fusão solúvel contendo pelo menos uma porção do receptor BAFF e uma porção da região constante de uma imunoglobulina.

15 14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, onde o paciente não possui uma doença autoimune.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, onde o paciente não é um paciente de risco para o desenvolvimento de doença autoimune.

20 16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, onde o antagonista de célula B mencionado causa 20% de depleção de células B periféricas nos pacientes dentro de 24 horas após a administração do antagonista de célula B mencionado ao dito paciente.

25 17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, onde o antagonista de célula B mencionado causa 60% de depleção de células B periféricas nos pacientes dentro de 24 horas após a administração do antagonista de célula B mencionado ao dito paciente.

18. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, onde o antagonista de célula B mencionado causa 80% de depleção de células B

periféricas nos pacientes dentro de 24 horas após a administração do antagonista de célula B mencionado ao dito paciente.

19. MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE PULMONAR, em que o dito método compreende a administração a um paciente com
5 necessidade de tal tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz de antagonista de célula B.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, em que o antagonista de célula B mencionado é um anticorpo contra CD20.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 20, onde o
10 anticorpo mencionado é um anticorpo murino quimérico/ monoclonal humano contra CD20.

22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 21, onde o anticorpo mencionado contra CD20 é rituximab (RITUXAN®).

23. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, onde após a
15 administração do antagonista de células B ao dito paciente, este apresenta uma diminuição de um ou mais marcadores de fibrose quando comparado ao paciente mencionado antes da administração do antagonista de célula B referido.

24. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 23, em que um ou mais marcadores de fibrose mencionados é a deposição de actina de
20 músculo liso ou deposição de colágeno.

25. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 24, onde após a administração do dito antagonista de célula B ao dito paciente, a extensão da coloração de actina de músculo liso observada em um ou mais tecidos do paciente é, pelo menos, 5% menor do que a extensão da coloração de actina
25 de músculo liso observada em um ou mais tecidos de paciente mencionado antes da administração do dito antagonista de célula B.

26. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 24, onde após a administração do dito antagonista de célula B ao dito paciente, a extensão da

coloração de actina de músculo liso observada em um ou mais tecidos do paciente é, pelo menos, 25% menor do que a extensão da coloração de actina de músculo liso observada em um ou mais tecidos do paciente mencionado antes da administração do dito antagonista de célula B.

5 27. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 24, onde após a administração do dito antagonista de célula B ao dito paciente, a extensão da coloração de actina de músculo liso observada em um ou mais tecidos do paciente é, pelo menos, 50% menor do que a extensão da coloração de actina de músculo liso observada em um ou mais tecidos do paciente mencionado
10 antes da administração do dito antagonista de célula B.

 28. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 24, onde após a administração do dito antagonista de célula B ao dito paciente, a extensão da coloração de colágeno observada em um ou mais tecidos do paciente é, pelo menos, 5% menor do que a extensão da coloração de colágeno observada em
15 um ou mais tecidos do paciente mencionado antes da administração do dito antagonista de célula B.

 29. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 24, onde após a administração do dito antagonista de célula B ao dito paciente, a extensão da coloração de colágeno observada em um ou mais tecidos do paciente é, pelo
20 menos, 25% menor do que a extensão da coloração de colágeno observada em um ou mais tecidos do paciente mencionado antes da administração do dito antagonista de célula B.

 30. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 24, onde após a administração do dito antagonista de célula B ao dito paciente, a extensão da
25 coloração de colágeno observada em um ou mais tecidos do paciente é, pelo menos, 50% menor do que a extensão da coloração de colágeno observada em um ou mais tecidos do paciente mencionado antes da administração do dito antagonista de célula B.

31. MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE HEPÁTICA, onde o dito método compreende a administração a um paciente com necessidade de tal tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz de antagonista de célula B.

32. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31, onde o antagonista de célula B mencionado é um anticorpo contra CD20.

33. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 32, onde o anticorpo mencionado é um anticorpo murino quimérico/ monoclonal humano contra CD20.

34. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 33, onde o anticorpo mencionado contra CD20 é rituximab (RITUXAN®).

35. MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE RENAL, em que o dito método compreende a administração a um paciente com necessidade de tal tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz de antagonista de célula B.

36. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 35, onde o antagonista de célula B mencionado é um anticorpo contra CD20.

37. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 36, onde o anticorpo mencionado é um anticorpo murino quimérico/ monoclonal humano contra CD20.

38. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 37, onde o anticorpo mencionado contra CD20 é rituximab (RITUXAN®).

39. MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA FIBRÓTICA, onde o dito método compreende a administração a um paciente com necessidade de tal tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz de antagonista de célula B e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de receptor de integrina.

40. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 39, onde o dito antagonista de receptor de integrina é um anticorpo específico para um receptor de integrina.

41. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, onde o dito antagonista de receptor de integrina é selecionado do grupo que consiste de $\alpha\text{v}\beta 6$, $\alpha\text{v}\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$.

42. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 41, onde o dito antagonista de receptor de integrina é um receptor de integrina $\alpha 4\beta 1$ ou $\alpha 4\beta 7$.

43. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 42, onde o dito antagonista de receptor de integrina é natalizumab (TYSABRI®).

44. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 39, em que o paciente não possui uma doença autoimune.

45. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 39, onde o paciente não é um paciente de risco para o desenvolvimento de doença autoimune.

46. MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA FIBRÓTICA, onde o dito método compreende a administração a um paciente com necessidade de tal tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz de rituximab (RITUXAN®) e uma quantidade terapeuticamente eficaz de natalizumab (TYSABRI®).

47. MÉTODO PARA PREVENIR UMA DOENÇA FIBRÓTICA, onde o dito método compreende a administração a um paciente de risco para o desenvolvimento de uma ou mais doenças fibróticas de uma quantidade terapeuticamente eficaz de antagonista de célula B.

48. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 47, onde o dito paciente com risco de desenvolver uma ou mais doenças fibróticas foi exposto a uma ou mais condições ambientais que são conhecidas por aumentar o risco de fibrose de pulmão, fígado ou rins.

