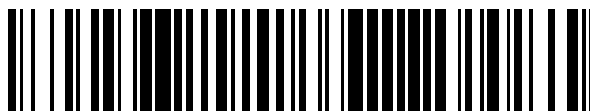


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 407**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00	(2006.01) A61P 37/08	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) C07K 16/28	(2006.01)
A61P 1/04	(2006.01) C12N 15/02	(2006.01)
A61P 1/16	(2006.01)	
A61P 11/06	(2006.01)	
A61P 17/02	(2006.01)	
A61P 19/02	(2006.01)	
A61P 21/04	(2006.01)	
A61P 29/00	(2006.01)	
A61P 37/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2007 E 07744945 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2047863**

54 Título: **Agente preventivo o remedio para enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

08.06.2006 JP 2006160096

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

14.11.2013

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1, UKIMA 5-CHOME, KITA-KU
TOKYO, 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**HASEGAWA, MASAKAZU;
KITAMURA, HIDETOMO;
ADACHI, HIDEKI y
KASUTANI, KEIKO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 429 407 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agente preventivo o remedio para enfermedades inflamatorias

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a nuevos agentes para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias, que comprenden antagonistas de NR 10 como ingredientes activos. La presente invención también se refiere a métodos para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias, que emplean antagonistas de NR 10.

Antecedentes de la técnica

10 Se conocen muchas citoquinas como factores humorales implicados en el crecimiento y la diferenciación de diversos tipos de células, o en la activación de funciones de la célula madura diferenciada. Las células estimuladas con citoquinas producen diferentes tipos de citoquinas, formando con ello redes de múltiples citoquinas en el cuerpo. La homeostasis biológica se mantiene mediante un delicado equilibrio de la regulación mutua entre las citoquinas de estas redes. Se cree que muchas enfermedades inflamatorias son el resultado de un fracaso de dichas redes de citoquinas. Así, la terapia anticitoquinas basada en anticuerpos monoclonales está atrayendo mucha atención. Por ejemplo, se ha demostrado que anticuerpos anti-TNF y anticuerpos anti-receptor de IL-6 son muy eficaces a nivel
15 clínico. Por otra parte, existen muchos ejemplos de fracasos en los que no se producen efectos terapéuticos cuando se bloquea solo una sola citoquina, tal como IL-4, debido a la activación de vías compensatorias en condiciones patológicas reales.

20 Los presentes inventores han logrado aislar un nuevo receptor de citoquinas, NR 10, que es altamente homólogo con gp130, un receptor para la transducción de señales de IL-6 (documento de patente 1). El NR 10 forma un heterodímero con el receptor de oncostatina M (OSMR) y actúa como receptor de IL-31 (documento que no es patente 1). Zymogenetics, Inc. ha indicado que ratones transgénicos que sobreexpresan IL-31 desarrollan de forma espontánea dermatitis prurítica (documento de patente 2).

25 Sin embargo, no puede afirmarse que la expresión forzada de una citoquina en ratones o un alto nivel sanguíneo de una citoquina en un modelo patológico de ratón sea, en efecto, la causa de una enfermedad. No existe información acerca de que se produzcan efectos terapéuticos cuando una señal es bloqueada por un anticuerpo. Por ejemplo, la dermatitis prurítica se desarrolla en ratones transgénicos en los que la IL-18 se sobreexpresa en queratinocitos. Además, la concentración sanguínea de IL-18 aumenta con el avance de trastornos patológicos en modelos de ratón NC/Nga para la dermatitis atópica espontánea. Basándose en los anteriores descubrimientos, se ha predicho que la sobreexpresión de IL-18 es la causa de la enfermedad. Sin embargo, en realidad, la administración de anticuerpos
30 neutralizantes no produce efectos terapéuticos (documento que no es patente 2).

35 Tal como se describió anteriormente, la inhibición de la función de una citoquina no produce necesariamente efectos terapéuticos en enfermedades en las que el nivel de expresión de una citoquina es elevado. Es difícil realizar una predicción de las enfermedades en las que se producen realmente efectos terapéuticos basándose en el nivel de expresión de una citoquina. Así, es importante encontrar enfermedades en las que la inhibición de la transducción de señales de una citoquina diana realmente produzca efectos terapéuticos.

A continuación se describen documentos de la técnica anterior de la presente invención:

- Documento de patente 1: WO 00/75314

- Documento de patente 2: WO 03/060090

40 - Documento que no es patente 1: IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis, J. Allergy Clin. Immunol., febrero de 2006, 117(2): 418-425.

- Documento que no es patente 2: Administration of anti-interleukin 18 antibody fails to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga, British Journal of Dermatology, 149: 39-45, 2003.

Descripción de la invención*Problemas que son resueltos por la invención*

45 La presente invención se consiguió a la vista de las circunstancias descritas anteriormente. Un objetivo de la presente invención es proporcionar terapias anticitoquinas basadas en antagonistas de receptores de citoquinas para enfermedades inflamatorias. De forma más concreta, el objetivo de la presente invención es descubrir enfermedades inflamatorias en las que puede obtenerse un efecto terapéutico con anticuerpos neutralizantes anti-NR 10, y proporcionar nuevos métodos para tratar dichas enfermedades. Otro objetivo de la presente invención es
50 proporcionar anticuerpos neutralizantes anti-NR 10 humano que puedan aplicarse de modo clínico a seres humanos.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores realizaron estudios especializados para resolver los objetivos descritos anteriormente. Los presentes inventores trataron de evaluar la eficacia como fármaco de anticuerpos neutralizantes anti-NR 10 de ratón en modelos de ratón para diversos trastornos patológicos. Los resultados demuestran que los anticuerpos neutralizantes producen el efecto de suprimir notablemente los síntomas en un modelo de ratón de dermatitis atópica que emplea ratones NC/Nga, y en un modelo de ratón para la dermatitis crónica, que fueron desarrolladas mediante la aplicación repetida de cloruro de picrilo. Esto demostró que los anticuerpos neutralizantes eran realmente útiles como agentes terapéuticos. Además, se demostró que los anticuerpos producían el efecto de suprimir síntomas en la artritis inducida por colágeno, un modelo para el reumatismo, y en la artritis inducida por colagenasa, un modelo para la osteoartritis. Estos resultados sugieren que el anticuerpo neutralizante de NR 10 de la presente invención puede utilizarse para prevenir o tratar la inflamación crónica. Los presentes inventores también pudieron obtener anticuerpos neutralizantes de NR 10 humano. De modo específico, la presente invención proporciona:

[1] Un anticuerpo anti-NR 10/IL-31 RA que tiene una actividad neutralizante de NR 10/IL-31 RA para su uso para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria, en el que la enfermedad inflamatoria es:

(a) dermatitis atópica, en el que el anticuerpo suprime al menos uno de los síntomas de la dermatitis atópica seleccionados del grupo que consiste en (1) prurito, (2) enrojecimiento y sangrado, (3) edema, (4) lesiones y daños en los tejidos, y (5) incrustaciones y sequedad;

(b) reumatismo; o

(c) osteoartritis.

[2] Un agente para su uso para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria, en el que el agente comprende el anticuerpo según [1] como ingrediente activo, y en el que la enfermedad inflamatoria es:

(a) dermatitis atópica, en el que el anticuerpo suprime al menos uno de los síntomas de la dermatitis atópica seleccionados del grupo que consiste en (1) prurito, (2) enrojecimiento y sangrado, (3) edema, (4) lesiones y daños en los tejidos, y (5) incrustaciones y sequedad;

(b) reumatismo; o

(c) osteoartritis.

[3] El anticuerpo para su uso según [1], o el agente para su uso según [2], en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

[4] El anticuerpo para su uso según [1] o [3], o el agente para su uso según [2] o [3], en el que NR 10/IL-31 RA es NR 10/IL-31 RA humano.

[5] El anticuerpo para su uso según uno cualquiera de [1], [3] o [4], o el agente para su uso según uno cualquiera de [2] a [4], en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.

[6] El anticuerpo o el agente para su uso según [5], en el que el anticuerpo recombinante es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano.

[7] Un fragmento y/o un fragmento químicamente modificado del anticuerpo de uno cualquiera de [1] o [3] a [6], para su uso según uno cualquiera de [1] o [3] a [6], en el que dicho fragmento es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.

[8] Un agente que comprende el fragmento para su uso según [7].

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra el resultado obtenido observando el efecto supresor del crecimiento celular de BM095 añadido a un sistema de ensayo del crecimiento celular utilizando células Ba/F3 dependientes de IL-31. El eje horizontal indica las concentraciones de mL-31 calculadas en el sistema de ensayo, y el eje vertical indica los recuentos de células (DO450 (absorbancia a 450 nm)). En la leyenda se muestran las cantidades de BM095 añadidas (unidad: ng/ml). Se observó un efecto supresor del crecimiento celular dependiente de la cantidad de BM095 añadido.

La figura 2 es una gráfica que muestra el efecto terapéutico producido cuando se administran anticuerpos anti-NR 10 a un modelo de ratón de dermatitis atópica. Se observó un significativo efecto supresor de la inflamación en el grupo al que se le administró anticuerpo anti-NR 10, comparado con el grupo de control negativo (grupo con vehículo).

La figura 3 es una gráfica que muestra el cambio secuencial en el peso corporal después de administrar anticuerpos anti-NR 10 a un modelo de ratón de dermatitis atópica. Se observó una pérdida de peso en el grupo al que se le

administró un agente antiinflamatorio existente. Por contraste, no se detectó cambio de peso en el grupo al que se le administró anticuerpo anti-NR 10. Así, se demostró que el anticuerpo anti-NR 10 es seguro.

La figura 4 es una gráfica que muestra el efecto terapéutico producido cuando se administran anticuerpos anti-NR 10 a un modelo de ratón de dermatitis crónica. Se descubrió un significativo efecto supresor del hinchamiento de la aurícula en el grupo al que se le administró anticuerpo anti-NR 10.

La figura 5 es una fotografía que muestra la tinción inmunohistoquímica de la aurícula de un un modelo de ratón de dermatitis crónica. Al igual que el caso del ser humano, se descubrió que la expresión de NR 10 de ratón estaba potenciada en la epidermis espesada.

La figura 6 es una gráfica que muestra el efecto supresor de la artritis producido cuando se administran anticuerpos anti-NR 10 en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno.

La figura 7 es una gráfica que muestra la relación entre el area bajo la curva (AUC) y la concentración de BM095 administrada en el modelo de la artritis inducida por colagenasa (osteoartritis). La AUC significa el área bajo la curva de transición de la diferencia entre la anchura de la articulación de la rodilla derecha e izquierda, definida como un valor que representa el hinchamiento de la articulación de la rodilla derecha.

La figura 8 es una gráfica que muestra la correlación entre la concentración de anticuerpos neutralizantes de NR 10 humano (anticuerpo purificado) y la actividad supresora del crecimiento celular en presencia de IL-31. Los anticuerpos 1, 2 y 3 muestran una fuerte actividad neutralizante de NR 10.

La figura 9 es una gráfica que muestra la correlación entre la concentración del anticuerpo quimérico NA633 contra NR 10 humano y la actividad supresora del crecimiento celular en presencia de IL-31. NA633 muestra una fuerte actividad neutralizante de NR 10.

La figura 10 es un diagrama que compara las secuencias de aminoácidos de NR 10 humano y NR 10 de mono cynomolgus. La secuencia con interlineado doble indica la región transmembrana.

La figura 11 es una gráfica que muestra la actividad supresora del crecimiento celular del anticuerpo quimérico NA633 en la línea celular BaF/OSMR humano/NR 10 de mono cynomolgus estimulada con IL-31 humana. NA633 también muestra una fuerte actividad neutralizante de NR 10 de mono cynomolgus.

La figura 12 es una gráfica que muestra la transición del porcentaje de cambio en el peso corporal en un modelo de ratón de colitis inducida por DSS.

La figura 13 es una gráfica que muestra la transición del cambio en el espesor de la aurícula en el modelo de dermatitis por contacto aguda utilizado cloruro de picrilo.

Mejor modo de realizar la invención

La presente invención se refiere a agentes para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias, que comprende antagonistas de NR 10 como ingredientes activos. Según la invención, el antagonista de NR 10 es un anticuerpo anti-NR 10/IL-31 RA. La presente invención se basa en el descubrimiento de los presentes inventores de que los antagonistas de NR 10 (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes anti-NR 10) suprimen significativamente los síntomas en modelos de ratón con dermatitis atópica, dermatitis crónica, reumatismo, osteoartritis o similares. El anticuerpo según la invención tiene actividad neutralizante de NR 10/IL-31 RA.

NR 10 es una proteína que forma un heterodímero con el receptor de oncostatina M (OSMR), y actúa como receptor de IL-31. NR 10 también se conoce por otros nombres, tales como glm-r (J. Biol. Chem., 277, 16831-16836, 2002), GPL (J. Biol. Chem., 278, 49850-49859, 2003), e IL-31 RA (Nat. Immunol., 5, 752-760, 2004). El NR 10 de la presente invención incluye proteínas denominadas con estos nombres. El NR 10 de la presente invención también incluye NR 10 derivado de seres humanos, ratones y otros mamíferos. El NR 10 preferido incluye NR 10 derivado de seres humanos y de ratones, pero no se limita a estos. Existen múltiples variantes de corte y empalme conocidos del NR 10 derivado de seres humanos (documento WO 00/075314). De los variantes de corte y emplame descritos anteriormente, NR 10.1 consiste en 662 aminoácidos y comprende un dominio transmembrana. NR 10.2 es una proteína de tipo receptor soluble que consiste en 252 aminoácidos sin el dominio transmembrana. Por otra parte, los variantes de corte y empalme de NR 10 conocidos que actúan como proteínas de receptor transmembrana incluyen NR 10.3 y IL-31RAv3. El NR 10 humano de la presente invención no está particularmente limitado, con la condición de que forme un heterodímero con el receptor de oncostatina M (OSMR) y de que actúe como receptor de IL-31. Los NR 10 preferidos incluyen NR 10.3 (también denominado ILRAv4 (Nat. Immunol., 5, 752-760, 2004)) e IL-31RAv3. NR 10.3 (IL-31RAv4) consiste en 662 aminoácidos (documento WO 00/075314; Nat. Immunol., 5, 752-760, 2004), e IL-31RAv3 consiste en 732 aminoácidos (n.º de registro de GenBank NM_139017). La secuencia de aminoácidos de IL-31RAv4 se muestra en SEQ ID NO:6, y la secuencia de aminoácidos de IL-31RAv3 se muestra en SEQ ID NO:7. Por otra parte, el NR 10 derivado de ratón incluyen proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.

