

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 714**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/18 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2007 E 14165476 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2759549**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales IL-31 y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

01.09.2006 US 824403 P

20.02.2007 US 890792 P

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

20.10.2015

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, WA 98102, US**

72 Inventor/es:

**SIADAK, ANTHONY W.;
BILSBOROUGH, JANINE y
RENE, SHIRLEY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 548 714 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales IL-31 y procedimientos de uso

5 **Antecedentes de la invención**

La piel desempeña un papel importante en el sistema inmunitario y está constituido por capas. La epidermis es una capa superficial. Debajo de la epidermis se encuentra la dermis, una capa de tejido conjuntivo. Debajo de la dermis se encuentra la hipodermis, una capa de grandes cantidades de tejido adiposo. Los linfocitos T circulantes se desplazan a la piel bajo condiciones tanto normales como inflamatorias. El antígeno linfocítico cutáneo (CLA) se considera como un receptor de ecotaxia (homing) para linfocitos T que presentan tropismo por la piel. Santamaria-Babi, L., *Eur. J. Dermatol.* 14:13-18, 2004.

Se sabe que varias enfermedades de la piel expresan altos niveles de linfocitos T CLA+ que incluyen dermatitis atópica, dermatitis de contacto, reacciones alérgicas inducidas por fármacos, virus trópicos para la piel y prurito asociado a virus, vitíligo, linfoma de linfocitos T cutáneos, alopecia aerata, acné rosácea, acné vulgar, prurito nodular, penfigoide buloso. Existe la necesidad de tratar las enfermedades cutáneas mediadas por linfocitos T cutáneos.

Las actividades *in vivo* demostradas de la familia citocina ilustran el enorme potencial clínico y la necesidad de otras citocinas, agonistas de citocina y antagonistas de citocina. La IL-31 es una citocina recién identificada. Cuando IL-31 se sobreexpresa en ratones, se tiene como resultado síntomas similares a dermatitis. Tanto linfocitos T con ecotaxia a piel como queratinocitos epidérmicos se han implicado en la patología de enfermedades cutáneas en humanos. La presente invención corrige estas necesidades al proporcionar antagonistas para citocina IL-31 proinflamatorias. Los antagonistas de la presente invención, los cuales pueden bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de IL-31, incluyen receptores solubles de IL-31RA y anticuerpos anti-IL-31 neutralizantes. La invención proporciona además usos para los mismos en enfermedades inflamatorias así como composiciones y procedimientos relacionados.

La tecnología de anticuerpo monoclonal ha proporcionado una amplia gama de sustancias terapéuticas así como diagnósticos para uso en la identificación y tratamiento de enfermedades. Muchas aplicaciones clínicas se han enfocado en anticuerpos monoclonales murinos antihumanos, los cuales se generan en células de ratón pero los cuales específicamente se unen a un antígeno humano. Además, se han desarrollado anticuerpos quiméricos constituidos de secuencias de aminoácidos humanas y no humanas. Particularmente, las moléculas de anticuerpo híbrido que tienen regiones variables derivadas, por ejemplo de inmunoglobulina murina fusionada a regiones constantes derivadas de inmunoglobulina humana ya se han descrito. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N°. 4.416.567; Winter *et al.* (1991) *Nature* 349:293-299; y Lobuglio *et al.* (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 86:4220-4224. Además, puesto que las regiones constantes no se requieren para reconocimiento o unión de antígeno, los fragmentos de anticuerpo tales como F(ab) y F(ab')₂ y Fv, los cuales no comprenden la porción Fc se han indicado como candidatos útiles para terapia clínica.

Se han descrito numerosas moléculas recombinantes o biosintéticas que comprenden sitios que se unen a antígeno en roedores. Particularmente, se han descrito moléculas que tienen sitios de unión a antígeno de roedor construido directamente sobre anticuerpos humanos por injerto de únicamente el sitio de unión de roedor, en vez de la totalidad del dominio variable, en los dominios de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327 y Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536. Las moléculas que tienen un sitio que se une a antígeno, en donde por lo menos una de las regiones determinante de complementariedad (CDR) del dominio variable se derivan de un anticuerpo monoclonal murino y las partes remanentes derivadas de inmunoglobulina de la molécula se derivan de inmunoglobulina humana que se han descrito en la publicación de patente del Reino Unido N°. GB 2.276.169, publicada el 21 de septiembre de 1994. También se han descrito numerosos polipéptidos con sitio de unión a antígeno de cadena sencilla y moléculas de cadena sencilla Fv (sFv). Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N^{os}. 5.132.405 y 5.091.513 para Huston *et al.*; y la patente de EE.UU. N°. 4.946.778 para Ladner *et al.*

Una o varias de las funciones efectoras del dominio Fc de un anticuerpo incluye fagocitosis, liberación de mediadores inflamatorios, regulación de la producción de anticuerpo y, lo que es más importante, citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). El grado con el cual cualquiera de estas funciones efectoras se induce dependiendo de la interacción del dominio Fc con los mediadores de proteína relevante, los receptores Fcγ y Clq, y difiere en base en las regiones constantes (Fc) subclase IgG y su interacción con estas proteínas.