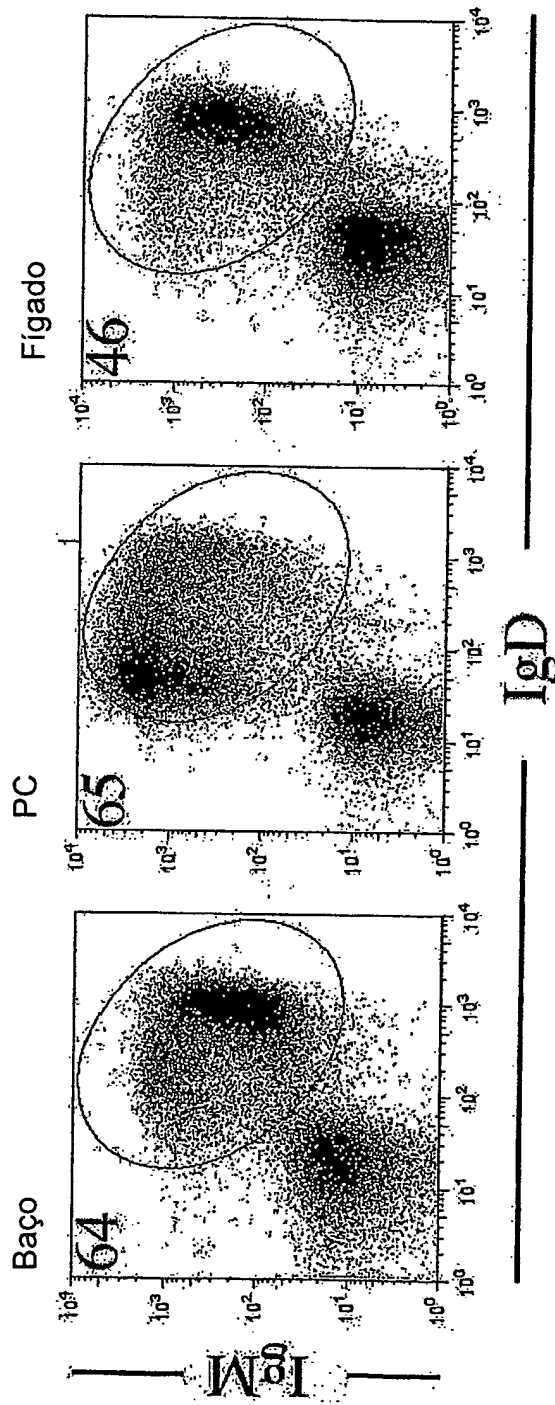
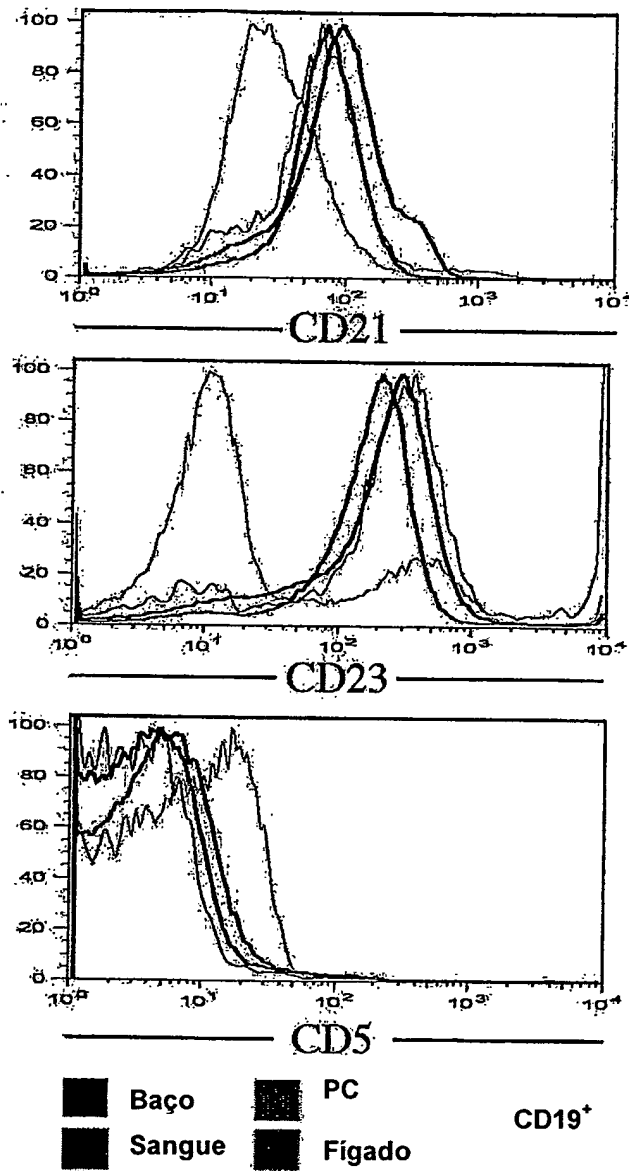
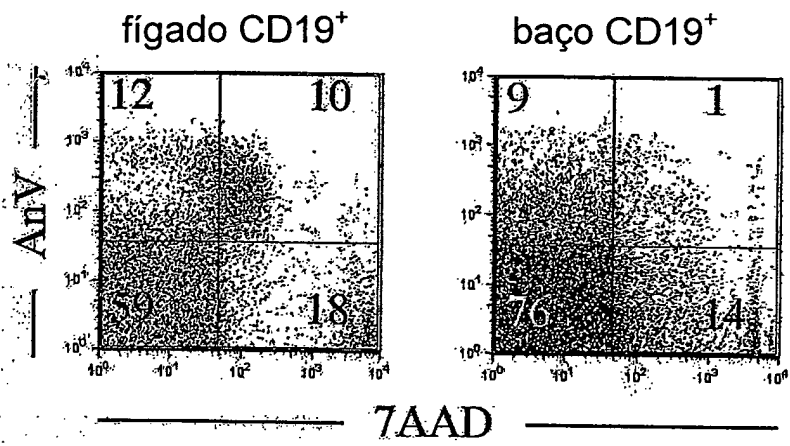