Los antagonistas de NR 10 de la presente invención se refieren a sustancias que se unen a NR 10 y bloquean la transducción de señales intracelulares basada en la activación de NR 10, provocando con ello la pérdida o la supresión de actividades fisiológicas de las células. En la presente, las actividades fisiológicas incluyen, por ejemplo, actividades de inducción o supresión de la producción de sustancias fisiológicamente activas (por ejemplo, quimioquinas y citoquinas inflamatorias), actividades de potenciación o supresión de la secreción de sustancias, actividad de crecimiento, actividad inductora del crecimiento, actividad de supervivencia, actividad de diferenciación, actividad inductora de la diferenciación, actividad transcripcional, actividad de transporte a través de la membrana, actividad de unión, actividad proteolítica, actividad de fosforilación/desfosforilación, actividad de oxidación-reducción, actividad de transferencia, actividad nucleolítica, actividad de deshidratación, actividad inductora de la muerte celular, y actividad inductora de la apoptosis, pero no se limitan a estas.

La presencia de actividad antagonista puede determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los compuestos de ensayo se ponen en contacto con NR 10 expresado sobre la superficie de células en presencia de un ligando, y se determina si se genera o no una transducción de señales intracelulares, que es un indicador de la activación de NR 10. Esta determinación puede realizarse, por ejemplo, mediante el método descrito en el documento "Dillon S. R., *et ál.*, Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice, Nat. Immunol., julio 2004, 5(7):752-760". Se cree que los compuestos que inhiben la transducción de señales intracelulares en respuesta a la estimulación de ligandos actúan como antagonistas NR 10.

Los antagonistas de la presente invención pueden ser compuestos naturales o artificiales. Pueden utilizarse compuestos conocidos como antagonistas de la presente invención. También pueden utilizarse nuevos compuestos de los cuales se determina que tienen actividad antagonista mediante los métodos descritos anteriormente.

Según la presente invención, los antagonistas de NR 10 son anticuerpos que tienen actividad para neutralizar NR 10/IL-31 RA. Los "anticuerpos que tienen actividad neutralizante de NR 10" de la presente invención se refieren a anticuerpos que tienen actividad de suprimir actividades fisiológicas basadas en NR 10. Los "anticuerpos que tienen actividad neutralizante de NR 10" de la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales, y como realización preferida, incluyen anticuerpos monoclonales.

Estos anticuerpos monoclonales que tienen actividad neutralizante de NR 10 pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento: se preparan anticuerpos monoclonales anti-NR 10 utilizando como antígeno NR 10, o un fragmento de este, que se deriva de un mamífero, tal como un ser humano o un ratón, mediante métodos conocidos, y después se seleccionan los anticuerpos que tienen actividad neutralizante de NR 10 de los anticuerpos monoclonales anti-NR 10 obtenidos de esta manera. De modo específico, la inmunización se consigue mediante métodos de inmunización convencionales utilizando, como un antígeno sensibilizante, un antígeno deseado o células que expresan el antígeno deseado. Los anticuerpos monoclonales anti-NR 10 pueden prepararse fusionando las células inmunológicas obtenidas con células parentales conocidas utilizando métodos de fusión de células convencionales, y seleccionando para células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) mediante métodos de selección convencionales. Los animales que se van a inmunizar incluyen, por ejemplo, mamíferos, tales como ratones, ratas, conejos, ovejas, monos, cabras, burros, vacas, caballos y cerdos. El antígeno puede prepararse utilizando la secuencia del gen NR 10 conocida según métodos convencionales, por ejemplo, mediante métodos que emplean baculovirus (por ejemplo, documento WO 98/46777). Según se describe en los ejemplos que aparecen a continuación, los anticuerpos que tienen actividad neutralizante de NR 10 pueden seleccionarse, por ejemplo, ensayando el efecto de suprimir el crecimiento de una línea celular dependiente de IL-31 después de que se añada el anticuerpo candidato a las células de la línea celular dependiente de IL-31. Se considera que los anticuerpos que suprimen el crecimiento de la línea celular dependiente de IL-31 en el método descrito anteriormente tienen actividad neutralizante de NR 10.

Los hibridomas pueden prepararse, por ejemplo, según el método de Milstein *et ál.* (Kohler, G. y Milstein, C., Methods Enzymol. (1981), 73: 3-46) o similares. Cuando la inmunogenicidad de un antígeno es baja, la inmunización puede realizarse después de unir el antígeno a una macromolécula que tiene inmunogenicidad, tal como albúmina.

En una realización preferida de la presente invención, los anticuerpos que tienen actividad neutralizante de NR 10 incluyen anticuerpos monoclonales que tienen actividad para neutralizar la actividad de NR 10 humano. No existe ninguna limitación particular sobre el inmunógeno para preparar anticuerpos monoclonales que tengan actividad de neutralización del NR 10 humano, con la condición de que permita la preparación de anticuerpos que tengan actividad de neutralización del NR 10 humano. Por ejemplo, se sabe que existen múltiples variantes del NR 10 humano. Puede utilizarse cualquiera de los variantes como inmunógeno, con la condición de que permita la preparación de anticuerpos que tengan actividad neutralizante de NR 10 humano. Como alternativa, puede utilizarse un fragmento peptídico de NR 10 o una secuencia de NR 10 natural introducida con mutaciones artificiales como inmunógeno bajo las mismas condiciones. El NR 10.3 humano es un inmunógeno preferido para preparar anticuerpos de la presente invención que tengan actividad neutralizante de NR 10.

En la presente, los anticuerpos descritos anteriormente de la presente invención no están particularmente limitados, con la condición de que tengan actividad neutralizante de NR 10. Los anticuerpos también incluyen anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos humanos. Los anticuerpos quiméricos comprenden, por ejemplo, las regiones constantes de cadena pesada y ligera de un

anticuerpo humano, y las regiones variables de cadena pesada y ligera de un mamífero no humano, tal como un ratón. Los anticuerpos quiméricos pueden producirse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse clonando un gen de anticuerpo a partir de hibridomas, insertándolo en un vector apropiado, e introduciendo la construcción en hospedantes (véase, por ejemplo, Carl, A. K., Borrebaeck, James, W., Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). De forma específica, se sintetizan los ADNc de las regiones variables de anticuerpos (regiones V) a partir de ARNm de hibridomas utilizando la transcriptasa inversa. Tras haber obtenido los ADN que codifican las regiones V de un anticuerpo de interés, estos se acoplan con ADN que codifican las regiones constantes (regiones C) de un anticuerpo humano deseado. Las construcciones resultantes se insertan en vectores de expresión. Como alternativa, los ADN que codifican las regiones V de anticuerpos pueden insertarse en vectores de expresión que comprenden ADN que codifican las regiones C de un anticuerpo humano. Los ADN se insertan en vectores de expresión de forma que se expresan bajo la regulación de las regiones reguladoras de la expresión, por ejemplo, potenciadores y promotores. En la siguiente etapa, pueden transformarse células hospedantes con los vectores de expresión para permitir la expresión de anticuerpos quiméricos.

Un anticuerpo humanizado, que también se denomina un anticuerpo humano reformado, se obtiene transfiriendo una región determinante de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero no humano, tal como un ratón, con la CDR de un anticuerpo humano. También son conocidas las técnicas de recombinación genética convencionales para la preparación de estos anticuerpos. De forma específica, una secuencia de ADN diseñada para acoplarse a una CDR de un anticuerpo de ratón con las regiones de marco (FR) de un anticuerpo humano se sintetiza mediante PCR, utilizando varios oligonucleótidos contruidos para comprender porciones solapantes en sus extremos. Un anticuerpo humanizado puede obtenerse (1) acoplando el ADN resultante a un ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano; (2) incorporando esto en un vector de expresión; y (3) transfectando el vector en un hospedante para producir el anticuerpo (véase la solicitud de patente europea n.º EP 239.400, y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 96/02576). Se seleccionan las FR de anticuerpos humanos que se acoplan a través de CDR, en donde la CDR forma un sitio de unión al antígeno favorable. Según sea necesario, los aminoácidos en la región de marco de una región variable de un anticuerpo pueden sustituirse de modo que la CDR de un anticuerpo humano reformado forme un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato, K. *et ál.*, Cancer Res. (1993), 53, 851-856).

Los métodos para obtener anticuerpos humanos también son conocidos. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos humanos deseados con actividad de unión al antígeno (1) sensibilizando linfocitos humanos con los antígenos de interés o células que expresan antígenos de interés *in vitro*; y (2) fusionando los linfocitos sensibilizados con células de mieloma humanas, tales como US266 (véase la publicación Kokoku de solicitud de patente japonesa n.º (JP-B) H01-59878 (solicitud de patente japonesa examinada, aprobada, publicada para oposición)). Como alternativa, el anticuerpo humano deseado también puede obtenerse utilizando un antígeno deseado para inmunizar a un animal transgénico que comprende un repertorio completo de genes de anticuerpos humanos (véanse las publicaciones de solicitudes de patente internacional n.º WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, y WO 96/33735).

Además, se conocen técnicas para obtener anticuerpos humanos mediante inmunoabsorción con un banco de fagos de anticuerpos humanos. Por ejemplo, la región variable de un anticuerpo humano se expresa como una anticuerpo monocaténario (scFv) sobre la superficie de un fago, utilizando un método de presentación de fagos, y pueden seleccionarse los fagos que se unen al antígeno. Analizando los genes de fagos seleccionados, pueden determinarse las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de anticuerpos humanos que se unen al antígeno. Si se identifican las secuencias de ADN de scFv que se unen al antígeno, pueden construirse vectores de expresión apropiados que comprendan estas secuencias para obtener anticuerpos humanos. Estos métodos son muy conocidos (véanse los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, y WO 95/15388).

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera puede ser una secuencia de aminoácidos con una sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera de un anticuerpo que se ha confirmado que tiene actividad neutralizante de NR 10, con la condición de que se mantenga la actividad neutralizante de NR 10. Los métodos conocidos por los expertos en la técnica para preparar la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera de un anticuerpo que tiene actividad neutralizante de NR 10, que comprende una sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera incluyen métodos conocidos para introducir mutaciones en proteínas. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden preparar mutantes funcionalmente equivalentes a la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera del anticuerpo que tiene actividad neutralizante de NR 10, mediante la introducción de mutaciones apropiadas en la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera del anticuerpo que tiene actividad neutralizante de NR 10 utilizando mutagénesis dirigida específica de sitio (Hashimoto-Gotoh, T., Mizuno, T., Ogasahara, Y., y Nakagawa, M. (1995), An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis, Gene, 152, 271-275; Zoller, M. J., y Smith, M. (1983), Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, Methods Enzymol., 100, 468-500; Kramer, W.,

Drutsa, V., Jansen, H. W., Kramer, B., Pflugfelder, M., y Fritz, H. J. (1984), The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucleic Acids Res.*, 12, 9441-9456; Kramer, W., y Fritz H. J. (1987), Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, *Methods Enzymol.*, 154, 350-367; Kunkel, T. A. (1985), Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 488-492) o similares. Así, las regiones variables de cadena pesada o las regiones variables de cadena ligera que comprenden mutaciones en uno o más aminoácidos en la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera del anticuerpo que tiene actividad neutralizante de NR 10 también se incluyen en la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera de la presente invención.

Cuando se altera un resto aminoácido, el aminoácido preferiblemente se muta por un aminoácido o aminoácidos diferentes que conservan las propiedades de la cadena lateral del aminoácido. Los ejemplos de propiedades de las cadenas laterales de aminoácidos son: aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, y V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, y T), aminoácidos que comprenden cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L, I, y P), aminoácidos que comprenden cadenas laterales que contienen grupos hidroxilo (S, T, e Y), aminoácidos que comprenden cadenas laterales que contienen azufre (C y M), aminoácidos que comprenden cadenas laterales que contienen ácido carboxílico y amida (D, N, E, y Q), aminoácidos que comprenden cadenas laterales básicas (R, K, y H), y aminoácidos que comprenden cadenas laterales aromáticas (H, F, Y, y W) (los aminoácidos se representan mediante códigos de una letra entre paréntesis). Las sustituciones de aminoácidos dentro de cada grupo se denominan sustituciones conservativas. Se sabe que un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada, en la que uno o más restos aminoácidos en una secuencia de aminoácidos concreta están deletionados, añadidos y/o sustituidos por otros aminoácidos, pueden conservar la actividad biológica original (Mark, D. F. *et ál.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984), 81:5662-5666; Zoller, M. J. y Smith, M., *Nucleic Acids Res.* (1982), 10:6487-6500; Wang, A. *et ál.*, *Science* (1984), 224:1431-1433; Dalbadie-McFarland, G. *et ál.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982), 79:6409-6413). Estos mutantes comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera de la presente invención, más preferiblemente al menos 75%, aún más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 95% idéntica. En la presente, la coincidencia de secuencia se define como el porcentaje de restos idénticos a los de la secuencia de aminoácidos original de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera, determinado después de alinear las secuencias y de introducir huecos apropiados para maximizar la coincidencia de secuencia según sea necesario. La coincidencia de las secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante el método descrito anteriormente.

Como alternativa, una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera que comprende una sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera y conserva la actividad neutralizante de NR 10 puede obtenerse a partir de un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera. Las condiciones de hibridación rigurosas para aislar un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera incluyen, por ejemplo, las condiciones de urea 6 M, SDS al 0,4%, 0,5x SSC, y 37 °C, o unas condiciones de hibridación con una rigurosidad equivalente. Con condiciones más rigurosas, por ejemplo, las condiciones de urea 6 M, SDS al 0,4%, 0,1x SSC, y 42 °C, puede esperarse el aislamiento de ácidos nucleicos con una homología mucho mayor. Las secuencias de los ácidos nucleicos aislados pueden ser determinadas mediante los métodos conocidos descritos a continuación. La homología de secuencia de nucleótidos global del ácido nucleico aislado es al menos 50% o mayor coincidencia de secuencia, preferiblemente 70% o mayor, más preferiblemente 90% o mayor (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o mayor).

Un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera también puede aislarse utilizando, en lugar de los métodos descritos anteriormente que emplean técnicas de hibridación, métodos de amplificación de genes que emplean cebadores sintetizados basándose en la información de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera, por ejemplo, una reacción en cadena de polimerasa (PCR).

De modo específico, la coincidencia de una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos con otra puede determinarse utilizando el algoritmo BLAST, de Karlin y Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993), 90, 5873-5877). Se han desarrollado programas, tales como BLASTN y BLASTX, basados en este algoritmo (Altschul *et ál.*, *J. Mol. Biol.* (1990), 215, 403-410). Para analizar las secuencias de nucleótidos según BLASTN basado en BLAST, los parámetros se ajustan, por ejemplo, a una puntuación = 100 y una longitud de palabra = 12. Por otra parte, los parámetros utilizados para el análisis de secuencias de aminoácidos mediante BLASTX basado en BLAST incluyen, por ejemplo, una puntuación = 50 y una longitud de palabra = 3. Se emplean los parámetros por defecto para cada programa cuando se emplean los programas BLAST y Gapped BLAST. Las técnicas específicas para estos análisis son conocidas en la técnica (véase el sitio web de the National Center for Biotechnology Information (NCBI), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Como alternativa, los anticuerpos de la presente invención pueden ser minicuerpos. Estos minicuerpos de la presente invención incluyen fragmentos de anticuerpos que carecen de algunas porciones de un anticuerpo completo (por ejemplo, IgG completa), y no están particularmente limitados, con la condición de que conserven la actividad neutralizante de NR 10. Los minicuerpos de la presente invención no están particularmente limitados, con la condición de que sean porciones de anticuerpos completos. Los minicuerpos preferiblemente comprenden una región variable de cadena pesada (VH) o una región variable de cadena ligera (VL). Los minicuerpos particularmente preferidos comprenden VH y VL.