El dominio Fc de IgG1 interactúa con FcγRI, FcγRIIa y FcγRIII sobre células efectoras del sistema inmunitario. El papel preciso de los diferentes receptores Fcγ permanece por dilucidarse pero se considera que FcγRMA es el receptor mediador de ADCC más importante que se expresa principalmente en células NK pero también en monocitos y macrófagos. IgG1 también se une a Clq y puede activar CDC el cual es mediado principalmente por células NK que expresan FcγRIII. El dominio Fc de IgG4 tiene una afinidad de unión muy reducida por diferentes

receptores Fcγ y C1q, que corresponde con una ADCC y CDC reducidas. Aunque IgG1 muestra una actividad generalmente alta hacia ADCC y CDC, se considera que IgG4 tiene poca o nula actividad ADCC o CDC.

5 La afinidad de unión de mAb IgG4 negativo efecto se reduce grandemente si n se suprime cuando se compara con otros mAb de otro isotipo de IgG. No obstante, la capacidad para interactuar con el receptor Brambell (FcRn) se retiene en el IgG4 y por lo tanto afecta la farmacocinética del mAb isotipo IgG4 a través de una vida media aumentada.

10 Por lo tanto, existe la necesidad de moléculas que proporcionen secuencias de aminoácidos de anti-IL-31 humana junto con la molécula Fc de IgG4 humana para tratar inflamación mediada por IL-31.

El documento WO 03/060090 describe la citocina identificada como "ligando Zcytor17.

15 El documento US 2006/188500 describe procedimientos de pronóstico de respuesta terapéutica en la dermatitis atópica con antagonistas de IL-31.

Presta et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 58(5-6), 7 de agosto de 2006, páginas 640-656 describe ingeniería de anticuerpos terapéuticos para minimizar la inmunogenicidad y optimizar la función.

20 R&D Systems Inc. (<http://rndsistemas.com/prf/MAB2824.pdf>), 18 de abril de 2006 proporciona detalles del producto para un anticuerpo de IL-31 humano identificado en el número de catálogo MAB2824.

Breve descripción de las figuras

25 La figura 1 es una alineación de las secuencias de aminoácidos de los dominios variables a partir de las cadenas ligeras y cadenas pesadas de los clones 292.12.3.1, 292.84.1.6, 292.63.5.3, y 294.144.3.5.

La figura 2 es una alineación de las secuencias de aminoácidos de los dominios variables a partir de las cadenas ligeras y cadenas pesadas de clones y 292.12.3.1 y 292.84.1.6.

30 Las figuras 3 y 4 son alineaciones de las secuencias de aminoácidos en las regiones variables ligera y pesada de anticuerpos monoclonales de ratón anti-IL-31 humana.

Descripción detallada de la invención

35 Antes de establecer la invención con detalle, puede ser útil para la comprensión de la misma definir los siguientes términos:

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión de antígeno tales como fragmentos F(ab')₂ y Fab proteolíticos. Los anticuerpos intactos manipulados genéticamente o fragmentos tales como los anticuerpos quiméricos, fragmentos Fv, anticuerpos de cadena sencilla y similares, así como los péptidos que se unen a antígeno sintético y los polipéptidos también se incluyen. Los anticuerpos no humanos que se pueden humanizar por injertado de las CDR no humanas en una infraestructura y regiones constantes humanas o por incorporación de la totalidad de los dominios variables humanos (opcionalmente "recubriéndolos" con una superficie similar a la humana por sustitución de residuos expuestos, en donde se tiene como resultado un anticuerpo "oculto").

45 En algunas instancias, los anticuerpos humanizados pueden retener residuos no humanos dentro de los dominios de la infraestructura de región variable humana para incrementar las características de unión apropiadas. A través de los anticuerpos humanizados, se puede incrementar la vida media biológica y se reduce el potencial de regiones inmunitarias adversas cuando se suministran a humanos.

50 El término "anticuerpo quimérico" o "anticuerpos quiméricos" se refieren a anticuerpos cuyos genes para la cadena ligera y pesada se han construido, normalmente por manipulación genética, a partir de los genes para la región variable y constante de inmunoglobulinas que pertenecen a especies diferentes. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden unir a segmentos constantes humanos tales como γ 1 y γ 3. Un anticuerpo quimérico terapéutico típico de esta manera es una proteína híbrida compuesta del dominio variable o que se une a antígeno y un anticuerpo de ratón y el dominio constante de un anticuerpo humano, aunque se pueden utilizar otras especies de mamíferos.

60 Como se utiliza en el presente documento, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes para inmunoglobulina. Una forma de inmunoglobulina constituye la unidad estructura básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consiste de dos pares idénticos de cadena de inmunoglobulina, cada par tiene una cadena ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de cadena ligera y pesada son responsables, juntas, por la unión a un antígeno y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras de anticuerpo.

65 Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (de aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) son codificadas por un gen para la región variable en la parte NH₂ terminal (aproximadamente 110 aminoácidos) y el gen

para la región constante κ o λ en la parte COOH terminal. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos) son codificadas similarmente por un gen para la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes para la región constante mencionados antes (aproximadamente 330 aminoácidos). Las cadenas pesadas se clasifican como γ , μ , α , δ o ϵ y definen el isotipo de anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, en donde la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (véase de manera general *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7.