FIG. 1A

**FIG. 1B**

**FIG. 1C**

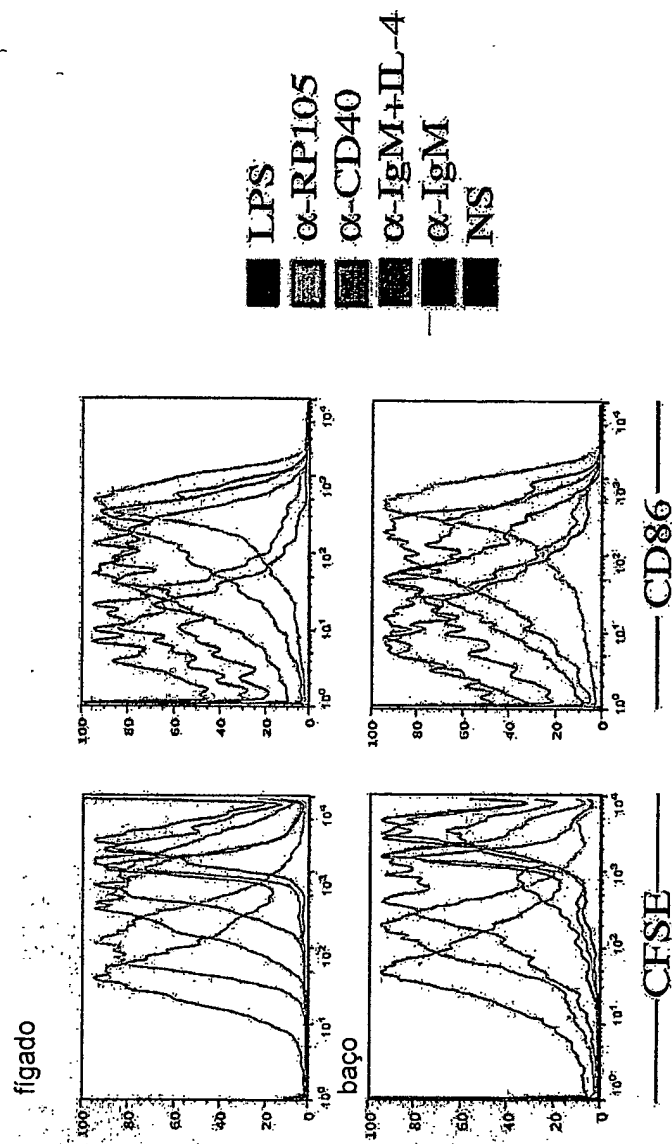


FIG. 1D

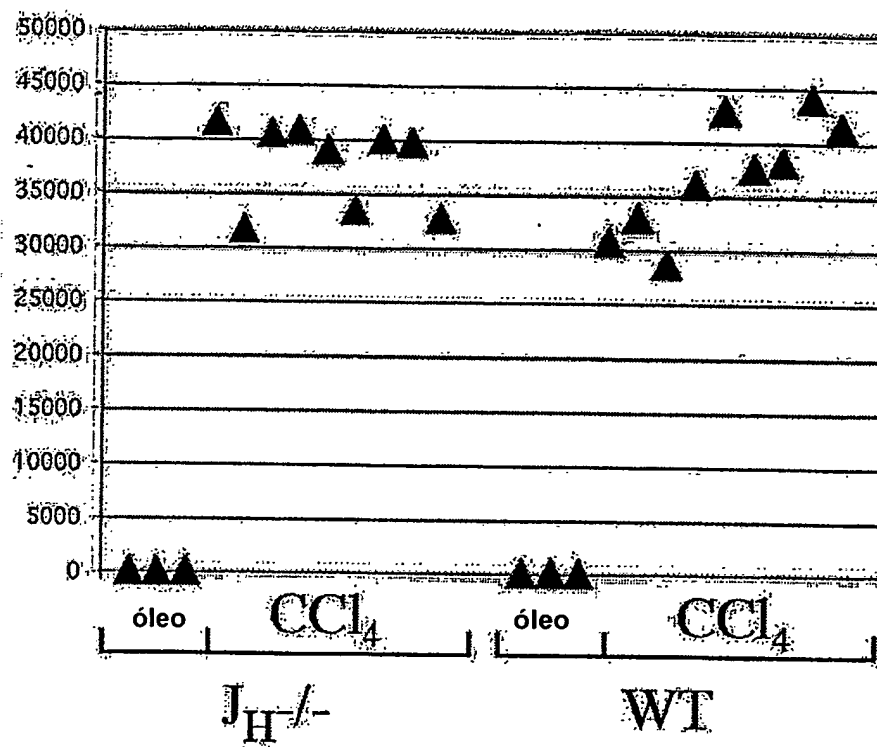


FIG. 2A

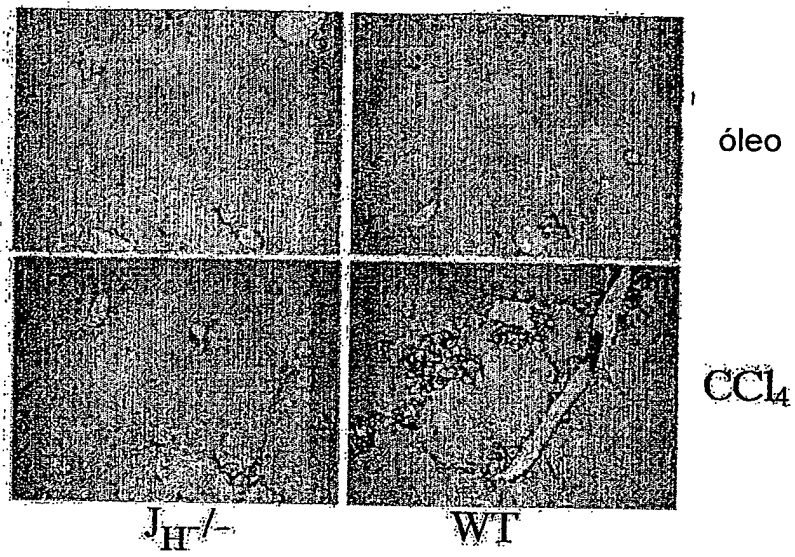


FIG. 2B

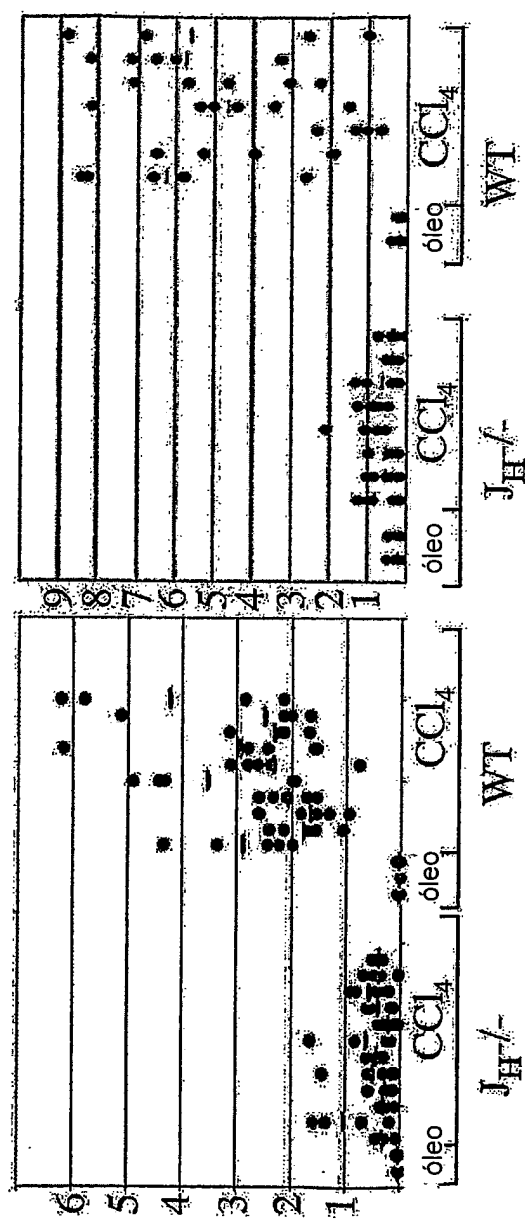
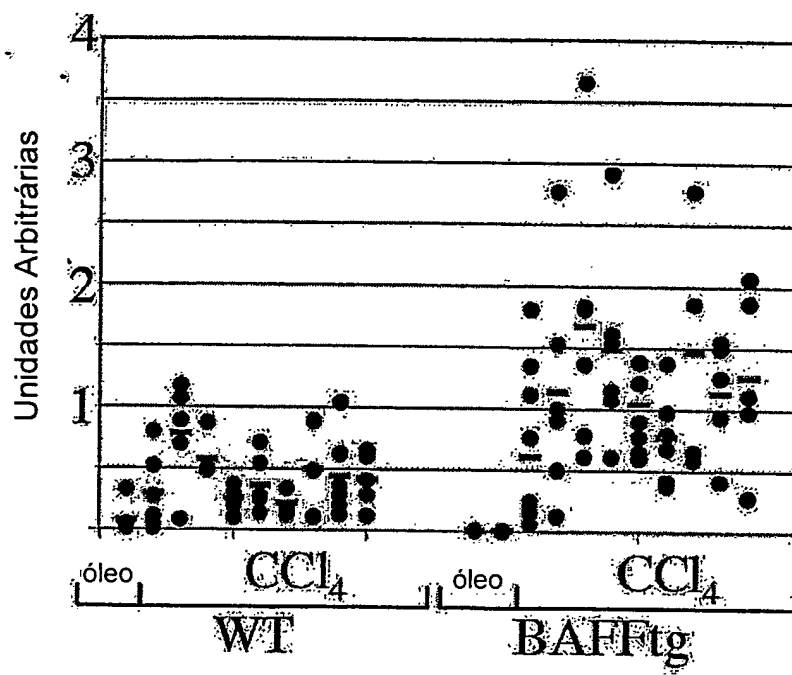