Los minicuerpos de la presente invención preferiblemente tienen un peso molecular más pequeño que los anticuerpos completos. Sin embargo, los minicuerpos pueden formar multímeros, por ejemplo, dímeros, trímeros o tetrámeros, y así sus pesos moleculares pueden ser mayores que los de los anticuerpos completos.

Los minicuerpos de la presente invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos scFv. Los anticuerpos scFv son polipéptidos monocatenarios contruidos uniendo una región variable de cadena pesada ([VH]) y una región variable de cadena ligera ([VL]) a través de un conector o similar (Huston, J. S. *et ál.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988), 85, 5879-5883; Plickthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, eds., Resenburt y Moore, Springer Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994)). El orden de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera que se van a unir no está particularmente limitado, y pueden disponerse en cualquier orden. A continuación se listan ejemplos de disposiciones:

[VH] conector [VL]

[VL] conector [VH]

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera puede comprender una sustitución, delección, adición y/o inserción. Además, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera también pueden carecer de algunas porciones o pueden añadirse con otros polipéptidos, con la condición de que tengan la capacidad de unión al antígeno cuando se unen entre sí. Como alternativa, las regiones variables pueden ser quimerizadas o humanizadas.

En la presente invención, los conectores que unen la región variable del anticuerpo comprenden conectores peptídicos arbitrarios que pueden introducirse utilizando ingeniería genética, o conectores sintéticos (por ejemplo, los conectores descritos en Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996).

Los conectores preferidos en la presente invención son los conectores peptídicos. Las longitudes de los conectores peptídicos no están particularmente limitadas, y los expertos en la técnica pueden seleccionar, de modo apropiado, las longitudes dependiendo del objetivo. Las longitudes típicas son de uno a 100 aminoácidos, preferiblemente de 3 a 50 aminoácidos, más preferiblemente de 5 a 30 aminoácidos, y en particular preferiblemente de 12 a 18 aminoácidos (por ejemplo, 15 aminoácidos).

Las secuencias de aminoácidos de estos conectores peptídicos incluyen, por ejemplo:

Ser

Gly-Ser

Gly-Gly-Ser

Ser-Gly-Gly

Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:8)

Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:9)

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:10)

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:11)

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:12)

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:13)

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:14)

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:15)

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:10))_n

(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:11))_n

en las que n es un número entero de 1 o mayor.

Los conectores sintéticos (agentes de entrecruzamiento químicos) incluyen agentes de entrecruzamiento que se emplean habitualmente para entrecruzar péptidos, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida (NHS), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(succinimidilo) (BS³), ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP), ditiobis(propionato de succinimidilo) (DTSSP), etilenglicol-bis(succinato de succinimidilo) (EGS), etilenglicol-bis(succinato de sulfosuccinimidilo) (sulfo-EGS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis[2-(succinimidoxicarbonilo)etil] sulfona (BSOCOES), y bis[2-(succinimidoxicarbonilo)etil] sulfona (sulfo-BSOCOES). Estos agentes de entrecruzamiento están disponibles en el mercado.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos en los que dos o más restos aminoácidos se han añadido a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de la presente invención. Además, las proteínas de fusión que resultan de una fusión entre uno de los anteriores anticuerpos y un segundo péptido o proteína se incluyen en la presente invención. Las proteínas de fusión pueden prepararse acoplando un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención y un polinucleótido que codifica un segundo péptido o polipéptido dentro de marco, insertando esto en un vector de expresión, y expresando la construcción de fusión en un hospedante. Algunas técnicas conocidas por los expertos en la técnica están disponibles para este fin. El péptido o polipéptido compañero que va a ser fusionado con un anticuerpo de la presente invención puede ser un péptido conocido, por ejemplo, FLAG (Hopp, T. P. *et ál.*, BioTechnology, 6, 1204-1210 (1988)), 6x His que consiste en seis restos His (histidina), 10x His, hemaglutinina de la gripe (HA), fragmento de c-myc humano, fragmento de VSV-GP, fragmento de p18HIV, T7-marcador, HSV-marcador, E-marcador, fragmento del antígeno T de SV40, marcador de Ick, fragmento de α -tubulina, B-marcador, fragmento de proteína C. Otros polipéptidos compañeros que van a ser fusionado con los anticuerpos de la presente invención incluyen, por ejemplo, GST (glutathión-S-transferasa), HA (hemaglutinina de la gripe), región constante de inmunoglobulina, β -galactosidasa, y MBP (proteína de unión a maltosa). Un polinucleótido que codifica uno de estos péptidos o polipéptidos disponibles en el mercado puede fusionarse con un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención. El polipéptido de fusión puede prepararse expresando la construcción de fusión.

Los anticuerpos de la presente invención pueden diferir en la secuencia de aminoácidos, el peso molecular, el punto isoeléctrico, la presencia/ausencia de cadenas de azúcares, y la conformación que depende de la célula o el hospedante que produce el anticuerpo, o el método de purificación. Sin embargo, el anticuerpo resultante se incluye en la presente invención, con la condición de que sea funcionalmente equivalente a un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, cuando un anticuerpo de la presente invención se expresa en células procariontes, por ejemplo, *E. coli*, se añade un resto metionina al N-terminal de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original. Estos anticuerpos se incluyen en la presente invención.

El anticuerpo de la presente invención puede prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. El anticuerpo puede prepararse, por ejemplo, mediante técnicas de recombinación genética conocidas por los expertos en la técnica basándose en la secuencia de un anticuerpo que reconoce NR 10. De modo específico, este anticuerpo puede prepararse construyendo un polinucleótido que codifica un anticuerpo basado en la secuencia de un anticuerpo que reconoce NR 10, insertando la construcción en un vector de expresión, y después expresándola en células hospedantes apropiadas (véase, por ejemplo, Co, M. S. *et ál.*, J. Immunol. (1994), 152, 2968-2976; Better, M. y Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989), 178, 476-496; Pluckthun, A. y Skerra, A., Methods Enzymol. (1989), 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986), 121, 652-663; Rousseaux, J. *et ál.*, Methods Enzymol. (1986), 121, 663-669; Bird, R. E. y Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991), 9, 132-137).

Los vectores incluyen vectores M13, vectores UC, pBR322, pBluescript, y pCR-Script. Como alternativa, cuando el objetivo es suclonar y cortar y escindir ADNc, los vectores incluyen, por ejemplo, pGEM-T, pDIRECT, y pT7, además de los vectores descritos anteriormente. Los vectores de expresión son particularmente útiles cuando se emplean vectores para producir los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, cuando el objetivo es la expresión en *E. coli*, tal como JM109, DH5 α , HB101, y XL1-Blue, los vectores de expresión no solo tienen las características descritas anteriormente que permiten la amplificación del vector en *E. coli*, sino que también deben portar un promotor que permita la expresión eficaz en *E. coli*, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward *et ál.*, Nature (1989), 341, 544-546; FASEB J. (1992), 6, 2422-2427), el promotor araB (Better *et ál.*, Science (1988), 240, 1041-1043), el promotor T7 o similares. Estos vectores incluyen pGEX-5X-1 (Pharmacia), sistema "QIAexpress" (Quiagen), pEGFP, o pET (en este caso, el hospedante es preferiblemente BL21 que expresa la ARN polimerasa de T7), además de los vectores descritos anteriormente.

Los vectores pueden comprender secuencias señal para la secreción de anticuerpos. Como secuencia señal para la secreción de anticuerpos puede utilizarse una secuencia señal pelB (Lei, S. P. *et ál.*, J. Bacteriol. (1987), 169, 4379) cuando una proteína se segrega hacia el periplasma de *E. coli*. El vector puede introducirse en las células hospedantes mediante cloruro de calcio o métodos de electroporación, por ejemplo.

Además de los vectores para *E. coli*, los vectores para producir los anticuerpos de la presente invención incluyen vectores de expresión de mamíferos (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen), pEF-BOS (Nucleic Acids. Res., 1990, 18(17), p. 5322), pEF, y pCDM8), vectores de expresión derivados de células de insecto (por ejemplo, el sistema de expresión de baculovirus "Bac-to-BAC" (Gibco-BRL) y pBacPAK8), vectores de expresión derivados de plantas (por

ejemplo, pMH1 y pMH2), vectores de expresión derivados de virus de animales (por ejemplo, pHSV, pMV, y pAdexLcw), vectores de expresión retrovíricos (por ejemplo, pZIPneo), vectores de expresión de levaduras (por ejemplo, kit de expresión de *Pichia* (Invitrogen), pNV11, y SP-Q01), y vectores de expresión de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pPL608 y pKTH50), por ejemplo.

- 5 Cuando el objetivo es la expresión en células animales, tales como células CHO, COS, y NIH3T3, los vectores deben tener un promotor fundamental para la expresión en células, por ejemplo, el promotor de SV40 (Mulligan *et ál.*, Nature (1979), 277, 108), el promotor de MMLV-LTR, el promotor de EF1 α (Mizushima *et ál.*, Nucleic Acids Res. (1990), 18, 5322), y el promotor de CMV, y más preferiblemente tienen un gen para seleccionar células transformadas (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos que permita la evaluación utilizando un agente (neomicina, G418 o similares). Los vectores con estas características incluyen pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, y pOP13, por ejemplo.

- 15 Además, puede utilizarse el siguiente método para la expresión de genes estable y la amplificación de genes en células: se introducen células CHO deficientes en una vía de síntesis de ácidos nucleicos con un vector (por ejemplo, pSV2-dhfr (Molecular Cloning, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)) que porta un gen DHFR que compensa la deficiencia, y el vector se amplifica utilizando metotrexato (MTX). Como alternativa, puede emplearse el siguiente método para la expresión transitoria de genes: células COS con un gen que expresa el antígeno T de SV40 en sus cromosomas se transforman con un vector (pcD y similares) con un origen de la replicación de SV40. También pueden utilizarse orígenes de la replicación derivados del virus de polio, adenovirus, virus del papiloma bovino (BPV) y similares. Para amplificar el número de copias de un gen en células hospedantes, los vectores de expresión también pueden portar marcadores de selección, tales como el gen de aminoglicósido transferasa (APH), el gen de timidina quinasa (TK), el gen de xantina-guanina fosforibosiltransferasa de *E. coli* (Ecogpt), y el gen de dihidrofolato reductasa (dhfr).

- 25 Los anticuerpos deseados obtenidos mediante los métodos descritos anteriormente pueden aislarse desde el interior de las células hospedantes o desde el exterior de las células (el medio o similares), y purificarse hasta la homogeneidad. Los anticuerpos pueden aislarse y purificarse mediante métodos que se emplean habitualmente para aislar y purificar anticuerpos, y el tipo de método no está limitado. Por ejemplo, los anticuerpos pueden aislarse y purificarse mediante la selección y combinación apropiadas de cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, desalación, precipitación con disolventes, extracción con disolventes, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, isoelectroenfoque, diálisis, recristalización y similares.

- 30 Las cromatografías incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía en fase inversa, y cromatografía de adsorción (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, ed. Daniel R. Marshak *et ál.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Los métodos cromatográficos descritos anteriormente pueden realizarse utilizando una cromatografía líquida, por ejemplo, HPLC y FPLC. Las columnas que pueden utilizarse para la cromatografía de afinidad incluyen columnas de proteína A y columnas de proteína G. Las columnas que emplean proteína A incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS, y Sepharose FF (GE Amersham Biosciences). La presente invención comprende anticuerpos que están altamente purificados utilizando estos métodos de purificación.

- La presente invención también proporciona agentes para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias, que comprenden, como ingredientes activos, fragmentos y/o productos de la modificación de un anticuerpo de la presente invención. Los fragmentos y/o productos de la modificación de los anticuerpos de la presente invención incluyen fragmentos de anticuerpos que carecen de algunas porciones de los anticuerpos de la presente invención (anticuerpos completos (por ejemplo, IgG completa), anticuerpos recombinantes (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos humanos), y minicuerpos (por ejemplo, anticuerpos scFv)), y no están particularmente limitados, con la condición de que conserven la capacidad de unirse a sus antígenos. Los fragmentos de anticuerpos de la presente invención no están particularmente limitados, con la condición de que sean porciones de anticuerpos completos. Los fragmentos preferiblemente comprenden una región variable de cadena pesada (VH) y/o una región variable de cadena ligera (VL). La secuencia de aminoácidos de VH o VL puede comprender sustituciones, delecciones, adiciones y/o inserciones. La VH y/o VL puede carecer de algunas porciones, con la condición de que se conserve la capacidad de unirse al antígeno. Además, la región variable puede quimerizarse o humanizarse. De modo específico, los fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Estos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse construyendo genes que codifican los fragmentos de anticuerpos, introduciéndolos en vectores de expresión, y después expresándolos en células hospedantes apropiadas (véase, por ejemplo, Co, M. S. *et ál.*, J. Immunol. (1994), 152, 2968-2976; Better, M. y Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989), 178, 476-496; Pluckthun, A. y Skerra, A., Methods Enzymol. (1989), 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986), 121, 652-663; Rousseaux, J. *et ál.*, Methods Enzymol. (1986), 121, 663-669; Bird, R. E. y Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991), 9, 132-137).

- Además, los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos conjugados que están unidos a una de diversas moléculas, tales como polietilenglicol (PEG), sustancias radiactivas, sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, enzimas y toxinas. Estos anticuerpos conjugados pueden obtenerse modificando químicamente los anticuerpos obtenidos. Se han establecido métodos para modificar anticuerpos en este campo (por ejemplo, documentos US 5057313 y US 5156840). Los "anticuerpos" de la presente invención también incluyen estos

anticuerpos conjugados.

La actividad de unión a NR 10 del anticuerpo puede determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos para determinar la actividad de unión al antígeno de un anticuerpo incluyen, por ejemplo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), EIA (inmunoensayo enzimático), RIA (radioinmunoensayo), y métodos de anticuerpos fluorescentes. Por ejemplo, cuando se emplea un inmunoensayo enzimático, se añaden muestras que contienen anticuerpos, tales como anticuerpos purificados y sobrenadantes de cultivos de células que producen anticuerpos, a placas revestidas con antígenos. Se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima, tal como fosfatasa alcalina, y las placas se incuban. Después de un lavado, se añade un sustrato enzimático, tal como fosfato de p-nitrofenilo, y se mide la absorbancia para evaluar la actividad de unión al antígeno.

Además, la actividad neutralizante de NR 10 de un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, mediante el método descrito en los ejemplos, que implica el ensayo del efecto de suprimir el crecimiento de la línea celular dependiente de IL-31.