Una inmunoglobulina de la región variable de la cadena ligera o pesada consiste de una región de "infraestructura" interrumpida por tres regiones hipervariables. De esta manera, el término "región hipervariable" se refiere a los residuos aminoácidos de un anticuerpo los cuales son responsables para la unión de antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de una "región determinadora de complementariedad" o "CDR" (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada (Kabat *et al.*, *Sequences or Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service or Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917) (ambas incorporadas en el presente documento como referencia). Los residuos de la "región de infraestructura" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable como se define en el presente documento. Las secuencias de las regiones de infraestructura de las diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. Así, una "región de infraestructura humana" es una región de infraestructura que es sustancialmente idéntica (aproximadamente 85 % o más, habitualmente 90-95 % o más) a la región de infraestructura de una inmunoglobulina humana como se encuentra de manera natural. La región de infraestructura de un anticuerpo, esto es, las regiones de infraestructura combinadas de las cadenas ligera y pesada constitutivas, sirven para colocar y alinear las CDR. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno.

En consecuencia, el término inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región de infraestructura humana y una o más CDR a partir de una inmunoglobulina no humana (habitualmente una de ratón o rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona la CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona la infraestructura se denomina el "aceptor". No necesitan estar presentes las regiones constantes, pero si lo están, pueden ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, por lo menos aproximadamente 85-90 %, de manera preferente aproximadamente 95 % o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulina humana natural. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una cadena ligera humanizada y una inmunoglobulina de cadena pesada humanizada. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado no abarca un anticuerpo quimérico típico como se define en lo anterior, por ejemplo, debido a que la totalidad de la región variable de un anticuerpo quimérico es no humana.

La expresión "anticuerpos alterados genéticamente" significa anticuerpos en donde las secuencias de aminoácidos han variado en comparación con la del anticuerpo nativo. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante en la generación de anticuerpos uno necesita no estar confinado a la secuencia de aminoácidos que se encuentran en anticuerpos naturales; los anticuerpos que se pueden rediseñar para obtener las características deseadas. Las posibles variaciones son muchas y varían desde un cambio de sólo uno o de algunos aminoácidos hasta un rediseño completo, por ejemplo, de la región variable o constante. En general, los cambios en la región constante se realizarán con el fin de mejorar o alterar las características tales como fijación de complemento, interacción con membranas y otras funciones efectoras. Los cambios en la región variable se realizarán con el fin de mejorar las características de unión a antígeno.

Además de los anticuerpos pueden existir inmunoglobulinas en diversas formas adicionales que incluyen, por ejemplo, de cadena sencilla o Fv, Fab y (Fab')₂, así como diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos híbridos multivalentes o multiespecíficos (como se describe en lo anterior y con detalle en Lanzavecchia *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17, 105 (1987)) y en cadenas sencillas (por ejemplo Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 85, 5879-5883 (1988) y Bird *et al.*, *Science*, 242, 423-426 (1988), (Véase de manera general Hood *et al.*, "Immunology", Benjamin, N.Y. 2nd. ed. (1984).

Como se utiliza en el presente documento, los términos "Fv de cadena sencilla", "anticuerpos de cadena sencilla", "Fv" o "scFv" se refieren a fragmentos de anticuerpo que comprenden las regiones variables desde las cadenas pesada y ligera, pero que carecen de las regiones constantes, pero dentro de una cadena polipeptídica única. Generalmente, un anticuerpo de cadena sencilla comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que forme la estructura deseada la cual puede permitir la unión del antígeno. Los anticuerpos de cadena sencilla se describen detalladamente en Pluckthum en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); véase también la publicación de

solicitud de patente internacional N^o. WO 88/01649 y las patentes de EE.UU. N^{os}. 4.946.778 y 5.260.203. En realizaciones específicas los anticuerpos de cadena sencilla también pueden ser biespecíficos y/o humanizados.

5 Un "fragmento Fab" está constituido de una cadena ligera y las regiones C_{H1} y variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula de Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

10 Un "fragmento Fab" que contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de manera tal que se puede formar un enlace disulfuro entre cadenas, entre las dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')₂.

15 Un "fragmento F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de manera que el enlace disulfuro entre cadenas se forma entre dos cadenas pesadas.

20 Los pesos moleculares y longitudes de los polímeros determinados por procedimientos analíticos imprecisos (por ejemplo electroforesis en gel) se comprenderán como valores aproximados. Cuando el valor se expresa como "alrededor de" X o "aproximadamente" X, el valor establecido de X se entenderá que es preciso el ± 10 %.