FIG. 2C

**FIG. 2D**

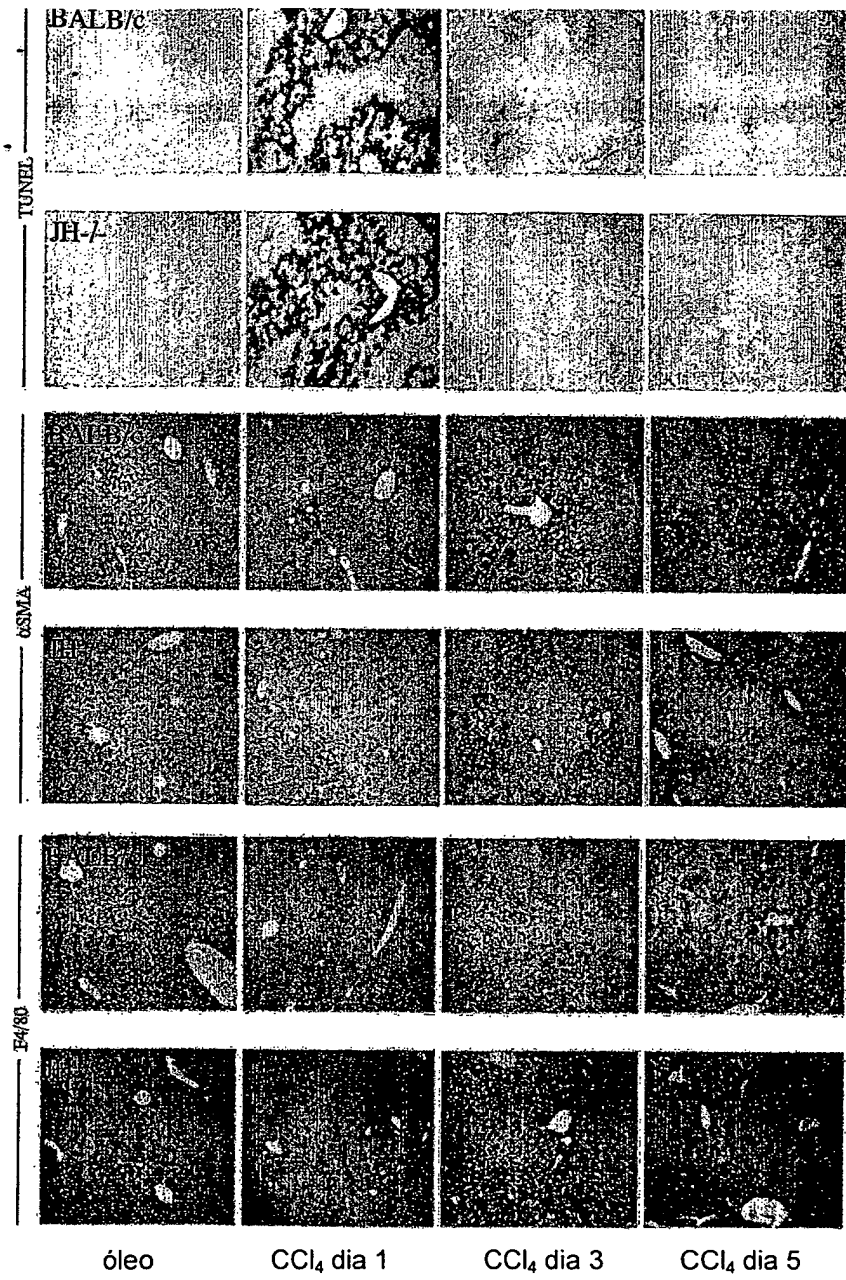


FIG. 3

10/22

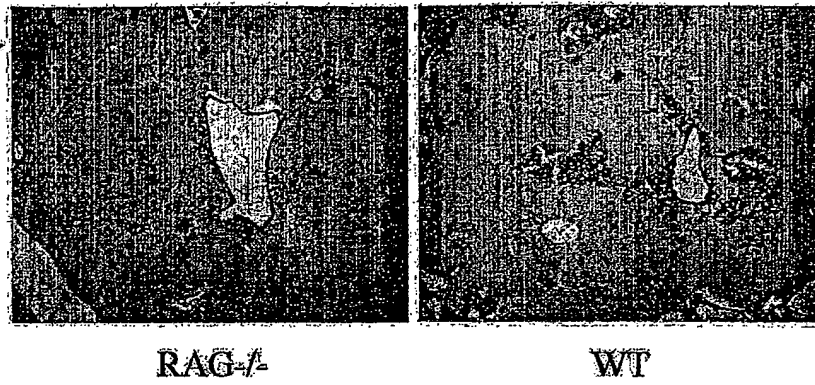
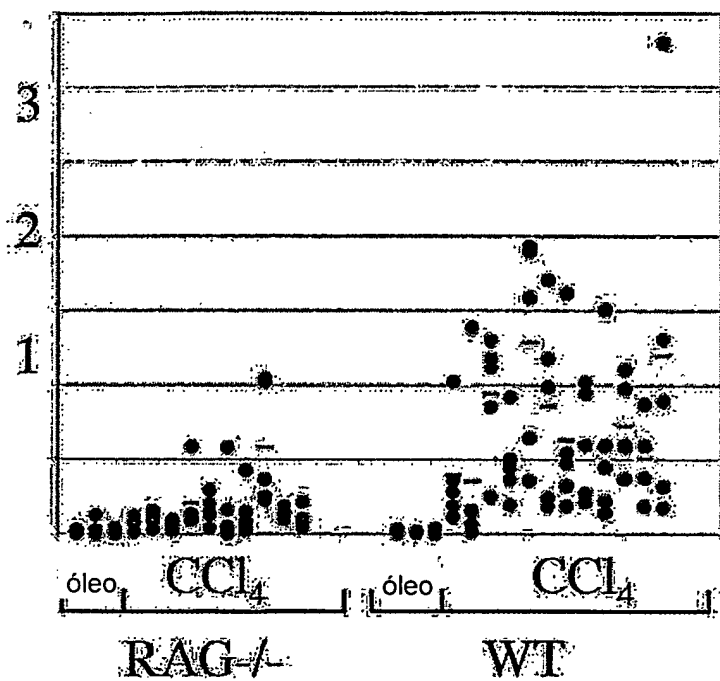
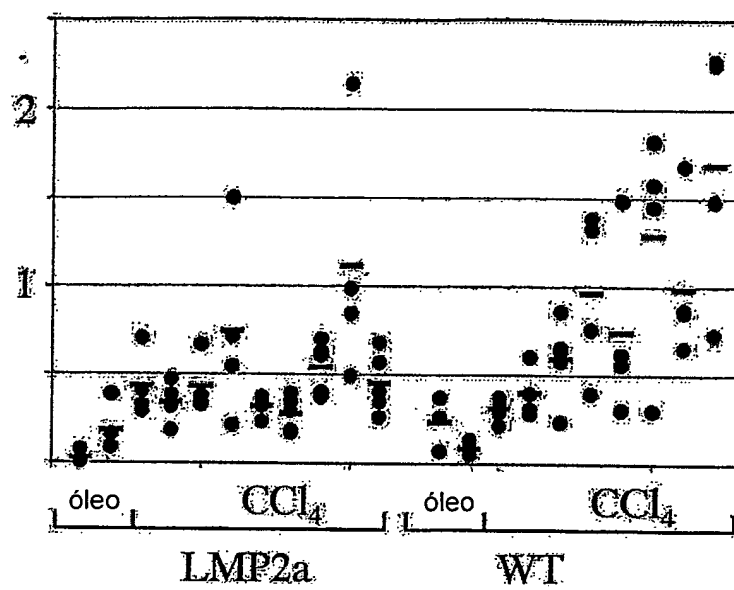
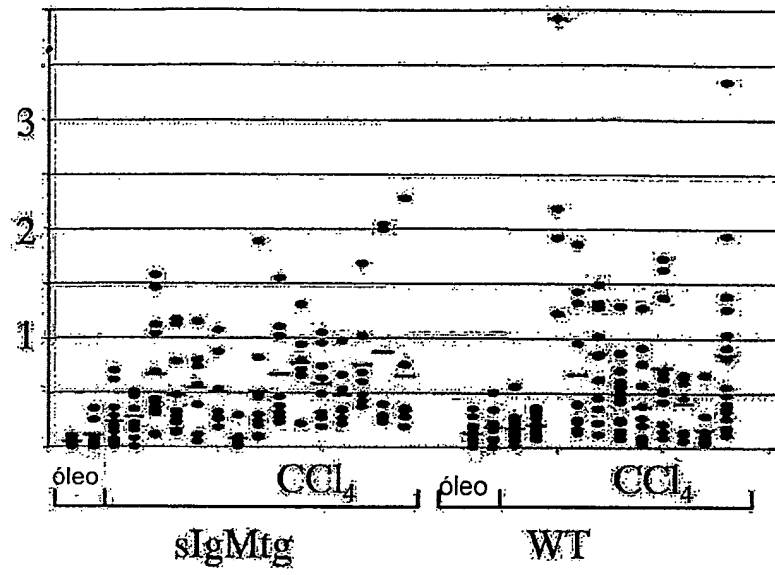
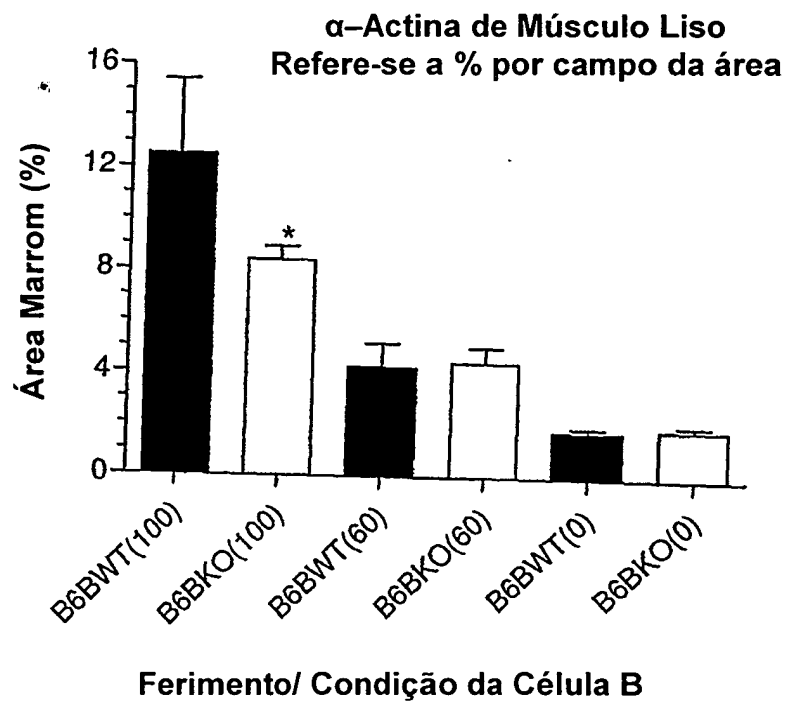