Los antagonistas de NR 10 o los anticuerpos que tienen actividad neutralizante de NR 10 de la presente invención pueden utilizarse en los agentes para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias. Los presentes inventores han demostrado que la administración de anticuerpos neutralizantes de NR 10 de ratón produce unos notables efectos terapéuticos en modelos de animales para diversas enfermedades inflamatorias. Además, se ha indicado que la expresión de NR 10 humano está potenciada en la epidermis espesada de pacientes con dermatitis atópica (documento que no es patente 1). Los presentes inventores confirmaron, mediante tinción inmunohistoquímica, que, al igual que el caso en seres humanos, la expresión de NR 10 de ratón está potenciada en la epidermis espesada de las aurículas en el modelo de ratón de dermatitis crónica descrito anteriormente (ejemplo 5). Estos descubrimientos sugieren que NR 10 está implicado, de forma similar, en enfermedades inflamatorias en todas las especies animales, y que, al igual que los anticuerpos neutralizantes de NR 10 de ratón, los anticuerpos neutralizantes de NR 10 humano son eficaces para prevenir y tratar diversas enfermedades inflamatorias. Además, al igual que los descubrimientos descritos en este ejemplo, también se espera que los antagonistas de NR 10 distintos de anticuerpos tengan efectos terapéuticos sobre diversas enfermedades inflamatorias.

En la presente invención, una enfermedad inflamatoria se refiere a enfermedades con características patológicas implicadas en reacciones citológicas e histológicas que aparecen en los vasos sanguíneos afectados y tejidos adyacentes en respuesta a una lesión o una estimulación anómala provocada por agentes físicos, químicos o biológicos (Stedman's Medical Dictionary, 5ª ed., MEDICAL VIEW CO., 2005). En general, las enfermedades inflamatorias incluyen dermatitis (dermatitis atópica, dermatitis crónica y similares), enfermedades inflamatorias del intestino (colitis y similares), asma, artritis (artritis reumatoide, osteoartritis y similares), bronquitis, enfermedades autoinmunes de Th2, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, GVHD crónica, enfermedad de Crohn, espondilitis deformante, dolor lumbar, gota, inflamación después de cirugía o lesiones, hinchamiento, neuralgia, laringofaringitis, cistitis, hepatitis (esteatohepatitis no alcohólica, hepatitis alcohólica y similares), hepatitis B, hepatitis C, y arteriosclerosis.

Las enfermedades inflamatorias que son sujetos de la presente invención son la dermatitis atópica, el reumatismo y la osteoartritis.

Los presentes inventores han descubierto que los anticuerpos antagonistas de NR 10 tienen efectos terapéuticos contra la dermatitis atópica, el reumatismo y la osteoartritis. Por otra parte, se reveló que los anticuerpos antagonistas de NR 10 no producen efectos terapéuticos en modelos de dermatitis por contacto aguda y colitis aguda DSS.

Los agentes para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias de la presente invención comprenden, como ingrediente activo, un antagonista de NR 10 o un anticuerpo que tiene actividad neutralizante de NR 10 descrito anteriormente. La expresión "que comprende un antagonista de NR 10 como ingrediente activo" significa que comprende un antagonista de NR 10 como al menos uno de los ingredientes activos, y no limita los contenidos. Además, los agentes para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias de la presente invención también pueden comprender, en combinación con un antagonista de NR 10, otros ingredientes que potencian la prevención o el tratamiento de la enfermedad inflamatoria.

Los antagonistas de NR 10 de la presente invención pueden formularse según métodos convencionales (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, última edición, Mark Publishing Company, Easton, EEUU). Además, pueden comprender vehículos y/o aditivos farmacéuticamente aceptables si es necesario. Por ejemplo, pueden comprender tensioactivos (por ejemplo, PEG y Tween), excipientes, antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico), agentes colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, estabilizantes, agentes tamponantes (por ejemplo, ácido fosfórico, ácido cítrico y otros ácidos orgánicos), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), agentes suspensores, agentes isotónicos, ligantes, disgregantes, lubricantes, promotores de la fluidez, y correctivos. Sin embargo, los vehículos que pueden estar comprendidos en los agentes para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias de la presente invención no se limitan a esta lista. De hecho, pueden comprender de modo apropiado otros vehículos que se emplean de modo habitual, tales como ácido silícico anhidro ligero, lactosa, celulosa cristalina, manitol, almidón, carmelosa calcio, carmelosa sodio, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilacetaldietilaminoacetato,

polivinilpirrolidona, gelatina, triglicéridos de ácidos grasos de cadena de longitud media, aceite de ricino 60
hidrogenado con polioxi-etileno, sacarosa, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, sales inorgánicas y similares. Las
composiciones también pueden comprender otros polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, tales como
albúmina de suero, gelatina e inmunoglobulinas, y aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina y
5 lisina. Cuando la composición se prepara como una disolución acuosa para inyección, los antagonistas de NR 10
pueden disolverse en una disolución isotónica que comprende, por ejemplo, disolución salina fisiológica, dextrosa y
otros adyuvantes. Los adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol, y cloruro de sodio.
Además, pueden utilizarse concomitantemente agentes solubilizantes apropiados, por ejemplo, alcoholes (por
ejemplo, etanol), polialcoholes (por ejemplo, propilenglicoles y PEG), y detergentes no iónicos (polisorbato 80 y
10 HCO-50).

Si es necesario, los antagonistas de NR 10 pueden encapsularse en microcápsulas (microcápsulas fabricadas con
hidroxilcelulosa, gelatina, poli(metracrilato de metilo) y similares), y formarse como componentes de sistemas de
transporte de fármacos coloidales (liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y
nanocápsulas) (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 16ª edición, y Oslo ed. (1980)). Además,
15 son conocidos métodos para fabricar fármacos de liberación sostenida, y estos pueden aplicarse a los antagonistas
de NR 10 (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. (1981), 15, 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982), 12, 98-105;
patent de EEUU n.º 3.773.919; solicitud de patente europea (EP) n.º 58.481; Sidman *et al.*, Biopolymers (1983), 22,
547-556; documento EP 133.988).

Los agentes para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias de la presente invención pueden administrarse por
20 vía oral o parenteral, pero se administran preferiblemente por vía parenteral. De modo específico, los agentes se
administran a pacientes mediante inyección o administración percutánea. Las inyecciones incluyen, por ejemplo,
inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, e inyecciones subcutáneas, para la administración sistémica
o local. Los agentes pueden administrarse en sitios en los que la inflamación debe suprimirse, o áreas que rodean a
los sitios mediante infusión local, inyección intramuscular en particular. Los métodos de administración pueden
25 seleccionarse, de forma apropiada, según la edad y el trastorno del paciente. Una dosis de administración única
puede seleccionarse, por ejemplo, en el intervalo de 0,0001 a 100 mg de ingrediente activo por kg de peso corporal.
Como alternativa, cuando los agentes se administran a pacientes humanos, la dosis del ingrediente activo puede
seleccionarse en el intervalo de 0,001 a 1.000 mg/kg de peso corporal. Una dosis de administración única
preferiblemente comprende, por ejemplo, antagonistas de NR 10 de aproximadamente 0,01 a 50 mg/kg de peso
30 corporal. Sin embargo, la dosis de un agente para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias de la presente
invención no se limita a estos ejemplos.

La presente invención también proporciona anticuerpos que tienen actividad neutralizante de NR 10 (incluyendo
fragmentos de anticuerpos que tienen actividad neutralizante de NR 10 y/o los productos de su modificación; la
misma definición se emplea a lo largo de la siguiente descripción). Los anticuerpos que tienen actividad neutralizante
35 de NR 10 de la presente invención son útiles como ingredientes activos en los agentes descritos anteriormente para
prevenir o tratar enfermedades inflamatorias. Los anticuerpos que tienen actividad neutralizante de NR 10 de la
presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales, pero preferiblemente son anticuerpos
monoclonales. Estos anticuerpos monoclonales que tienen actividad neutralizante de NR 10 pueden obtenerse
mediante los métodos descritos anteriormente. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención tienen
40 actividad para neutralizar el NR 10 derivado de mamíferos, o sus fragmentos, preferiblemente tienen actividad para
neutralizar NR 10 derivado de seres humanos o ratones, o sus fragmentos, y más preferiblemente tienen actividad
para neutralizar NR 10 derivado de seres humanos, o sus fragmentos. El NR 10 humano, o un fragmento peptídico
de este, puede utilizarse como inmunógeno para preparar anticuerpos monoclonales que tienen actividad para
neutralizar NR 10 humano. Como alternativa, los anticuerpos que tienen actividad neutralizante de NR 10 de la
45 presente invención pueden ser anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos recombinantes que tienen actividad
neutralizante de NR 10 de la presente invención incluyen, pero no se limitan a anticuerpos quiméricos, anticuerpos
humanizados, anticuerpos humanos y minicuerpos.

En la presente invención, los anticuerpos que tienen actividad neutralizante de NR 10 incluyen, por ejemplo,
anticuerpos anti-NR 10 de ratón que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende
50 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:3.

La presente invención también incluye anticuerpos monoclonales que tienen actividad para neutralizar NR 10
humano. Los anticuerpos monoclonales que tienen actividad para neutralizar NR 10 humano de la presente
invención pueden obtenerse preparando anticuerpos monoclonales utilizando NR 10 humano, o un fragmento
55 peptídico de este, como inmunógeno, y después seleccionando, a partir de los anticuerpos monoclonales anti-NR 10
humano, los anticuerpos que tienen actividad para neutralizar NR 10, basándose en el sistema de ensayo descrito
anteriormente empleando la línea celular dependiente de IL-31.

En la presente invención, los anticuerpos que tienen actividad para neutralizar NR 10 humano incluyen los
anticuerpos descritos en cualquiera de:

60 (a) anticuerpos que tienen una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que

consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:18, 19 y 20, respectivamente;

(b) anticuerpos que tienen una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:21, 22 y 23, respectivamente;

(c) anticuerpos que tienen la región variable de cadena pesada de (a) y la región variable de cadena ligera de (b); y

5 (d) anticuerpos que reconocen el mismo epítipo que el que reconocen los anticuerpos de cualquiera de (a) a (c).

El hecho de que un anticuerpo reconozca el mismo epítipo que el que reconoce otro anticuerpo puede confirmarse mediante la competición entre los dos anticuerpos frente al epítipo. La competición entre los anticuerpos puede evaluarse mediante ensayos de unión competitiva empleando medios, tales como ELISA, el método de transferencia de energía de fluorescencia (FRET), y la tecnología de ensayo de microvolúmenes fluorimétrico (FMAT(R)). La cantidad de anticuerpos unidos a un antígeno se correlaciona indirectamente con la capacidad de unión de anticuerpos competidores candidatos (anticuerpos de ensayo), que se unen competitivamente al mismo epítipo. En otras palabras, a medida que la cantidad o la afinidad de los anticuerpos de ensayo frente al mismo epítipo aumenta, disminuye la cantidad de anticuerpos unidos al antígeno, y aumenta la cantidad de anticuerpos de ensayo unidos al antígeno. De modo específico, los anticuerpos marcados de forma apropiada y los anticuerpos que se van a evaluar se añaden simultáneamente a los antígenos, y así, los anticuerpos unidos se detectan utilizando el marcador. La cantidad de anticuerpos unidos al antígeno puede determinarse con facilidad marcando los anticuerpos con anterioridad. Este marcador no está particularmente limitado, y el método de marcaje se selecciona según la técnica de ensayo utilizada. El método de marcaje incluye marcaje fluorescente, radiomarcaje, marcaje enzimático y similares.

20 Por ejemplo, anticuerpos marcados de modo fluorescente y anticuerpos no marcados o anticuerpos de ensayo se añaden simultáneamente a células animales que expresan NR 10, y los anticuerpos marcados se detectan mediante la tecnología de ensayo de microvolúmenes fluorométrico.

La CI_{50} es la concentración en la que la cantidad de anticuerpos marcados unidos al epítipo se reduce en 50% por la unión de anticuerpos no marcados. En la presente, los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo son anticuerpos que pueden reducir la cantidad de anticuerpos marcados unidos al epítipo en al menos 50% cuando la concentración de los anticuerpos de ensayos es diez veces mayor que la CI_{50} de los anticuerpos no marcados.

Los anticuerpos que tienen actividad para neutralizar NR 10 humano que se emplean en la presente invención preferiblemente también tienen actividad de unión a NR 10 de mono cynomolgus, y más preferiblemente tienen actividad para neutralizar NR 10 de mono cynomolgus. El NR 10 de mono cynomolgus que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 puede utilizarse en mediciones de la actividad para neutralizar o unirse a NR 10 de mono cynomolgus.

La presente invención también proporciona los usos terapéuticos descritos a continuación. La interpretación de NR 10, antagonistas, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, enfermedades inflamatorias y otros en los métodos son como se describió anteriormente.

35 [1] Un anticuerpo anti-NR 10/IL-31 RA que tiene una actividad neutralizante de NR 10/IL-31 RA para su uso para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria, en el que la enfermedad inflamatoria es:

(a) dermatitis atópica, en el que el anticuerpo suprime al menos uno de los síntomas de la dermatitis atópica seleccionados del grupo que consiste en (1) prurito, (2) enrojecimiento y sangrado, (3) edema, (4) lesiones y daños en los tejidos, y (5) incrustaciones y sequedad;

40 (b) reumatismo; o

(c) osteoartritis.

[2] Un agente para su uso para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria, en el que el agente comprende el anticuerpo según [1] como ingrediente activo, y en el que la enfermedad inflamatoria es:

45 (a) dermatitis atópica, en el que el anticuerpo suprime al menos uno de los síntomas de la dermatitis atópica seleccionados del grupo que consiste en (1) prurito, (2) enrojecimiento y sangrado, (3) edema, (4) lesiones y daños en los tejidos, y (5) incrustaciones y sequedad;

(b) reumatismo; o

(c) osteoartritis.

50 [3] El anticuerpo para su uso según [1], o el agente para su uso según [2], en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

[4] El anticuerpo para su uso según [1] o [3], o el agente para su uso según [2] o [3], en el que NR 10/IL-31 RA es

NR 10/IL-31 RA humano.

[5] El anticuerpo para su uso según uno cualquiera de [1], [3] o [4], o el agente para su uso según uno cualquiera de [2] a [4], en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.

5 [6] El anticuerpo o el agente para su uso según [5], en el que el anticuerpo recombinante es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano.

[7] Un fragmento y/o un fragmento químicamente modificado del anticuerpo de uno cualquiera de [1] o [3] a [6], para su uso según uno cualquiera de [1] o [3] a [6], en el que dicho fragmento es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.

[8] Un agente que comprende el fragmento para su uso según [7].