25 La presente invención se basa, en parte, en la determinación de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos monoclonales que se describen en la solicitud de patente de EE.UU. en copropiedad, número de Serie 11/430,066 presentada el 8 de mayo del 2006, la cual se publicó el 7 de diciembre del 2006 como publicación de patente de EE.UU. N^o. 2006-0275295. Los hibridomas que expresan los anticuerpos monoclonales neutralizantes para IL-31 humana descritos en lo anterior se depositaron en la American Type Tissue Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd, Manassas VA 20110-2209) como depositarios de patente, como depósitos originales bajo el Tratado de Budapest y se les proporcionó los siguientes números de acceso ATCC: clon 292.12.3.1 (designación de depósito de patente ATCC PTA-6815, depositada el 29 de junio del 2005); clon 202.72.3.1 (designación de depósito de patente ATCC PTA-6816, depositada el 29 de junio del 2005); clon 292.63.5.3 (designación de depósito de patente ATCC PTA-6829, depositada el 6 de julio del 2005); clon 292.118.6.4 (designación de depósito de patente ATCC PTA-6830, depositada el 6 de julio del 2005); clon 294.163.2.1 (designación de depósito de patente ATCC PTA-6831, depositada el 6 de julio del 2005); clon 292.84.1.6 (designación de depósito de patente ATCC PTA-6871, depositada el 19 de julio del 2005); clon 294.35.2.6.3 (designación de depósito de patente ATCC PTA-6872, depositada el 19 de julio del 2005); clon 294.154.5.6 (designación de depósito de patente ATCC PTA-6875, depositada el 19 de julio del 2005); y clon 294.144.3.5 (designación de depósito de patente ATCC PTA-6873, depositada el 19 de julio del 2005).

35 La presente divulgación proporciona las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales producidos por estos hibridomas para ser utilizados para generar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos los cuales se unen al ligando IL-31 y que se pueden utilizar junto con una molécula Fc IgG4 humana, por ejemplo, mediante expresión como una proteína de fusión para antagonizar IL-31 y de esta manera inhibir, bloquear, reducir o neutralizar la inflamación en general y los síntomas de dermatitis y enfermedades pruríticas. Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden o que consisten de una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada y pueden ser quiméricos, humanizados o fragmentos de anticuerpo que neutralizan, inhiben, reducen, evitan o minimizan los efectos de IL-31 en su receptor. Los resultados clínicos del anticuerpo o fragmentos de anticuerpo pueden ser una reducción en las enfermedades inflamatorias tales como dermatitis y enfermedades pruríticas como se describen adicionalmente en el presente documento. En una realización, la dermatitis es dermatitis atópica. En otra realización la dermatitis es prurito nodular. En otra realización, la dermatitis es eczema.

40 La IL-31 es una citocina de linfocitos T descubierta recientemente, cuando se sobreexpresa en ratones, resulta en síntomas similares a dermatitis. Véase también Dillon, *et al.*, Nature Immunol. 5:752-760, 2004. Tanto los linfocitos T con ecotaxia hacia la piel como los queratinocitos epidérmicos se han implicado en la patología de enfermedades cutáneas en humanos. El ARNm para IL-31 así como la expresión de proteínas se limita a la población de linfocitos T CLA+ con ecotaxia hacia la piel tanto en pacientes con dermatitis atópica (AD) como en individuos normales, mientras que el análisis del receptor para IL-31, IL-31RA por inmunohistoquímica (IHC) sugiere niveles ligeramente mayores de expresión de IL-31RA sobre queratinocitos cutáneos en biopsias de piel de pacientes con AD aguda, y crónica, en comparación con individuos normales.

50 IL-31 es el nombre HUGO para una citocina que previamente ha sido descrita como Zcyto17rlig en una solicitud de patente de EE.UU. publicada (Véase número de publicación 20030224487, Sprecher, Cindy *et al.*, 2003). Véase también Dillon, *et al.*, Nature Immunol., supra. El receptor heterodimérico para IL-31 también se describe en 2000224487 como zcytor17 (nombre HUGO, IL-31RA) el cual forma un heterodímero con el receptor β de OncostatinaM (OSMRβ). Se ha aislado IL-31 de una biblioteca de ADNc generada a partir de células de sangre periférica humanas (hPBC) activadas las cuales se seleccionan para CD3. CD3 es un marcador de superficie celular único para células de origen linfocitoide, particularmente linfocitos T. Las secuencias polinucleotídica y polipeptídica para IL-31 humana se muestran en la SEC ID N^{os}. 1 y 2 respectivamente. Las secuencias polinucleotídica y polipeptídica para IL-31 murina se muestran en la SEC ID N^{os}. 3 y 4 respectivamente. Como se utiliza en el presente

documento, el término IL-31 significa IL-31, como se utiliza en la publicación de patente de EE.UU. número 20030224487, como se muestra en lo anterior. La secuencia de señal secretora de IL-31 está constituida de los residuos aminoácidos 1 (Met) a 23 (Ala) y el polipéptido maduro está constituido de los aminoácidos 24 (Ser) a 164 (Thr) (como se muestra en la SEC ID N°. 2. El análisis de secuenciado de la parte N terminal adicional de IL-31 purificado a partir de linfocitos 293T muestran en la parte N terminal en el residuo 27 (Leu), como se muestra en la SEC ID N°. 2, con el polipéptido maduro constituido de los residuos aminoácidos 27 (Leu) a 164 (Thr) (como se muestra en la SEC ID N°. 2.

La secuencia polipeptídica para IL-31RA (el receptor IL-31) se muestra en la SEC ID N°. 5 y la secuencia polipeptídica para el receptor β de oncostatinaM (OSMR β) se muestra en la SEC ID N°. 6.