FIG. 4A

**FIG. 4B**

**FIG. 5A**

**FIG. 5B**

**FIG. 6**

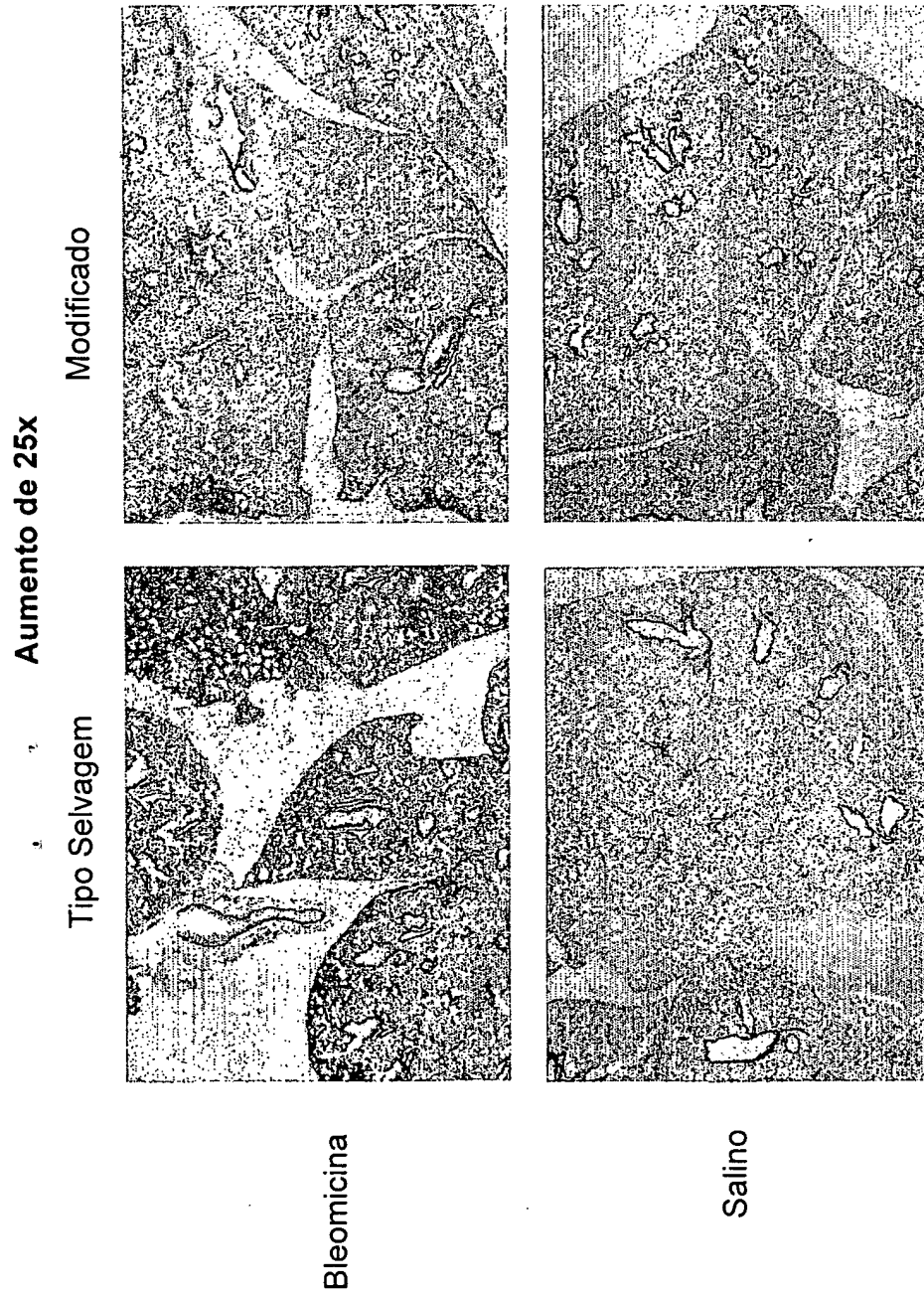


FIG. 7

**B6.129S2-Igh-6tm 1cgn B6 Células B Knockouts: Sobrevivência
melhorada em Bleomicina Crônica – Fibrose do Pulmão induzida**