Ejemplos

10 A continuación, la presente invención se describirá específicamente haciendo referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1: Establecimiento de una línea celular Ba/F3 que expresa NR 10 y OSMR

Se insertó un ADNc de NR 10 humano (SEQ ID NO:1 del documento WO 0075314) en el vector de expresión pCOS1 (Biochem Biophys Res Commun., 228, p. 838-845, 1996) para producir pCosNR 10.3. Un ADNc del receptor de oncostatina M (OSMR, n.º de registro de GenBank NM003999) se aisló a partir de un banco placentario humano
15 mediante PCR, y después se construyó de forma similar el vector de expresión pCos1-hOSMR. Mediante electroporación, 10 µg de cada uno de los vectores se introdujo simultáneamente en células de la línea celular Ba/F3 derivada de células pro-B dependientes de IL-31 de ratón (BioRad Gene Pulser, 960 µF y 0,33 kV). Después de la introducción, se añadió IL-31 humana y las células se cultivaron. Así, se obtuvo una línea celular que proliferó de una manera dependiente de IL-31. De forma similar, también se preparó una línea celular dependiente de IL-31 de
20 ratón a partir de células Ba/F3 preparadas para expresar los genes NR 10 y OSMR de ratón.

En ambas líneas celulares, se descubrió que la DE50 era de varios ng/ml. Así, se obtuvieron líneas celulares que proliferaban bien. La línea celular dependiente de IL-31 humana no muestra respuesta a la IL-31 de ratón, y el crecimiento se suprimió tras la adición de una proteína de NR 10 humana (dominio extracelular). La línea celular dependiente de IL-31 de ratón no muestra respuesta a la IL-31 humana, y el crecimiento no se suprimió tras la
25 adición de una proteína de NR 10 de ratón (dominio extracelular).

Ejemplo 2: Preparación de una proteína de NR 10 (dominio extracelular)

El dominio extracelular solo se amplificó mediante PCR utilizando ADNc de NR 10 como molde, se unió una secuencia marcadora FLAG al C-terminal, y se insertó en el vector de expresión pCXND3 (documento WO 2005/005636) (pCXND3-NR 10-marcador). Se introdujeron 10 µg de este vector lineal en células de la línea de
30 células de ovario de hámster chino DG44 mediante electroporación (BioRad Gene Pulser, 25 µF y 1,5 kV). Se obtuvo una línea celular de alta expresión. Se preparó una muestra purificada a partir del sobrenadante de un cultivo a gran escala de la línea celular mediante una columna de anticuerpo anti-FLAG (SIGMA) y una filtración en gel, y se empleó en los experimentos descritos a continuación. De modo similar, se preparó el NR 10 de ratón (dominio extracelular) con una secuencia marcadora FLAG unida al C-terminal.

35 Ejemplo 3: Aislamiento de scFv que tienen actividad neutralizante anti-NR 10 de ratón, y preparación de BM095 como IgG quimerizada

De modo específico, los presentes inventores intentaron reducir el número de clones candidatos a partir de un banco de fagos de anticuerpos humanos mediante inmunoadsorción utilizando una proteína de NR 10 de ratón biotinilada (dominio extracelular). Los scFv secretores se purificaron a partir de los clones, y se añadieron al sistema de ensayo
40 del crecimiento celular utilizando las células Ba/F3 dependientes de IL-31 descritas en el ejemplo 1. Como resultado, se obtuvo con éxito el clon BM095 que muestra una fuerte actividad supresora del crecimiento.

Empleando PCR, la secuencia de la región variable de cadena H humana (VH) de BM095 se unió a la región constante de IgG2a de ratón (después de CH1), y la secuencia de la región variable de cadena L humana (VL) de BM095 se unió a la región constante de cadena λ de ratón, para construir un vector de expresión. La secuencia de
45 aminoácidos de VH se muestra en SEQ ID NO:1, y la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO:2. La secuencia de aminoácidos de VL se muestra en SEQ ID NO:3, y la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO:4. Los respectivos vectores de expresión lineales se introdujeron simultáneamente en la línea celular DG44, y después se seleccionó una línea celular que expresa IgG quimerizada a un nivel elevado. Se obtuvo una muestra purificada a partir del sobrenadante de un cultivo a gran escala de esta línea celular utilizando una columna de proteína A (rProtein A Sepharose Fast Flow, GE Amersham Biosciences) y una cromatografía en columna de intercambio catiónico (SP-TOYOPEARL 650M, TOSOH). Además, se retiraron los pirógenos utilizando la resina ActiClean Etox (Sterogen) para reducir la concentración por debajo del límite de detección. La muestra se empleó en los experimentos animales descritos a continuación. El resultado obtenido añadiendo BM095 al sistema de ensayo descrito
50

anteriormente se muestra en la figura 1.

Ejemplo 4: Evaluación de la eficacia como fármaco en un modelo de dermatitis atópica utilizando ratones NC/Nga

Se produjo un modelo de dermatitis mediante la aplicación repetida de cloruro de picrilo (PiCl) a intervalos semanales. De modo específico, 4 días después de la sensibilización con PiCl al 5% (150 µl) sobre el abdomen y la almohadilla de la pata, se consiguió la inducción de una dermatitis mediante la aplicación repetida de PiCl al 0,8% (150 µl) sobre la espalda y la aurícula a intervalos semanales. Los síntomas resultantes se observaron dos veces semanales en el periodo de la tercera a la sexta semana, y se puntuaron independientemente cinco perspectivas ((1) prurito, (2) enrojecimiento y sangrado, (3) edema, (4) lesiones y daños en los tejidos, y (5) incrustaciones y sequedad) en una escala de 0 a 3. El anticuerpo se administró a 10 mg/kg en las cavidades peritoneales el día antes de la sensibilización y en cada inducción, 6 veces en total (grupo BM095), o el día antes de cada inducción después de la tercera semana, tres veces en total (grupo V/B). Como control positivo, se administró por vía oral dexametasona 1 mg/kg cada día después de la tercera semana (grupo DEX). Cada grupo contiene 10 ratones Nc/Nga macho.

Tal como se muestra en la figura 2, se descubrió un significativo efecto supresor en el grupo al que se le administró anticuerpo, comparado con el grupo de vehículo al que se le administró disolvente. Además, tal como se observa en la figura 2, mientras que se observó una significativa pérdida de peso en el grupo DEX, no se observó cambio de peso en el grupo al que se le administró anticuerpo. Esto sugiere que el anticuerpo es un agente muy seguro.

Ejemplo 5: Evaluación de la eficacia como fármaco en un modelo de dermatitis crónica creada mediante la aplicación repetida de cloruro de picrilo

Ratones BALB/c hembra de seis semanas se sensibilizaron aplicando 20 µl de cloruro de picrilo al 0,5% (disolución de acetona/aceite de oliva (1:4 en v/v)) en la oreja derecha. La inducción se consiguió aplicando repetidamente 20 µl de cloruro de picrilo al 0,25% (acetona/aceite de oliva (1:4 en v/v)) en la oreja derecha cada dos días desde el octavo día después de la sensibilización. Se administraron 10 mg/kg de BM095 en las cavidades peritoneales una vez semanal desde el día antes de la sensibilización en el grupo para la evaluación del efecto preventivo de BM095, o desde el 20º día después del inicio de la inducción en el grupo para la evaluación del efecto terapéutico de BM095. Se evaluó el hinchamiento de la aurícula mediante la medición secuencial del espesor de la oreja derecha utilizando un calibrador del espesor de esfera.

Como resultado, se descubrió un significativo efecto supresor en el grupo al que se le administró anticuerpo, tal como se observa en la figura 4. Se ha indicado que la expresión del NR 10 humano está potenciada en la epidermis espesada de pacientes con dermatitis atópica (documento que no es patente 1). Las aurículas de los ratones del modelo de dermatitis crónica descrito anteriormente se tiñeron de modo inmunohistoquímico. Tal como es el caso en seres humanos, se observó que la expresión de NR 10 de ratón estaba potenciada en la epidermis espesada (figura 5; se preparó BM095 en el que la región constante se ha reemplazado por la IgG humana en el ejemplo 3 y se empleó en la tinción inmunohistoquímica; las porciones teñidas de marrón son los sitios de expresión de NR 10). Este descubrimiento sugiere que NR 10 está implicado, de modo similar, en enfermedades inflamatorias en seres humanos y en ratones.

Ejemplo 6: Evaluación de la eficacia como fármaco utilizando un modelo de artritis inducida por colágeno (reumatismo)

Se logró la preparación de un modelo de ratón y la evaluación de la eficacia como fármaco mediante el procedimiento descrito a continuación.

Se administraron 140 µl de gel de colágeno, que se preparó combinando cantidades iguales de adyuvante completo H37Ra y colágeno de tipo II al 0,3% derivado de articulaciones bovinas, por vía intracutánea a ratones DBA/1JN hembra de 9 semanas en la cabeza de la cola (día 0, sensibilización). Después de tres semanas, un gel de colágeno preparado mediante el mismo procedimiento se administró por vía intracutánea en la espalda para inducir la aparición de artritis (día 21, inducción). Según los pesos corporales dos días antes de la sensibilización (día -2), los 16 ratones se dividieron en dos grupos, que incluyen 8 ratones cada uno, para constituir un grupo al que se le administra medio y un grupo al que se le administra BM095. Utilizando como medio tampón acetato 20 mmol/l (pH 5,5) (NaCl 200 mmol/l) diluido 6 veces con PBS, la sustancia de ensayo BM095 se administró por vía intravenosa a los 8 ratones del grupo al que se le administra BM095 a la dosis de 10 mg/kg de peso el día antes de la sensibilización (día -1). Por otra parte, se administró el mismo volumen de medio por unidad de peso corporal a los 8 ratones en el grupo al que se le administra medio como control en el día -1. Se observó el hinchamiento en las cuatro extremidades y se evaluó mediante una puntuación (en una escala de 0 a 4 para cada extremidad: puntuación total 16) desde el día antes de la inducción (día 20) a intervalos de 2 a 3 días.

Como resultado, se descubrió que la puntuación para el hinchamiento en las cuatro extremidades disminuye después del día 20 en el grupo al que se le administra BM095, tal como se muestra en la figura 6. Esto sugiere que BM095 tiene el efecto de suprimir la aparición de la artritis.

Ejemplo 7: Evaluación de la eficacia como fármaco utilizando un modelo de artritis inducida por collagenasa (osteoartritis)

Se consiguió la preparación de un modelo de ratón y la evaluación de la eficacia como fármaco mediante el procedimiento descrito a continuación.

- 5 Se administró un medio control (tampón acetato 20 mmol/l (pH 5,5) diluido 6 veces con PBS, NaCl 200 mmol/l (n = 5)), BM095 2 mg/kg (n = 5), y BM095 20 mg/kg (n = 6) por vía intravenosa (5 ml/kg) en las venas caudales de ratones C57BL/6J Jcl macho de 8 semanas (CLEA Japan Inc.). Después, 6 µl de disolución de collagenasa al 1,5% (tipo II, Sigma) filtrados a través de un filtro de 0,45 µm (MILLIPORE) se administraron en las cavidades de la articulación de la rodilla derecha con anestesia por inhalación de isoflurano al 3% (Am. J. Pathol., 1989, 135(6):1001-1014).

- 10 Se determinó la anchura de las articulaciones de la rodilla derecha e izquierda utilizando un calibrador (Mitsutoyo CO.) inmediatamente antes de la administración de collagenasa y 3, 7 y 14 días después de la administración de collagenasa para calcular la diferencia entre la rodilla derecha e izquierda. La diferencia se define como un valor representativo para el hinchamiento de la articulación de la rodilla derecha. Se determinó el área bajo la curva (AUC) de la transición de esta diferencia, basándose en la regla trapezoidal, y se define como un indicador de la eficacia como fármaco. Se realizó un ensayo de la t de Student para la AUC del grupo control de medio y del grupo al que se le administró BM095 utilizando un programa informático de análisis estadístico (SAS Institute Inc.) (se considera una diferencia significativa cuando $p < 0,05$). Como resultado, la AUC del grupo al que se le administró BM095 fue significativamente menor a cualquier dosis que la del grupo control de medio, tal como se observa en la figura 7. Este resultado demuestra que BM095 suprime la artritis en el modelo de osteoartritis.

Ejemplo 8: Preparación de un anticuerpo neutralizante anti-NR 10 humano

- 25 Se inmunizaron ratones con una proteína de NR 10 humana (dominio extracelular) (descrito en el ejemplo 2), y se prepararon hibridomas mediante métodos convencionales. Se ensayaron los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas para la actividad neutralizante utilizando una línea celular dependiente de IL-31 humana (células hNR 10/hOSMR/BaF3) descrita en el ejemplo 1. Se obtuvieron múltiples clones que muestran una fuerte actividad neutralizante de NR 10 (figura 8).

Ejemplo 9: Preparación de un anticuerpo quimérico humano

- 30 La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de NA633, que muestra la mayor actividad entre los anticuerpos neutralizantes, se ofrece en SEQ ID NO:16, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se ofrece en SEQ ID NO:17. Además, las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada de NA633 se muestran en SEQ ID NO:18, 19 y 20, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera se muestran en SEQ ID NO:21, 22 y 23, respectivamente.

- 35 Además, se preparó un anticuerpo quimérico que comprende la región variable de ratón descrita anteriormente y la región constante humana (cadena H de tipo IgG1; cadena L de tipo κ) mediante un método convencional, y se determinó la actividad neutralizante. Tal como se muestra en la figura 9, el anticuerpo quimérico NA633 muestra la mayor actividad neutralizante a concentraciones bajas.

Ejemplo 10: Aislamiento de NR 10 de mono cynomolgus

- 40 Los inventores intentaron aislar el gen NR 10 de mono cynomolgus, porque se cree que la reactividad cruzada y la actividad neutralizante de NR 10 de mono cynomolgus es importante para la evaluación de la seguridad en una etapa preclínica. Se diseñaron cebadores basados en la información genómica del mono Rhesus y, así, el gen NR 10 se amplificó con éxito a partir de órganos de mono cynomolgus mediante PCR. En la figura 10 se muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de NR 10 humano y de NR 10 de mono cynomolgus aislado. La secuencia de aminoácidos de NR 10 de mono cynomolgus se muestra en SEQ ID NO:24. Se estableció una línea celular que prolifera de una manera dependiente de IL-31 humana introduciendo el gen NR 10 de mono cynomolgus junto con el gen OSMR humano en células Ba/F3, tal como se describe en el ejemplo 1. Se ensayó la actividad neutralizante del anticuerpo quimérico NA633 descrito en el ejemplo 9 utilizando esta línea celular. El resultado demuestra que el anticuerpo también muestra una fuerte actividad neutralizante en el mono cynomolgus (figura 11).

- 50 **Ejemplo de referencia 1: Eficacia como fármaco de BM095 en la colitis inducida por dextrano sulfato de sodio (DSS)**

- Se preparó un modelo de colitis inducida por DSS (J. Immunol. (2003), 171:5507-5513), que se ha indicado como modelo patológico para la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), para evaluar el efecto de BM095, un anticuerpo neutralizante anti-NR 10 de ratón. Se preparó una disolución acuosa de sal de dextrano sulfato de sodio al 5% (en p/v) (Wako Pure Chemical Industries) utilizando agua destilada filtrada y esterilizada con un filtro de 0,22 µm (Millipore). Se dejó que ratones Balb/cAnN Crj macho de seis semanas (CHARLES RIVER LABORATORIES

JAPAN) accedieran libremente a beber la disolución desde botellas de agua durante 7 días. Se midieron los pesos corporales, y se empleó el porcentaje del cambio de peso con relación a los pesos en el primer día de la administración de DSS como índice de la eficacia como fármaco.