El IL-31RA y los receptores OSMR β pertenecen a la subfamilia de receptores de citocina clase I que incluyen, pero que no se limitan a los receptores para IL-2, IL-4, IL-7, Lif, IL-12, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF y G-CSF (para una revisión véase Cosman, "The Hematopoietin Receptor Superfamily" en *Cytokine* 5(2): 95-106, 1993). La subunidad IL-31RA se describe completamente en la solicitud de patente PCT, en propiedad común, N°. US01/20484 (publicación WIPO N°. WO 02/00721). El análisis de distribución de tejido del ARNm de la subunidad IL-31RA muestra la expresión en subconjuntos de linfocitos T CD4+ y CD8+ activados, monocitos CD14+ y expresión más débil en linfocitos B CD19+. Además, está presente ARNm en líneas de células monocíticas tanto en reposo como activadas THP-1 (ATCC N°. TIB-202), U937 (ATCC N°. CRL-1593.2) y HL60 (ATCC N°. CCL-240).

La inhibición, naturalización y bloqueo de traducción de señal por las moléculas que comprenden un dominio variable de cadena ligera y/o un dominio variable de cadena pesada, denominadas "moléculas de unión IL-31" o "antagonistas de IL-31" en el presente documento se pueden medir por numerosos análisis conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los análisis que miden una reducción en la proliferación incluyen análisis para reducción de un colorante tal como AlamarBlue^{MR} (AccuMed International, Inc. Westlake, Ohio), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Mosman, J. *Immunol. Meth.* 65: 55-63, 1983); 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-3-carboximetoxifenil-2H-tetrazolio; hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio; y cloruro de cianoditolil-tetrazolio (los cuales están disponibles comercialmente de Polysciences, Inc., Warrington, PA); análisis de mitogénesis tal como medición de incorporación de timidina ³H; análisis de exclusión de colorante, por ejemplo, negro de naftaleno o azul de tripano; captación de colorante utilizando diacetilfluoresceína y liberación de cromo. Véase en general, Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3rd ed., Wiley-Liss, 1994. Además de lo anterior, véase la publicación de patente de EE.UU. publicada número 20030224487, (Sprecher, Cindy *et al.*, 2003) para un ejemplo de células BaF3 que expresan IL-31RA y OSMR β de longitud completa.

Los procedimientos para preparar los polinucleótidos que codifican para los anticuerpos descritos en el presente documento (que incluyen ADN y ARN) son bien conocidos en la técnica. El ARN total se puede preparar utilizando extracción con isotiocianato de guanidinio seguido por aislamiento por centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin *et al.*, *Biochemistry* 18: 52-94, 1979). El ARN poli(A)⁺ se prepara a partir de ARN total utilizando el procedimiento de Aviv y Leder *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 69: 1408-12, 1972). El ADN complementario (ADNc) se prepara a partir de ARN poli(A)⁺ utilizando procedimientos conocidos. En una alternativa, el ADN genómico se puede aislar. Los polinucleótidos que codifican para anticuerpos IL-31 se identifican de esta manera y se aíslan, por ejemplo, por hibridación o PCR.

La presente divulgación también incluye moléculas que se unen a IL-31 o antagonistas de IL-31 de unión de fragmentos funcionales de polipéptidos de IL-31 y moléculas de ácido nucleico que codifican para los fragmentos funcionales. Una IL-31 "funcional" o un fragmento de la misma, como se define en el presente documento, está caracterizada por su actividad proliferativa o diferenciadora, por su capacidad para inducir o inhibir funciones de células especializadas o por su capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo anti-IL-31 o IL-31RA o un anticuerpo o heterodímeros IL-31RA/OSMR β de estos receptores (solubles o inmovilizados). Como se describe previamente en el presente documento, IL-31 se caracteriza por una estructura de cuatro conjuntos helicoidales que comprenden hélice A (residuos aminoácidos 38-52), hélice B (residuos aminoácidos 83-98), hélice C (residuos aminoácidos 104-117) y hélice D (residuos aminoácidos 137-152) como se muestra en la SEC ID N°. 2. De esta manera, la presente divulgación proporciona además proteínas de fusión que abarcan: (a) moléculas polipeptídicas que comprenden una o más de las hélices descritas en lo anterior; y (b) fragmentos funcionales que comprenden una o más de estas hélices. La otra porción polipeptídica de la proteína de fusión puede estar constituida por otra citocina con cuatro conjuntos helicoidales tales como IL-15, IL-2, IL-4 y GMCSF, o por un péptido señal no nativo y/o no relacionado, secretor, que facilita la secreción de la proteína de fusión.

La presente divulgación también proporciona moléculas que se unen a IL-31 o antagonistas de IL-31 que se unen a fragmentos polipeptídicos o péptidos que comprenden una porción que porta un epítipo de un polipéptido IL-31 descrito en el presente documento. Los fragmentos o péptidos pueden comprender un "epítipo inmunogénico" el cual es una parte de una proteína que induce una respuesta de anticuerpo cuando la proteína completa se utiliza como un inmunógeno. Los péptidos que presentan epítipo inmunogénico se pueden identificar utilizando procedimientos estándar o convencionales (véase, por ejemplo Geysen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 81:3988 (1983)). La unión de los anticuerpos a estos fragmentos funcionales resulta en la inhibición, bloqueo, neutralización

y/o reducción en la transducción de señal de IL-31 sobre su receptor afín.