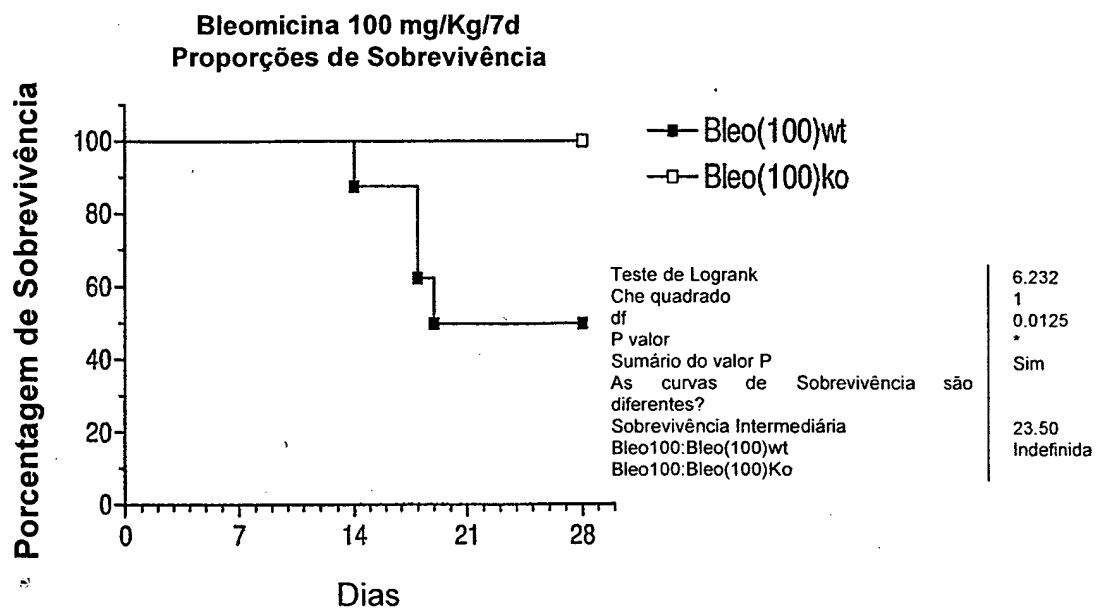
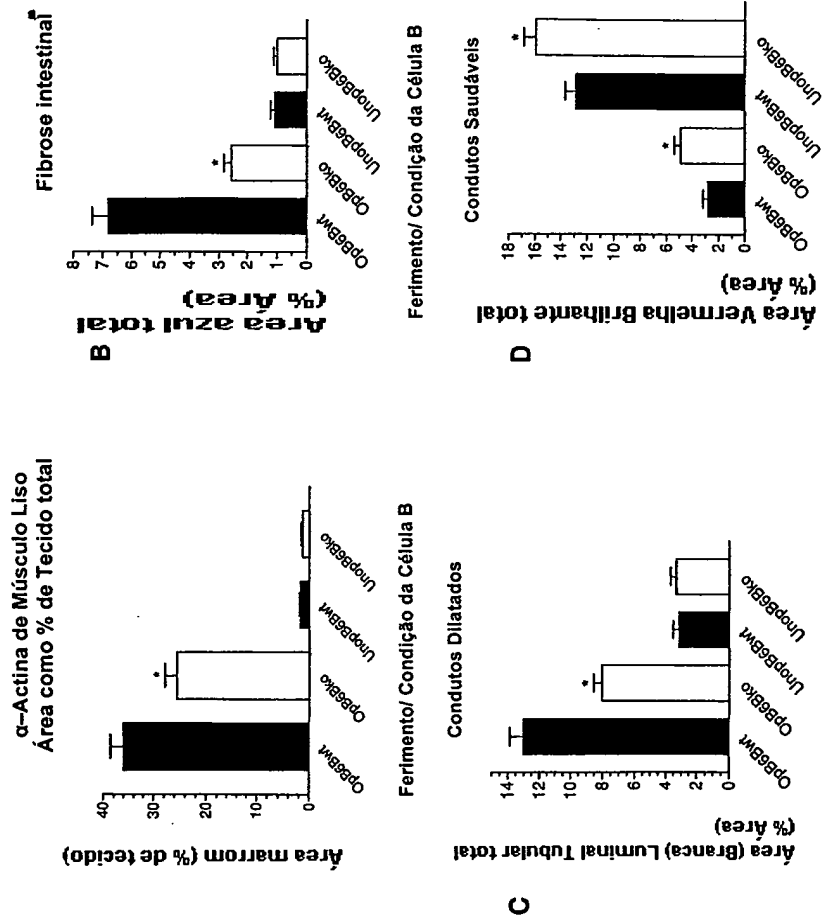