Utilizando este modelo, el anticuerpo neutralizante anti-RN 10 de ratón BM095 se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg el día antes de la administración de DSS, y se evaluó la pérdida de peso resultante (n = 10) para ensayar si el trastorno patológico mejoró por la neutralización de la señalización de IL-31. El grupo (grupo de vehículo, n = 10) al que se le administró un vehículo (una mezcla de tampón acetato [acetato de sodio 20 mmol/l y cloruro de sodio 20 mmol/l] y disolución salina tamponada con fosfato [PBS, GIBCO], mezclados a una proporción en volumen de 1:5) por vía intravenosa el día antes de la administración de DSS, se empleó como grupo control de vehículo. Además, también se investigó el desarrollo del porcentaje de cambio de peso en ratones Balb/cAnN Crj del mismo sexo y edad (n = 1) que los del grupo al que se le administró DSS, para conocer el desarrollo en el tiempo del porcentaje de cambio de peso en ratones normales.

El desarrollo del cambio de peso se muestra en la figura 12. La administración de DSS reduce el porcentaje de cambio de peso en el grupo de vehículo. El desarrollo del porcentaje de cambio de peso en el grupo al que se le administró BM095 fue similar al del grupo de vehículo. Sin embargo, cuatro y cinco días después de la administración de DSS, el porcentaje de cambio de peso se redujo significativamente en el grupo BM095, comparado con el grupo de vehículo. Estos resultados demuestran que la administración de BM095 no produce efectos terapéuticos sobre la colitis en el modelo.

Se ha indicado que la expresión de IL-31 RA está potenciada en este modelo (documento WO 2004/003140). Los resultados experimentales descritos anteriormente demuestran que los anticuerpos que neutralizan la molécula no producen efectos terapéuticos sobre la colitis en este modelo.

Ejemplo de referencia 2: Eficacia como fármaco de BM095 en el modelo de dermatitis por contacto aguda inducida por cloruro de picrilo

Para evaluar el efecto del anticuerpo neutralizante anti-NR 10 de ratón BM095, se desarrolló una dermatitis indicada como modelo de dermatitis por contacto aguda (Clin. Immunol. (2003), 108: 257-262). Esta dermatitis es el resultado de una reacción de hipersensibilidad retrasada debido a la sensibilización y la inducción mediante la aplicación de cloruro de picrilo. Se aplicaron 50 µl de una disolución de cloruro de picrilo al 7% (Nacalai Tesque, Inc., etanol:acetona = 3:1 (en v/v)) sobre la piel abdominal para sensibilizar a ratones Balb/cAnN Crj hembra de 8 semanas (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN), y después de 5 días, se aplicaron 20 µl de una disolución de cloruro de picrilo al 1% (acetona:aceite de oliva = 1:4 (en v/v)) sobre la piel de la aurícula derecha para provocar una dermatitis por contacto (inducción). Se aplicaron 20 µl de un vehículo (acetona:aceite de oliva = 1:4 (en v/v)) sobre la piel de la aurícula izquierda de los mismos ratones como control para evaluar el efecto del vehículo sobre el espesor de la aurícula (grupo positivo, n = 6). Se midió el espesor de la oreja derecha e izquierda utilizando un calibrador del espesor de esfera (OZAKI MFG) inmediatamente antes de la inducción y 24, 48 y 72 horas después de la inducción, y se empleó el cambio en el espesor de la aurícula con relación al espesor inmediatamente antes de la inducción como un índice de la eficacia como fármaco.

El grupo (grupo negativo, n = 6) al que se le aplicó una mezcla de etanol-acetona (3:1 (en v/v)) sin cloruro de picrilo sobre la piel abdominal en el momento de la sensibilización, y después de 5 días, se aplicaron 20 µl de una disolución de cloruro de picrilo al 1% sobre la piel de la aurícula derecha, y se aplicaron 20 µl de un vehículo (acetona:aceite de oliva = 1:4 (en v/v)) sobre la piel de la aurícula izquierda, se empleó como grupo control para evaluar el establecimiento de trastornos patológicos.

El grupo (grupo BM095, n = 6) en el que se indujo una dermatitis por contacto aguda mediante el mismo método que el utilizado para el grupo positivo descrito anteriormente, al que se le administró BM095 por vía intravenosa a 10 mg/kg los días antes de la sensibilización y la inducción, y el grupo (grupo de vehículo, n = 5) en el que, con la misma programación, se le administró un vehículo (tampón acetato [acetato de sodio 20 mmol/l y cloruro de sodio 20 mmol/l] y disolución salina tamponada con fosfato [PBS, GIBCO], mezclados a una proporción en volumen de 1:5), se emplearon para evaluar el efecto de la administración de anticuerpos anti-NR 10 sobre los trastornos patológicos en el sistema del modelo.

Los cambios en el espesor de la aurícula hasta 72 horas después de la inducción se muestran en la figura 13. Se descubrió que la aurícula aparecía significativamente espesada en el grupo positivo en cada momento del tiempo de 24, 48 y 72 horas después de la inducción, comparado con el grupo negativo, lo cual sugiere el establecimiento de trastornos patológicos. La transición del espesor de la aurícula en el grupo BM095 fue similar al del grupo de vehículo, y así, no se observó una supresión significativa.

Los resultados descritos anteriormente demuestran que la administración de BM095 no produce efectos terapéuticos sobre la dermatitis por contacto aguda observada en este modelo.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona nuevos agentes para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias. Los agentes para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias proporcionados por la presente invención comprenden, como ingrediente activo, un anticuerpo anti-NR 10/IL-31 RA, más en concreto un anticuerpo que tiene actividad neutralizante de NR 10/IL-31 RA.

La terapia anticitoquinas basada en anticuerpos monoclonales está atrayendo atención en los últimos años. Sin embargo, en muchos trastornos patológicos reales, ha resultado difícil producir efectos terapéuticos bloqueando una única citoquina, porque se activan vías compensatorias. Además, ha resultado difícil calcular en qué tipos de enfermedades pueden obtenerse efectos terapéuticos mediante el bloqueo de una citoquina diana. Bajo las circunstancias descritas anteriormente, los presentes inventores han descubierto que los anticuerpos neutralizantes anti-NR 10 pueden suprimir significativamente los síntomas en modelos de ratones con dermatitis atópica, dermatitis crónica, reumatismo, osteoartritis o similares.

Los presentes inventores también han preparado con éxito anticuerpos neutralizantes de NR 10 humano. Los agentes para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias, que comprenden, como ingrediente activo, anticuerpos neutralizantes de NR 10 humano, son muy útiles para una aplicación clínica en seres humanos.

Lista de Secuencias

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> COMPOSICIÓN FARMACUTICA PARA PREVENIR O TRATAR ENFERMEDAD INFLAMATORIA

<130> C1-A0606P

<150> JP 2006-160096

<151> 2006-06-08

<160> 24

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Asp Val Val Pro Ala Ala Met Ser Phe Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

ES 2 429 407 T3

<210> 2
 <211> 375
 <212> DNA
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 cagggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 10 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagaggac 300
 gtagtaccag ctgctatgctc attctactac ggtatggacg tctggggccg aggaaccctg 360
 gtcaccgtct cgagt 375
 <210> 3
 <211> 109
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Thr Val
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Thr Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ala
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Asp His
 85 90 95
 20 Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105
 <210> 4
 <211> 327
 <212> DNA
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 4

ES 2 429 407 T3

```

ctgcctgtgc tgactcagcc cccctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt    60
acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa actgtgtact ggtaccagca ggagccaggc    120
caggcccctg tgttggtcgt ctatgatgat accgaccggc ccgcaggaat ccctgagcgc    180
ttctctggcg ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg    240
gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtagta ctgatcatgg ggttttcggc    300
ggagggacca agctgaccgt cctaggt                                     327

```

<210> 5

<211> 716

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

ES 2 429 407 T3

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

ES 2 429 407 T3

Gln Gln Tyr Glu Leu Leu Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val
 275 280 285
 Thr Ser Phe Asn Ser Leu Gly Lys Ser Gln Glu Ala Ile Leu Arg Ile
 290 295 300
 Pro Asp Val His Glu Lys Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Lys Ala
 305 310 315 320
 Tyr Ile Ala Glu Pro Leu Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro
 325 330 335
 Ala Val Asp Thr Trp Ile Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser
 340 345 350
 Lys Phe Pro Ala Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp
 355 360 365
 Thr Ile Glu Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser
 370 375 380
 Val Tyr Pro Val Leu Gly His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln
 385 390 395 400
 Ala Tyr Ala Lys Glu Gly Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val
 405 410 415
 Glu Asn Ile Gly Leu Arg Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro
 420 425 430
 Lys Ser Ala Arg Asn Gly Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln
 435 440 445
 Ala Glu Gly Gly Lys Glu Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu
 450 455 460
 Gln Cys Asp Leu Glu Ser Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp
 465 470 475 480
 Val Met Ala Ser Thr Arg Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn
 485 490 495
 Phe Lys Thr Leu Ser Ile Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser
 500 505 510
 Leu Val Gly Gly Gly Leu Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe
 515 520 525
 Gly Leu Arg Lys Pro Asn Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val
 530 535 540

ES 2 429 407 T3

Pro Asn Pro Ala Glu Ser Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe
545 550 555 560

Lys Lys Ser Asn Met Lys Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asp Thr Glu Asp
565 570 575

Val Val Leu Lys Pro Cys Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu
580 585 590

Val Val Asn Phe Glu Asn Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala
595 600 605

Gly Lys Gly Gln Ala Ser Ile Leu Gly Gly Glu Ala Asn Glu Tyr Val
610 615 620

Thr Ser Pro Ser Arg Pro Asp Gly Pro Pro Gly Lys Ser Phe Lys Glu
625 630 635 640

Pro Ser Val Leu Thr Glu Val Ala Ser Glu Asp Ser His Ser Thr Cys
645 650 655

Ser Arg Met Ala Asp Glu Ala Tyr Ser Glu Leu Ala Arg Gln Pro Ser
660 665 670

Ser Ser Cys Gln Ser Pro Gly Leu Ser Pro Pro Arg Glu Asp Gln Ala
675 680 685

Gln Asn Pro Tyr Leu Lys Asn Ser Val Thr Thr Arg Glu Phe Leu Val
690 695 700

His Glu Asn Ile Pro Glu His Ser Lys Gly Glu Val
705 710 715

<210> 6
<211> 662
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp
1 5 10 15

Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala
20 25 30

Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg
35 40 45

Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr
50 55 60

ES 2 429 407 T3

Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn
 65 70 75 80
 Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe
 85 90 95
 Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu
 100 105 110
 Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg
 115 120 125
 Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys
 130 135 140
 Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro
 145 150 155 160
 Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg
 165 170 175
 Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg
 180 185 190
 Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr
 195 200 205
 Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp
 210 215 220
 Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro
 225 230 235 240
 Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly
 245 250 255
 Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val
 260 265 270
 Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn
 275 280 285
 Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu
 290 295 300
 His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu
 325 330 335

ES 2 429 407 T3

Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp
 340 345 350
 Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp
 355 360 365
 Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser
 370 375 380
 Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys
 385 390 395 400
 Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His
 405 410 415
 Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly
 420 425 430
 Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys
 435 440 445
 Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly
 450 455 460
 Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly
 465 470 475 480
 Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser
 485 490 495
 Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser
 500 505 510
 Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe
 515 520 525
 Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly Leu
 530 535 540
 Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro Asn
 545 550 555 560
 Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser
 565 570 575
 Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys Leu Asn Leu
 580 585 590
 Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile Leu Lys Pro
 595 600 605

ES 2 429 407 T3

Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu Val Val Asn
610 615 620

Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala Arg Thr Gly
625 630 635 640

Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr Arg Ile Leu Ser
645 650 655

Ser Cys Pro Thr Ser Ile
660

<210> 7
<211> 732
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> SEÑAL
<222> (1)..(20)

<220>
<221> TRANSMEM
<222> (520)..(543)

15 <400> 7

Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe
1 5 10 15

Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr
20 25 30

Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr
35 40 45

Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys
50 55 60

His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser
65 70 75 80

Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile
85 90 95

Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr
100 105 110

Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe
115 120 125

Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp
130 135 140

ES 2 429 407 T3

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

ES 2 429 407 T3

Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile
 420 425 430
 Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu
 435 440 445
 Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly
 450 455 460
 Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly
 465 470 475 480
 Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala
 485 490 495
 Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr
 500 505 510
 Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly
 515 520 525
 Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys
 530 535 540
 Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro
 545 550 555 560
 Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys
 565 570 575
 Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile
 580 585 590
 Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu
 595 600 605
 Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala
 610 615 620
 Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Thr Cys Pro Phe Arg Pro Asp Cys Pro Leu Gly Lys Ser Phe Glu Glu
 645 650 655
 Leu Pro Val Ser Pro Glu Ile Pro Pro Arg Lys Ser Gln Tyr Leu Arg
 660 665 670
 Ser Arg Met Pro Glu Gly Thr Arg Pro Glu Ala Lys Glu Gln Leu Leu
 675 680 685
 Phe Ser Gly Gln Ser Leu Val Pro Asp His Leu Cys Glu Glu Gly Ala
 690 695 700
 Pro Asn Pro Tyr Leu Lys Asn Ser Val Thr Ala Arg Glu Phe Leu Val
 705 710 715 720
 Ser Glu Lys Leu Pro Glu His Thr Lys Gly Glu Val
 725 730

<210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente
 <400> 8
 10
 Gly Gly Gly Ser
 1
 <210> 9
 <211> 4
 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente
 20
 <400> 9
 Ser Gly Gly Gly
 1
 25
 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente
 <400> 10
 Gly Gly Gly Gly Ser
 35 1 5
 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 40
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente
 45
 <400> 11
 Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 50
 <213> Artificial
 <220>
 55
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente
 <400> 12
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 60 1 5
 <210> 13

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente
 <400> 13

10 Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

20 <400> 14

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

25 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente
 <400> 15

35 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 16
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <400> 16

Asp Val Gln Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

ES 2 429 407 T3

20 25 30
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Pro Met Ile Thr Thr Asp Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 17
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 17
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Asp Phe
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Trp
 85 90 95
 10 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 18
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5
 20 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 19