En contraste, los fragmentos polipeptídicos o péptidos pueden comprender un "epítipo antigénico" el cual es una región de una molécula proteínica a la cual se puede unir específicamente un anticuerpo. Ciertos epítipos consisten de una secuencia lineal o contigua de aminoácidos y la antigenicidad del epítipo no se interrumpe por agentes desnaturizantes. Se conoce en la técnica que péptidos sintéticos relativamente cortos pueden imitar epítipos de una proteína y se pueden utilizar para estimular la producción de anticuerpos contra la proteína (véase, por ejemplo, Sutcliffe *et al.*, *Science* 219:660 (1983)). De acuerdo con los péptidos antigénicos que presentan epítipo y los polipéptidos que se divulgan en el presente documento son útiles para generar anticuerpos (por ejemplo anticuerpos neutralizantes) que se unen con los polipéptidos descritos en el presente documento. Los perfiles de hidrofiliidad de Hopp/Woods se pueden utilizar para determinar regiones que tengan el mayor potencial antigénico (Hopp *et al.*, 1981, *ibid.*, y Hopp, 1986, *ibid.*). Por ejemplo, en IL-31 humana, las regiones hidrofílicas incluyen los residuos aminoácidos 54-59 de la SEC ID N°: 2, los residuos aminoácidos 129-134 de la SEC ID N°: 2, los residuos aminoácidos 53-58 de la SEC ID N°: 2, los residuos aminoácidos 35-40 de la SEC ID N°: 2 y los residuos aminoácidos 33-38 de la SEC ID N°: 2. Por ejemplo, en la IL-31 de ratón, las regiones hidrofílicas incluyen residuos aminoácidos 34-39 de la SEC ID N°: 4, los residuos aminoácidos 46-51 de la SEC ID N°: 4, los residuos aminoácidos 131-136 de la SEC ID N°: 4, los residuos aminoácidos 158-163 de la SEC ID N°: 4 y los residuos aminoácidos 157-162 de la SEC ID N°: 4.

Los péptidos que portan epítipo antigénico y los polipéptidos preferentemente contienen por lo menos cuatro a diez aminoácidos, por lo menos diez a catorce aminoácidos o aproximadamente catorce a aproximadamente treinta aminoácidos de la SEC ID N°: 2 o la SEC ID N°: 4. Los péptidos y polipéptidos que portan epítipo se pueden producir por fragmentación de un polipéptido de IL-31 o por síntesis peptídica química, como se describe en el presente documento. Además, los epítipos se pueden seleccionar por presentación de fago o biblioteca de péptido aleatorio (véase, por ejemplo Lane and Stephen, *Curr. Opin. Immunol.* 5:268 (1993); y Cortese *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:616 (1996). Los procedimientos estándar o convencionales para identificar epítipos y anticuerpos productores de péptidos pequeños que comprenden un epítipo se describen, por ejemplo, por Mole, "Epitope Mapping", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, Manson (ed.), páginas 105-116 (The Humana Press, Inc. 1992); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application*, Ritter and Ladyman (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995), y Coligan *et al.* (eds). *Current Protocols in Immunology*, páginas 9.3.1 – 9.3.5 y páginas 9.4.1 – 9.4.11 (John Wiley & Sons 1997).

La actividad de los anticuerpos, como se describe en el presente documento, se puede medir por su capacidad para inhibir o reducir la proliferación utilizando diversos análisis que miden la proliferación y/o la unión a células que expresan el receptor IL-31RA. Son de interés particular los cambios en células pendientes de IL-31. Las líneas de células adecuadas para ser manipuladas que son dependientes de IL-31 incluyen a la línea de células BaF3 dependiente de IL-3 (Palacios and Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 6: 4133-4135, 1986), FDC-P1 (Hapel *et al.*, *Blood* 64: 786-790, 1984) y MO7e (Kiss *et al.*, *Leukemia* 7: 235-240, 1993). Las líneas de células dependientes de factor de crecimiento se pueden establecer de acuerdo con procedimiento publicados (por ejemplo Greenberger *et al.*, *Leukemia Res.* 8: 363-375, 1984; Dexter *et al.*, en Baum *et al.*, Eds., *Experimental Hematology Today*, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980).

La actividad de los anticuerpos anti-IL-31 descrita en el presente documento se puede medir por un microfisiómetro biosensor basado en silicio el cual mide la velocidad de acidificación extracelular o la excreción de protones asociada con unión de receptor y las respuestas celulares fisiológicas subsecuentes. Un dispositivo ejemplar es Cytosensor^{MR} Microphysiometer fabricado por Molecular Devices Sunnyvale, CA. Diversas respuestas celulares, tales como proliferación celular, transporte de iones, producción de energía, respuesta inflamatoria, regulación y activación de receptor y similares se pueden medir por este procedimiento. Véase, por ejemplo, MaConnell, H.M. *et al.*, *Science* 257:1906-1912, 1992; Pitchford, S. *et al.*, *Meth. Enzymol.* 228:84-108, 1997; Arimilli, S. *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 212:49-59, 1998; Van Liefde, I. *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 346:87-95, 1998.