FIG. 8



Ferimento/ Condição da Célula B

FIG. 9

Ferimento/ Condição da Célula B

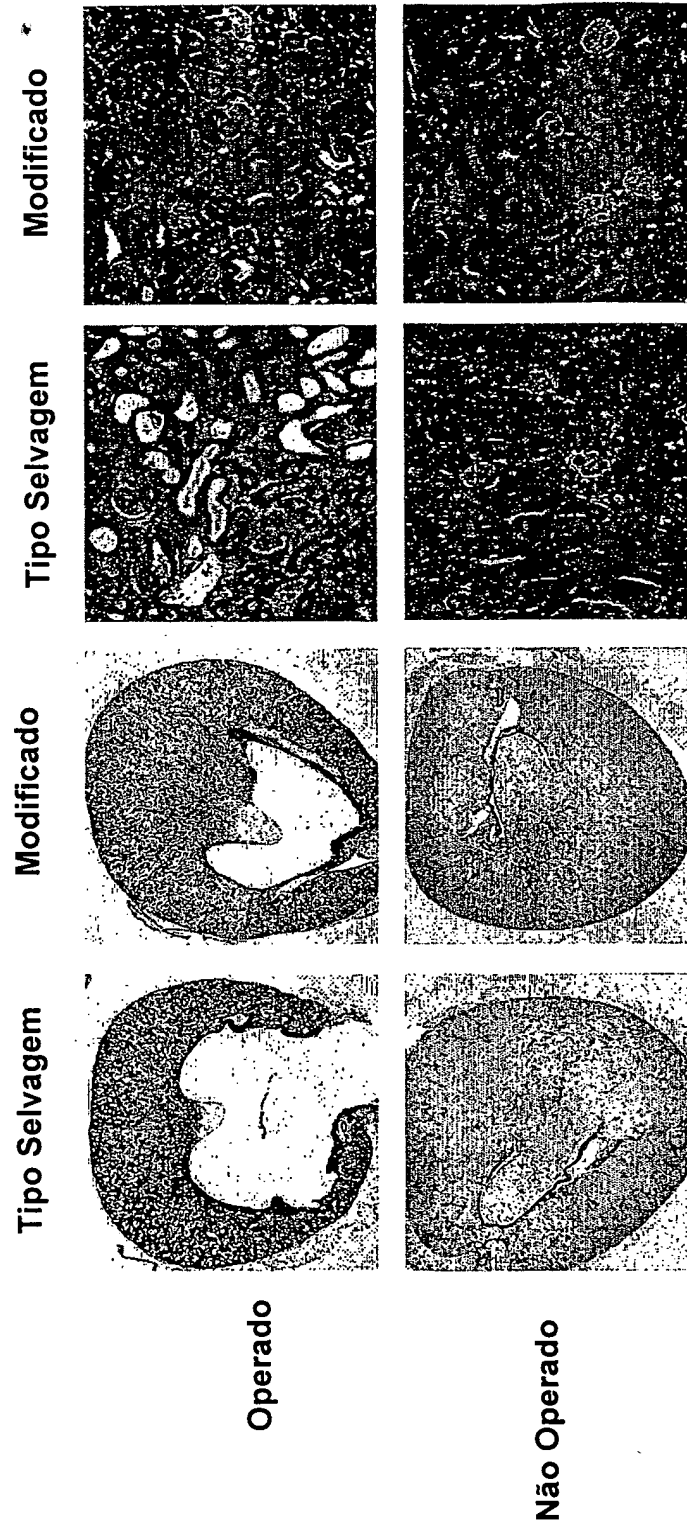


FIG. 10

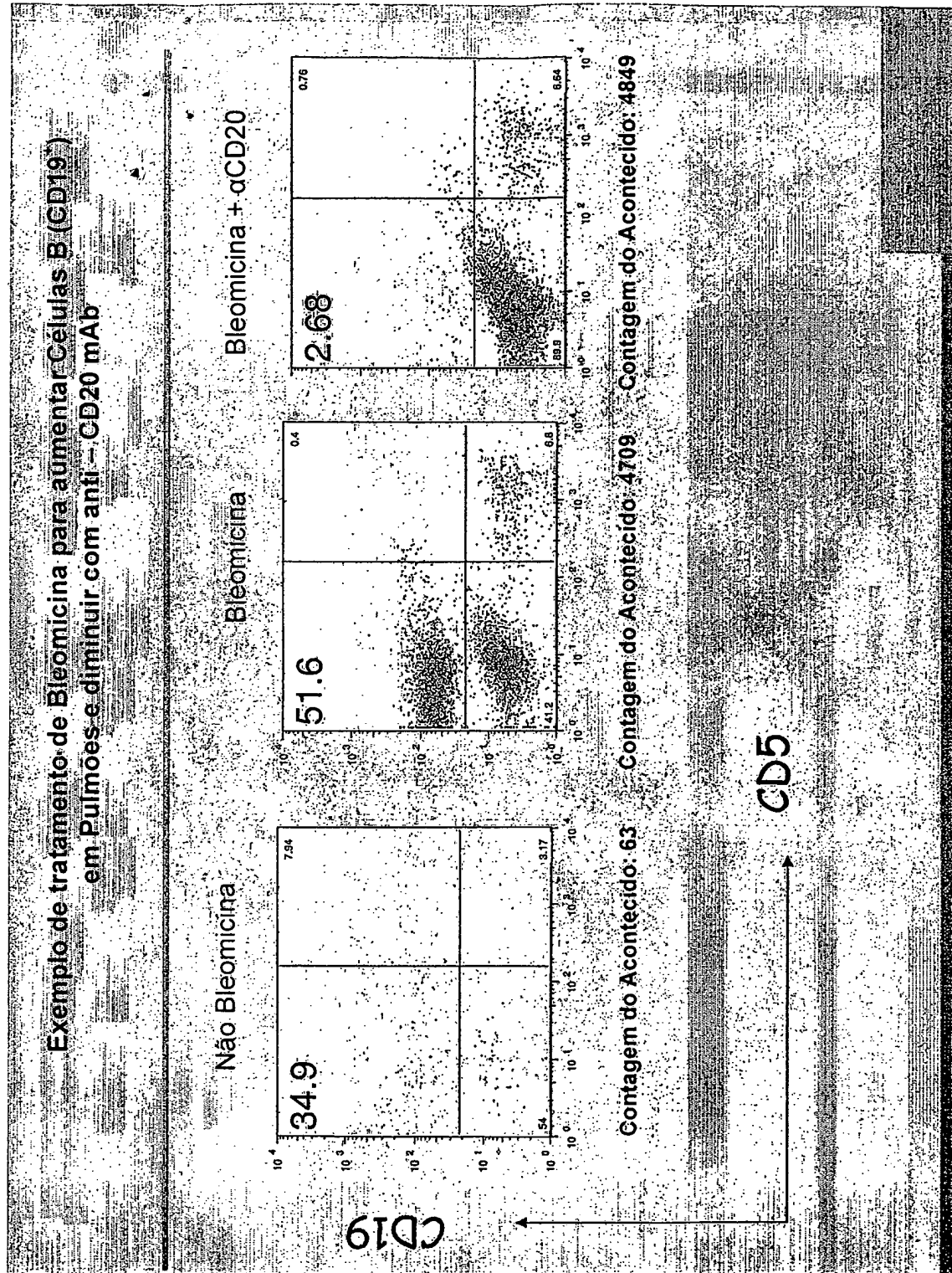


FIG. 11

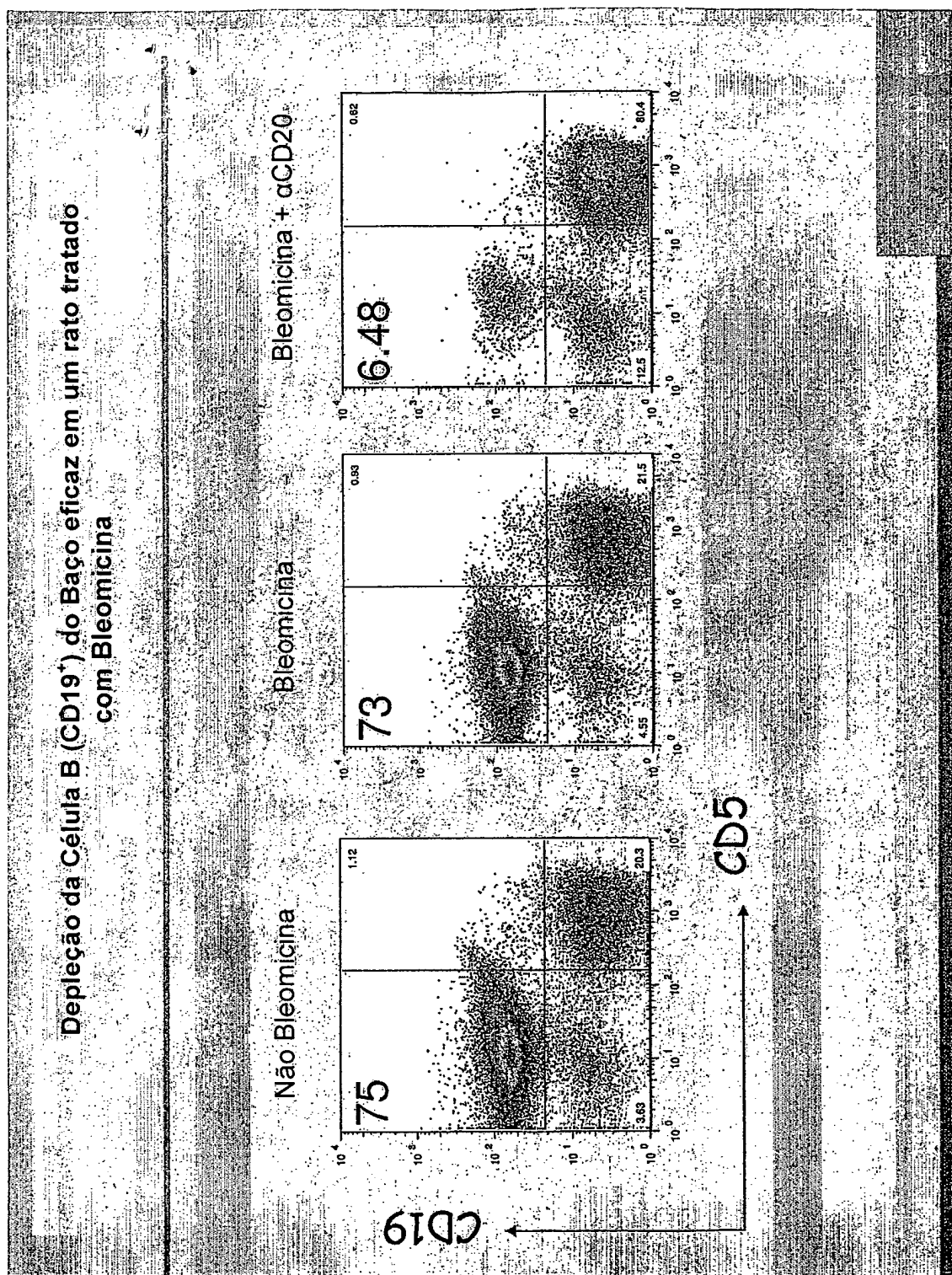
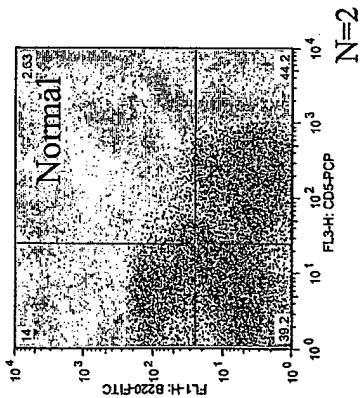
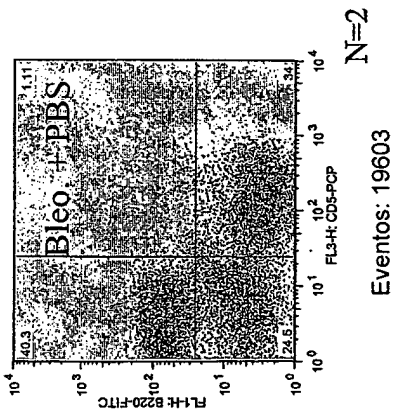


FIG. 12

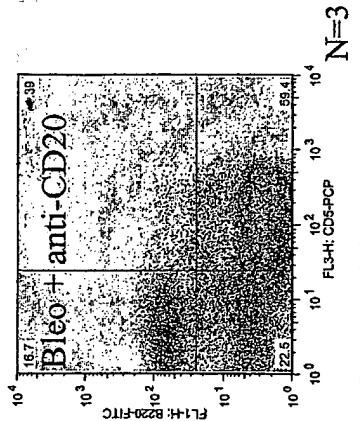
SKL021706.D03ÉFSC-H, SSC-H sub-sistema



SKL021706.A05ÉFSC-H, SSC-H sub-sistema



SKL021706.C03ÉFSC-H, SSC-H sub-sistema



SKL021706.B05ÉFSC-H, SSC-H sub-sistema

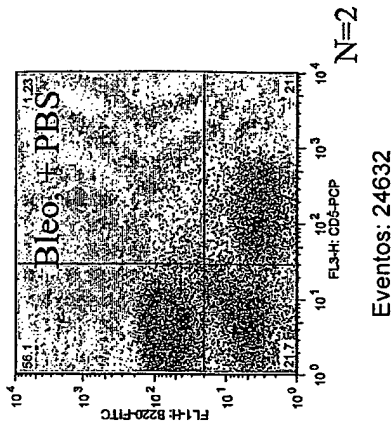
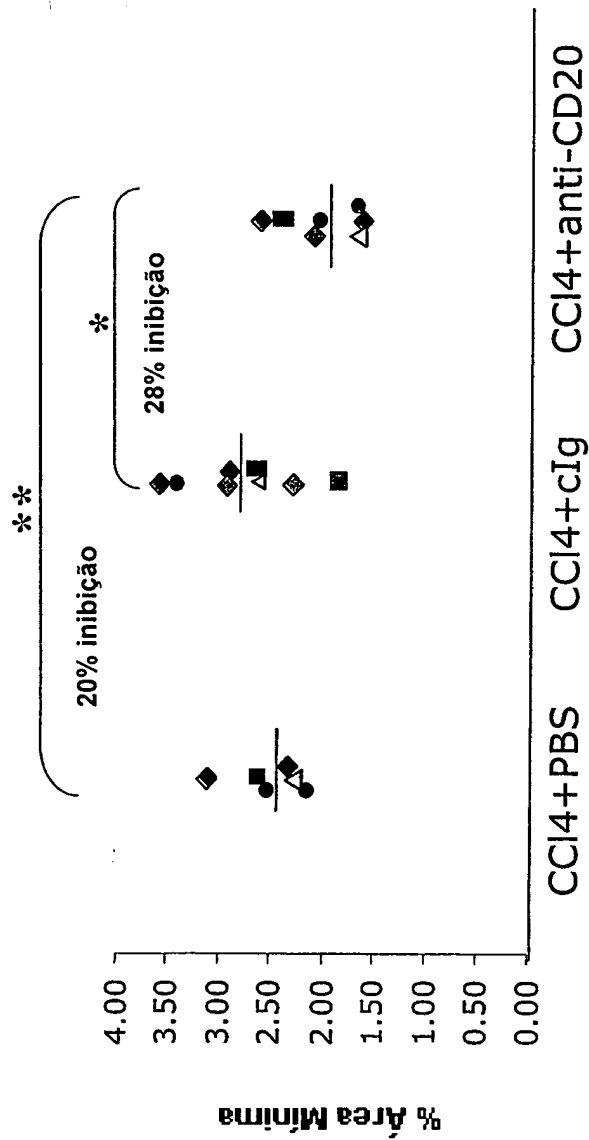


FIG. 13



* P= 0.005 anti-CD20 mAb vs controle 1g
** P= 0.04 anti-CD20 vs PBS

FIG. 14

RESUMO

**“MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO FIBRÓTICA,
MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE PULMONAR, MÉTODO PARA
TRATAR A FIBROSE HEPÁTICA, MÉTODO PARA TRATAR A FIBROSE
5 RENAL, MÉTODOS PARA TRATAR UMA DOENÇA FIBRÓTICA E MÉTODO
PARA PREVENIR UMA DOENÇA FIBRÓTICA”**

A presente invenção é dirigida aos métodos para o tratamento de
doenças fibróticas, tais como a fibrose de fígado, rim e pulmão, bem como as
doenças fibróticas de outros tecidos do corpo. Os métodos da invenção
10 compreendem a administração a um paciente com necessidade de tal
tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz de antagonista de
célula B. Exemplos de antagonistas de célula B que podem ser usados na
prática dos métodos da invenção incluem anticorpos contra antígenos de
superfície da célula B (por exemplo, anticorpos contra CD20), e antagonistas
15 de BAFF.