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

5 <210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <400> 20

Met Ile Thr Thr Asp Trp Phe Phe Asp Val
1 5 10

15 <210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

20 <400> 21

Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Asp Phe Leu His
1 5 10

25 <210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

30 <400> 22

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

35 <210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23

40 Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 24
<211> 735
<212> PRT

45 <213> Cynomolgus

<400> 24

Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Phe Pro Leu Leu Cys Lys Phe

50

ES 2 429 407 T3

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

275	280	285
Leu Glu 290	Leu His Leu Gly 295	Gly Glu Ser Tyr Trp Val 300
Tyr Asn Ser Leu Gly 305	Lys Ser Pro Val Thr Thr 310	Leu Arg Ile Pro Ala 320
Ile Gln Glu Lys 325	Ser Phe Arg Cys Ile 330	Glu Val Met Gln Ala Cys 335
Ala Glu Asp Gln 340	Leu Val Val Lys Trp 345	Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val 350
Asn Thr Trp Met 355	Ile Glu Trp Phe Pro Asp Met 360	Asp Ser Glu His Pro 365
Thr Leu Ser Trp Glu 370	Ser Val Ser Gln Ala Thr 375	Asn Trp Thr Ile Gln 380
Gln Asp Lys Leu Lys 385	Pro Phe Trp Cys Tyr Asn 390	Ile Ser Val Tyr Pro 400
Met Leu His Asp 405	Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser 410	Ile Gln Ala Tyr Ala 415
Lys Glu Gly Ile 420	Pro Ser Lys Gly Pro Glu Thr 425	Lys Val Glu Asn Ile 430
Gly Val Lys Thr 435	Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu 440	Ile Pro Lys Ser Glu 445
Arg Lys Gly Ile 450	Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe 455	Tyr Gln Ala Glu Gly 460
Gly Lys Gly Phe Ser 465	Lys Thr Val Asn Ser Ser 470	Ile Leu Gln Tyr Gly 475
Leu Glu Ser Leu 485	Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Thr 490	Val Arg Val Met Ala 495
Ser Thr Ser Ala 500	Gly Gly Ile Asn Gly Thr Ser 505	Ile Asn Phe Lys Thr 510
Leu Ser Phe Ser 515	Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr 520	Ser Leu Ile Gly 525
Gly Gly Leu Leu 530	Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val 535	Ala Tyr Gly Leu Lys 540
Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Ser Val Pro Asn Pro		

545		550		555		560									
Ala	Glu	Ser	Ser	Ile	Ala	Thr	Trp	Arg	Gly	Asp	Asp	Phe	Lys	Asp	Lys
				565					570					575	
Leu	Asn	Leu	Lys	Glu	Ser	Asp	Asp	Ser	Val	Asn	Thr	Glu	Asp	Arg	Ile
			580					585					590		
Leu	Lys	Pro	Cys	Ser	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Leu	Val	Ile	Asp	Lys	Ser
		595					600					605			
Val	Val	Asn	Phe	Gly	Asn	Val	Leu	Gln	Glu	Met	Phe	Thr	Asp	Glu	Ala
	610					615					620				
Arg	Thr	Gly	Gln	Glu	Asn	Asn	Leu	Gly	Gly	Glu	Lys	Asn	Glu	Tyr	Val
625					630					635					640
Thr	His	Pro	Phe	Arg	Ala	Asp	Cys	Pro	Leu	Gly	Lys	Ser	Phe	Glu	Glu
				645					650					655	
Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Ile	Pro	Pro	Arg	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Arg
			660					665					670		
Ser	Arg	Met	Pro	Glu	Gly	Thr	Cys	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Gln	Leu	Leu
		675					680					685			
Val	Ser	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Ser	Leu	Ala	Pro	Asp	His	Val	Arg	Glu
	690					695					700				
Ala	Ala	Ala	Pro	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Arg	Glu
705					710					715					720
Phe	Leu	Val	Ser	Gln	Lys	Leu	Pro	Glu	His	Thr	Lys	Gly	Glu	Val	
				725					730					735	

REIVINDICACIONES

- 1.- Un anticuerpo anti-NR 10/IL-31 RA que tiene una actividad neutralizante de NR 10/IL-31 RA para su uso para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria, en el que la enfermedad inflamatoria es:
 - (a) dermatitis atópica, en el que el anticuerpo suprime al menos uno de los síntomas de la dermatitis atópica seleccionados del grupo que consiste en (1) prurito, (2) enrojecimiento y sangrado, (3) edema, (4) lesiones y daños en los tejidos, y (5) incrustaciones y sequedad;
 - (b) reumatismo; o
 - (c) osteoartritis.
- 2.- Un agente para su uso para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria, en el que el agente comprende el anticuerpo según la reivindicación 1 como ingrediente activo, y en el que la enfermedad inflamatoria es:
 - (a) dermatitis atópica, en el que el anticuerpo suprime al menos uno de los síntomas de la dermatitis atópica seleccionados del grupo que consiste en (1) prurito, (2) enrojecimiento y sangrado, (3) edema, (4) lesiones y daños en los tejidos, y (5) incrustaciones y sequedad;
 - (b) reumatismo; o
 - (c) osteoartritis.
- 3.- El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, o el agente para su uso según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 4.- El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1 o 3, o el agente para su uso según la reivindicación 2 o 3, en el que NR 10/IL-31 RA es NR 10/IL-31 RA humano.
- 5.- El anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o el agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
- 6.- El anticuerpo o el agente para su uso según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo recombinante es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano.
- 7.- Un fragmento y/o un fragmento químicamente modificado del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 6, para su uso para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria, en el que la enfermedad inflamatoria es:
 - (a) dermatitis atópica, en el que el anticuerpo suprime al menos uno de los síntomas de la dermatitis atópica seleccionados del grupo que consiste en (1) prurito, (2) enrojecimiento y sangrado, (3) edema, (4) lesiones y daños en los tejidos, y (5) incrustaciones y sequedad;
 - (b) reumatismo; o
 - (c) osteoartritis;en el que dicho fragmento es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.
- 8.- Un agente que comprende el fragmento para su uso según la reivindicación 7.

FIG. 1

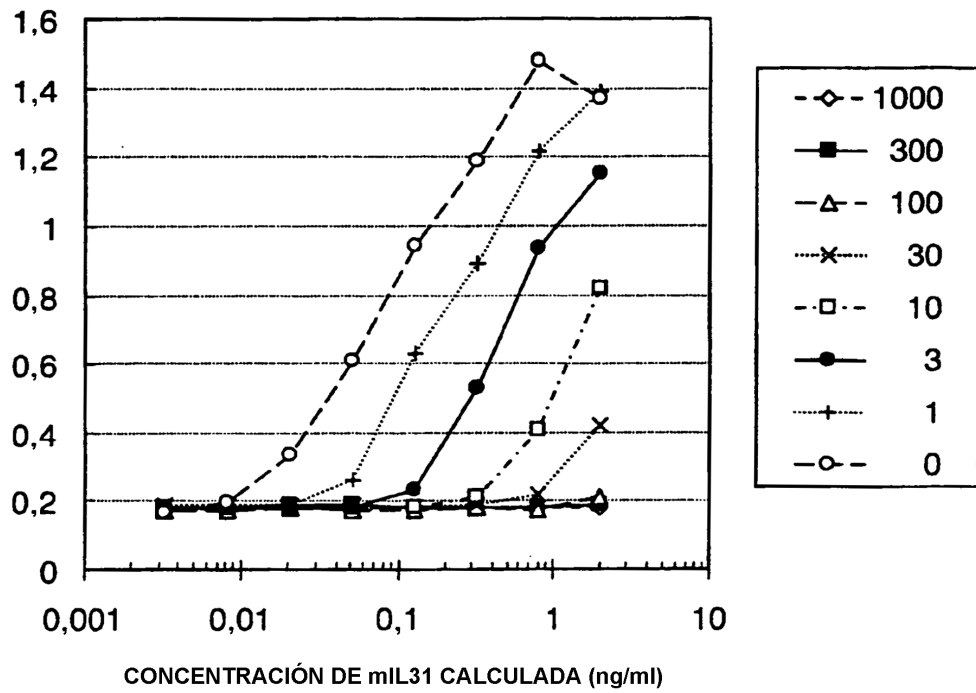


FIG. 2

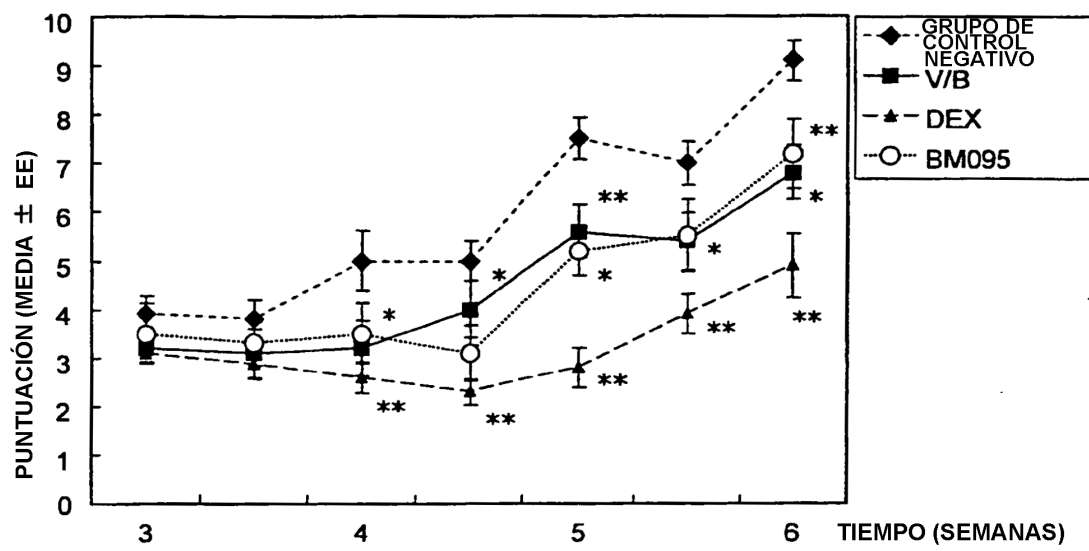


FIG. 3

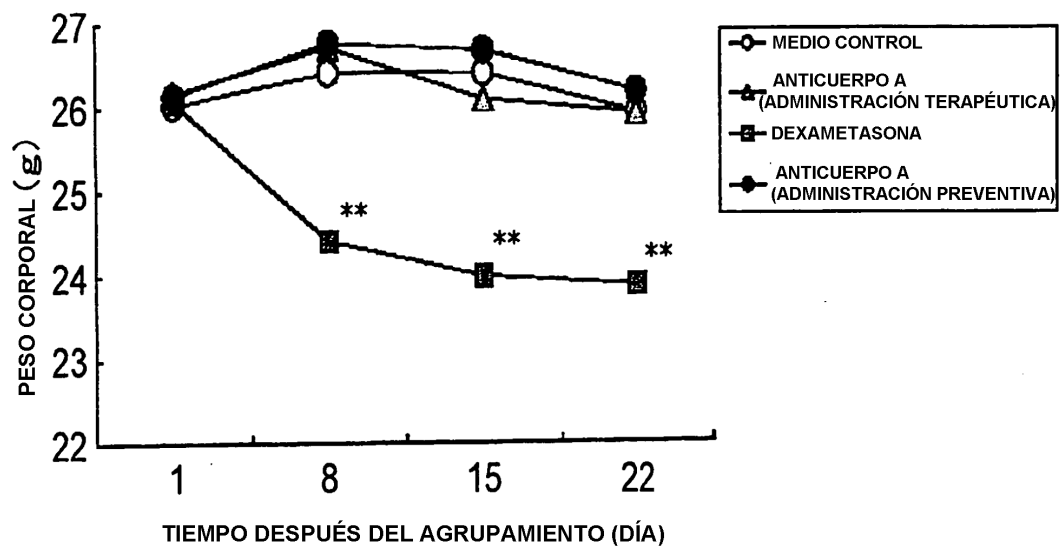


FIG. 4

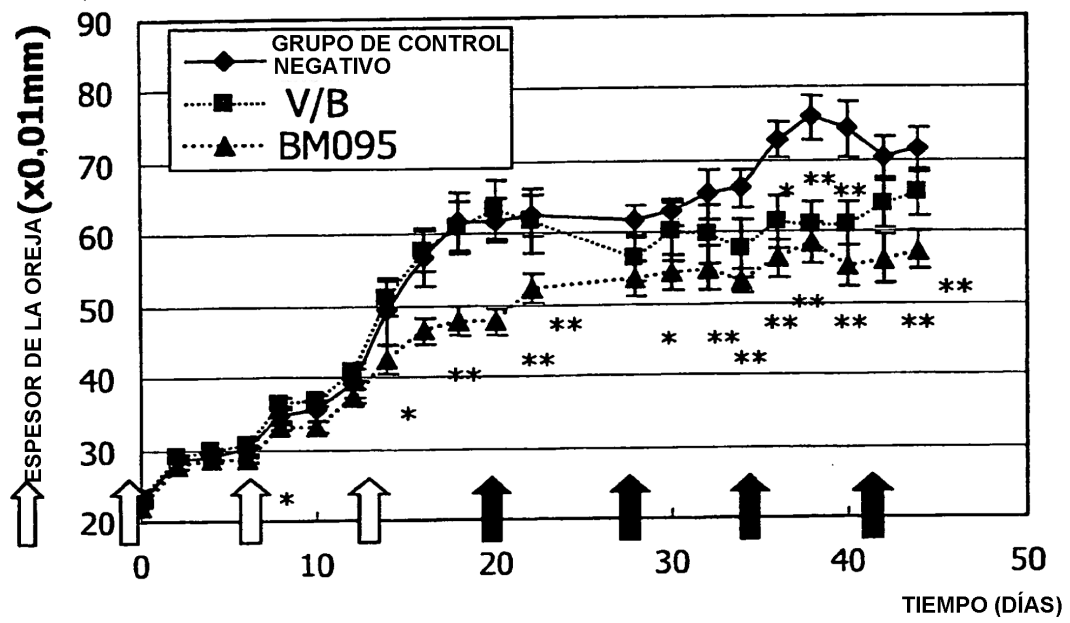


FIG. 5

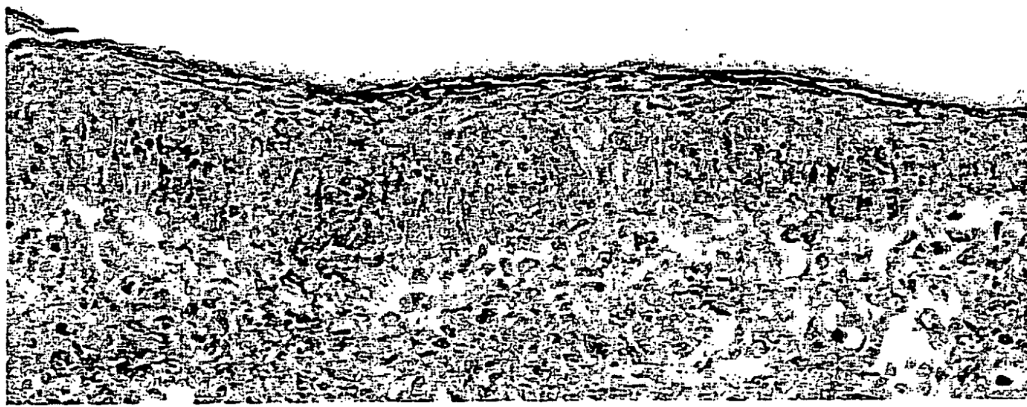


FIG. 6

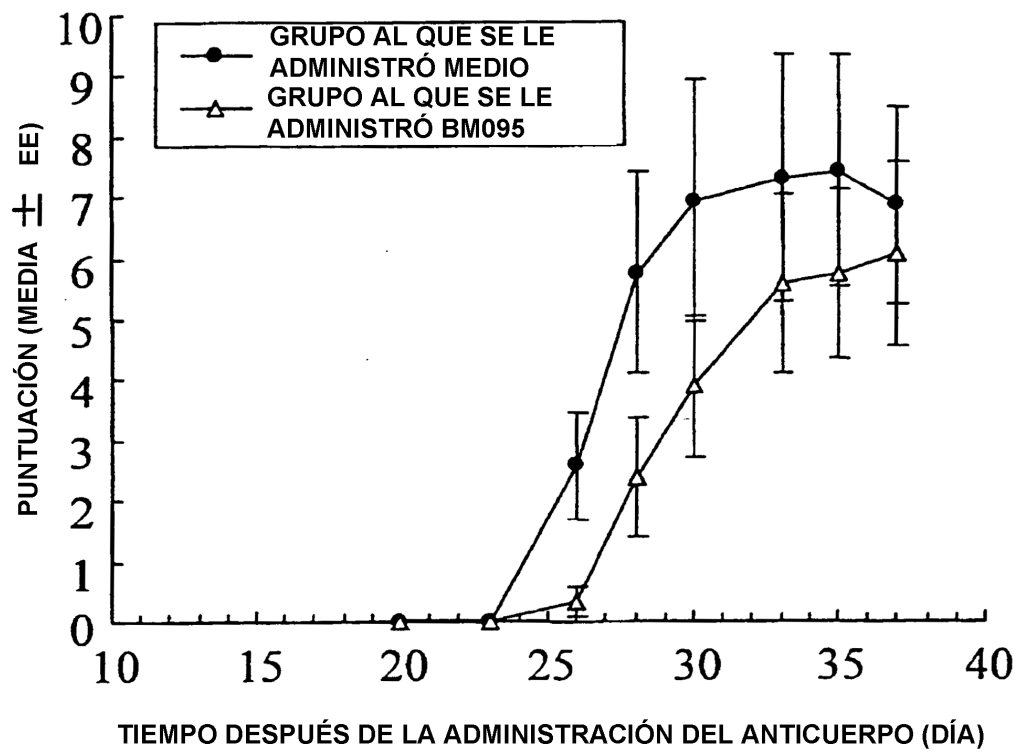


FIG. 7

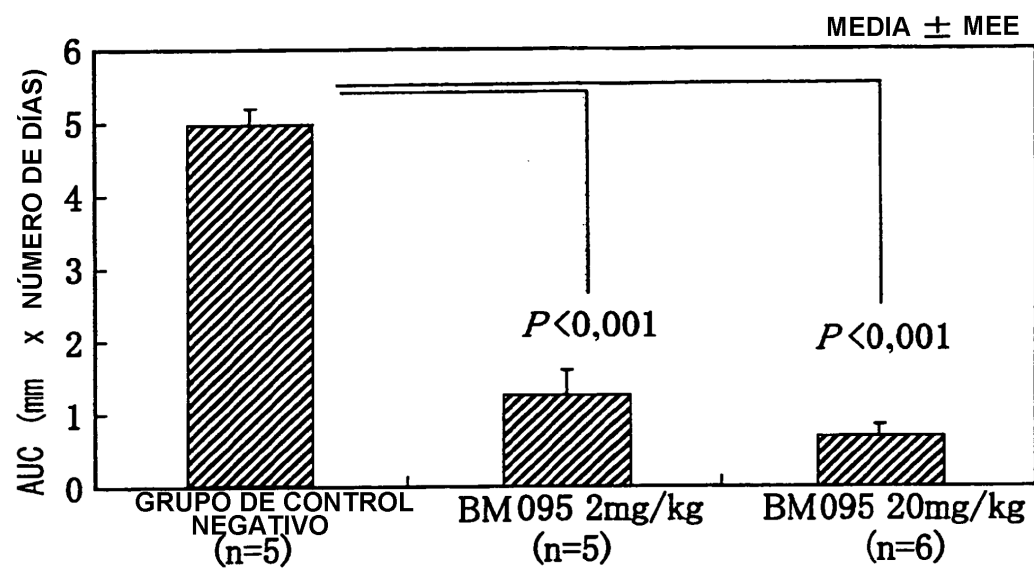


FIG. 8

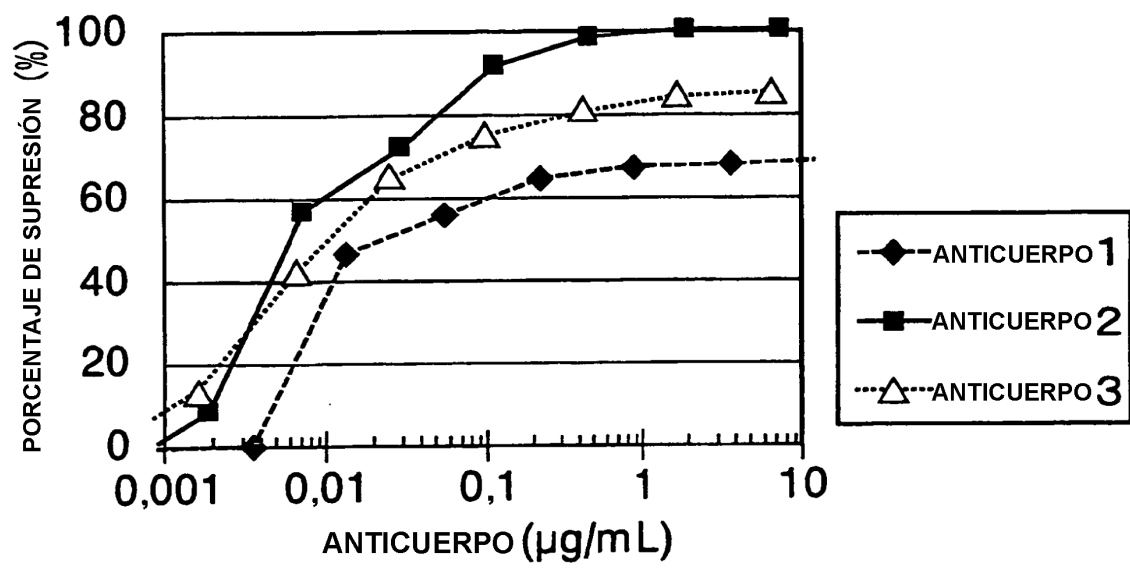
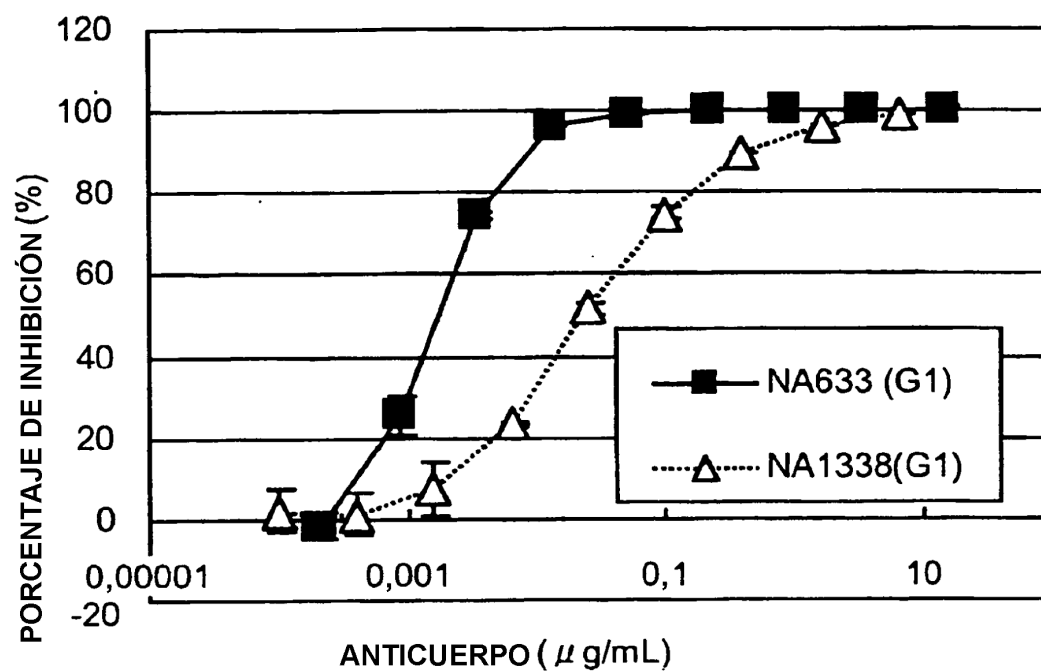


FIG. 9



CYNOMOL HUMANO	MMHTWALWIFPLLCKFGLAALPAKPENISCVYYRKNLTCWSPGKETSQYTAQRTYAFGKKHNDCTTSSSTSENASCFFLPRITIPDNYTIEVEA MMHTWALWMLPSLCKFSLAALPAKPENISCVYYRKNLTCWSPGKETSQYTVKRTYAFGEKHNDCTTNSSTSENASCFFLPRITIPDNYTIEVEA
CYNOMOL HUMANO	ENGDDGVIKSDMTCHRLIEDIAKTEPPEIFSVKPVLGIKRMIRIEWIKPELAPVSSDLKYALRFTVNSTSHWEVNFKNRKDNTQTYNLMGLQAFTEYVVA ENGDDGVIKSHMTYHRLENIAKTEPPKIFRVKPVLGIKRMIRIEWIKPELAPVSSDLKYTLRFTVNSTSHWEVNFKNRKDKNQTYNLTGLQPFTEYVIA
CYNOMOL HUMANO	LRCAVKESKFWSQEKMGMTTEEEAPCGLELWRVLKPTVDGRRPVRLLWKKARGAPVLEKTLGYNHWYFENNNTNLTEVTWTTNQQLLEHLGGESYVW LRCAVKESKFWSQEKMGMTTEEEAPCGLELWRVLKPAEADGRRPVRLLWKKARGAPVLEKTLGYNHWYFESNTNLTEVTWTTNQQLLEHLGGESFW
CYNOMOL HUMANO	SMTSYNSLKGSPVTTLRIPAIQEKSFRCIEVMQAGLAEDQLVVKWQSSALDVNTWMIWFDPMDSEHPTLSWESVSDATNWTIQQDKLKPFWCYNISVYP SMTSYNSLKGSPVATLRIPAIQEKSFQCEVMQACVAEDQLVVKWQSSALDVNTWMIWFDPVDSEPTLSWESVSDATNWTIQQDKLKPFWCYNISVYP
CYNOMOL HUMANO	MLHDKVGEPPYSIOAYAKEGIPSKGPETKVENIGVKTVTITWKEIPKSERKGIICNYTIFYDAEGGKGFSTWNSSILOYGLESLKRKTSYTVRVMASTSA MLHDKVGEPPYSIOAYAKEGVPSEGPETKVENIGVKTVTITWKEIPKSERKGIICNYTIFYDAEGGKGFSTWNSSILOYGLESLKRKTSYIVQVMASTSA
CYNOMOL HUMANO	GGINGTSINFKTLFSFVFEIILITSLIGGGLLILITLVAYGLKKPNKLTLCWPSVNPNAESSIATWRGDDFKOKLNLKESDDSVNTEDRILKPCSTPS GGINGTSINFKTLFSFVFEIILITSLIGGGLLILITLVAYGLKKPNKLTLCWPTVNPNAESSIATWHGDDFKOKLNLKESDDSVNTEDRILKPCSTPS
CYNOMOL HUMANO	DKLVIDKSVVNFGNVLQEMFTDEARTGQENNLGGEKNEYVTHPFRADCPGKSFEEPLVSPPEIPPKRSQYLRSRMPEGTCLAEEDQLVSGQSLESAPD DKLVIDKLVVNFGNVLQEIFTDEARTGQENNLGGEKNGYVTCFPRPDCPLGKSFEEPLVSPPEIPPKRSQYLRSRMPEGTRPEAKEDQLFSGQSL—VPD
CYNOMOL HUMANO	HVREAAAPNPYLKNSVTTREFLYSQKLPEHTKGEV 735 (SEQ ID NO: 24) HLCCEGAPNPYLKNSVTAREFLYSEKLPEHTKGEV 732 (SEQ ID NO: 7)

FIG. 10

FIG. 11

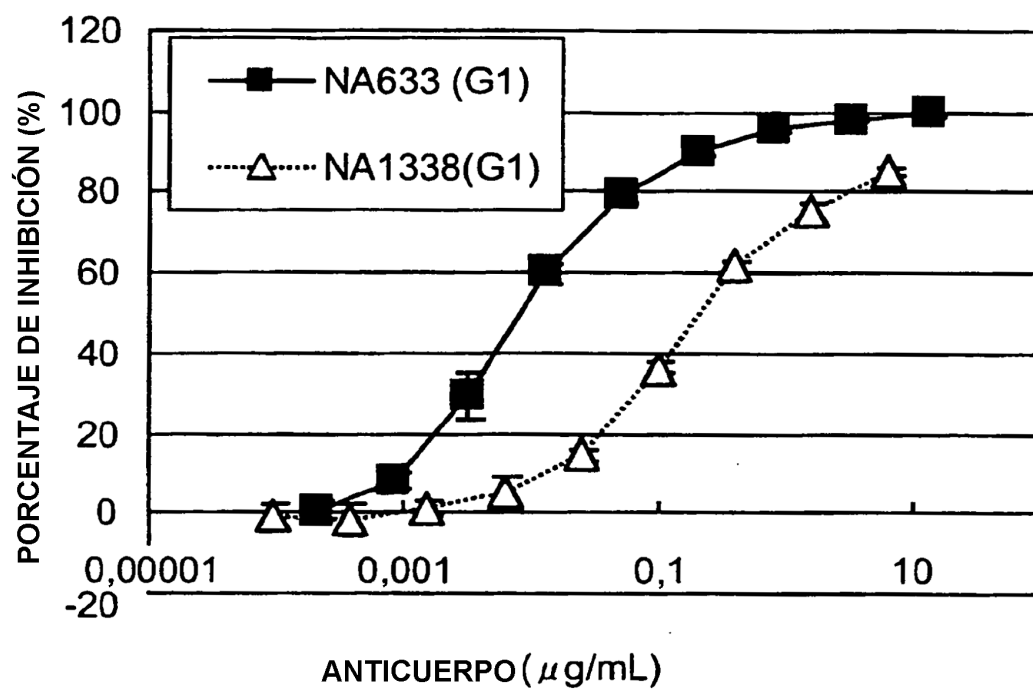


FIG. 12