Los antagonistas también son útiles como reactivos de investigación para caracterización de sitio de interacción ligando-receptor. Los antagonistas son útiles para inhibir la expansión, proliferación, activación y/o diferenciación de células involucradas en regular la hematopoyesis. Los inhibidores de la actividad de IL-31 (antagonista de IL-31) incluyen anticuerpos anti-IL-31 y receptores IL-31 solubles así como otros agentes peptídicos y no peptídicos (que incluyen ribosimas).

La inhibición de la actividad de IL-31 se puede medir en números análisis. Además de aquellos análisis que se describen en el presente documento se pueden probar muestras para inhibición de actividad de IL-31 dentro de diversos análisis diseñados para medir la unión de receptor, la estimulación/inhibición de respuestas celulares dependientes de IL-31 o la proliferación de células que expresan el receptor IL-31RA.

Un polipéptido que se une a IL-31, que incluye moléculas que se unen a IL-31 o antagonistas de IL-31 también se pueden utilizar para purificación de ligando. El polipéptido se inmoviliza en un soporte sólido, tal como esfera de agarosa, agarosa reticulada, vidrio, resinas celulósicas, resinas basadas en sílice, poliestireno, poliacrilamida

reticulada o materiales similares que sean estables bajo las condiciones de uso. Los procedimientos para enlazar polipéptidos a soportes sólidos son bien conocidos en la técnica e incluyen química de amina, activación por bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación de epóxido, activación por sulfhidrilo y activación por hidrazida. El medio resultante generalmente se configurará en forma de una columna y los fluidos que contienen ligando se hacen pasar a través de la columna una o más veces para permitir que el ligando se una al polipéptido receptor. El ligando después se eluye utilizando cambios en la concentración de sal, agentes caotrópicos (clorhidrato de guanidina), o pH para interrumpir la unión ligando-receptor.

Un sistema de análisis que utiliza un ligando-receptor de unión (o un anticuerpo, un miembro de un par complemento/anticomplemento) o un fragmento de unión del mismo y un instrumento biosensor disponible comercialmente (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) se pueden utilizar de manera ventajosa. El receptor, anticuerpo, miembro de un par complemento/anticomplemento o fragmento se inmoviliza sobre la superficie de un chip receptor. El uso de este instrumento se describe por Karlsson, J. *Immunol. Methods* 145:229-40, 1991 y Cunningham y Wells, J. *Mol. Biol.* 234: 554-63, 1993. Un receptor, anticuerpo, miembro o fragmento se une covalentemente utilizando química de amina o sulfhidrilo, a fibras de dextrano que se unen a una película de oro dentro de la célula de flujo. Una muestra de prueba se hace pasar a través de la célula. Si un ligando, epítipo o miembro opuesto del par complemento/anticomplemento está presente en la muestra, se unirá al receptor inmovilizado, anticuerpo o miembro, respectivamente, provocando un cambio en el índice de refracción del medio, el cual se detecta como un cambio en la resonancia de plasmón de superficie de la película de oro. Este sistema permite la determinación de tasas de entrada y salida, a partir de las cuales se puede calcular la afinidad de unión y determinación de la estequiometría de unión. De manera alternativa, la unión ligando/receptor se puede analizar utilizando la tecnología SELDI^{MR} (Cipergen, Inc., Palo Alto, CA).

Las moléculas que se unen IL-31 o los antagonistas de IL-31 se pueden utilizar para bloquear la acción biológica de IL-31 proinflamatoria y son útiles como sustancias terapéuticas antiinflamatorias en diversas enfermedades como se describe en el presente documento. Una persona experta en la técnica puede reconocer que los polipéptidos que portan epítipo, antigénicos, contienen una secuencia de por lo menos 6, preferentemente por lo menos 9 y de manera más preferente por lo menos 15 a 30 residuos aminoácidos contiguos de un polipéptido IL-31 (por ejemplo SEC ID N°.: 2). Los polipéptidos que comprenden una porción más grande de un polipéptido IL-31, es decir, de 30 a 100 residuos hasta la longitud completa de la secuencia de aminoácidos se incluyen. Los antígenos o epítopos inmunogénicos también pueden incluir etiquetas unidas, adyuvantes, vehículos y portadores, como se describe en el presente documento. Los antígenos adecuados incluyen un polipéptido IL-31 codificado por la SEC ID N°.: 2 del aminoácido número 24 al aminoácido número 164 o un fragmento de 9 a 141 aminoácidos contiguos del mismo. Otros antígenos adecuados incluyen la longitud completa de IL-31 madura, las hélices A-D y las hélices individuales o múltiples A, B, C o D de la estructura de IL-31 con cuatro conjuntos helicoidales, como se describe en el presente documento. Los péptidos preferentes para uso como antígenos son péptidos hidrofílicos tales como los prelos por aquellos expertos en la técnica a partir de una gráfica de hidrofobicidad, como se describe en el presente documento, por ejemplo, los residuos aminoácidos 114-119, 101-105, 126-131, 113-118 y 158-162 de la SEC ID N°.: 2; y los residuos aminoácidos 34-39, 46-51, 131-136, 158-163 y 157-162 de la SEC ID N°.: 4. Además, los epítopos antigénicos IL-31, como se predicen por la gráfica de Jameson-Wolf, por ejemplo, utilizando el programa DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI) sirven como antígenos preferentes y se determinan con facilidad por una persona experta en la técnica.

Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 se consideran que se unen específicamente si: 1) muestran un nivel umbral de actividad de unión, y 2) no dan reacción cruzada significativa con moléculas polipeptídicas relacionadas. Un nivel umbral de unión se determina si las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 en el presente documento se unen a un polipéptido, péptido o epítipo de IL-31 con una afinidad por lo menos diez veces mayor que la afinidad de unión al polipéptido control (diferente de IL-31). Se prefiere que los anticuerpos muestren una afinidad de unión (K_a) de 10^6 M^{-1} o mayor, preferentemente 10^7 M^{-1} o mayor, de manera más preferente 10^8 M^{-1} mayor y de manera mucho más preferente 10^9 M^{-1} o mayor. La afinidad de unión de las moléculas que se unen a IL-31 o los antagonistas de IL-31 se pueden determinar fácilmente por una persona habitualmente experta en la técnica, por ejemplo por análisis Scatchard (Scatchard, G., *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949).

Aunque las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 no dan reacción cruzada significativa con moléculas polipeptídicas relacionadas y esto se determina, por ejemplo, por las moléculas que se unen a IL-31 o los antagonistas de IL-31 que detectan el polipéptido IL-31 pero no los polipéptidos relacionados conocidos utilizando análisis de transferencia Western estándar (Ausubel *et al.*, *ibid.*). Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos son aquellos descritos en la técnica anterior tales como ortólogos conocidos y parálogos así como miembros conocidos similares de una familia de proteína. El cribado también se puede realizar utilizando polipéptidos no humanos de IL-31 e IL-31 mutante. Además, las moléculas que se unen a IL-31 o los antagonistas de IL-31 pueden ser "cribados contra" polipéptidos relacionados conocidos para aislar una población que se una específicamente a los polipéptidos IL-31. Por ejemplo, las moléculas que se unen a IL-31 o los antagonistas de IL-31 se absorben a polipéptidos relacionados que se adhieren a la matriz insoluble; las moléculas que se unen a IL-31 o los antagonistas de IL-31 específicas para IL-31 fluirán a través de la matriz bajo condiciones de amortiguador apropiadas. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988;

Current Protocols in Immunology, Cooligan, *et al.*, (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995.

5 Los anticuerpos monoclonales purificados a partir de medio de cultivo de tejido se caracterizan por su capacidad para bloquear o reducir la actividad de unión del receptor ("análisis de neutralización") de hUL-31 recombinante purificado sobre células BaF3/MPL-IL-31.

10 La afinidad de unión de las moléculas que se unen a IL-31 y el antagonista de IL-31 se pueden determinar. Un anticuerpo específico de chip contra Fc y de IgG de rata (Jackson) se inmoviliza en un chip CM5 Biacore. Se optimiza el análisis para unión de cada mAb a la superficie de captación anti-Rat y después se inyecta una serie de concentración de IL-31 a través del mAb para determinar la asociación (Ka) y disociación (Kd). Después de cada corrida se regenera la superficie nuevamente para el anticuerpo anti-Rat con dos inyecciones de HCl 20 Mm. Se generan datos para cada uno y se utiliza un programa de evaluación (programa BIAevaluation, versión 3.2, Pharmacia BiAcCore, Upsala, Suecia) para determinar la cinética del anticuerpo anti-IL-31 que se une a la proteína IL-31.

20 La secuencia polinucleotídica y polipeptídica de las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada de los clones números 292.12.3.1, 292.84.1.6, 292.63.5.3, 294.144.3.5, 292.39.5.3, 292.51.5.2, 292.64.6.5.5, 292.105.4.1, 292.109.4.4, 292.118.6.4, 292.72.3.1 se determina como se muestra en el Ejemplo 1. La secuencia polipeptídica de la parte amino terminal de las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los clones números se determina como se muestra en el Ejemplo 2.

25 Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 en medio de cultivo de tejido se caracterizan por su capacidad para bloquear, inhibir, evitar o reducir la unión de receptor cuando crecen en presencia de las proteínas recombinantes purificadas humanas de IL-31. Por ejemplo, las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 se pueden caracterizar de numerosas maneras que incluyen tirado (es decir, determinar si cada anticuerpo puede inhibir la unión de cualquier otra unión), afinidad relativa y neutralización.

30 Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 generados por los procedimientos descritos en el presente documento se pueden probar para neutralización por diversos procedimientos. Por ejemplo, el análisis de luciferasa como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. publicada (véase número de publicación 20030224487, Sprecher, Cindy *et al.*, 2003) se puede utilizar. Además se puede probar la neutralización al medir una disminución en la producción de quimiocinas proinflamatorias tales como TARC y MDC a partir de cultivos de queratinocitos en presencia de ligando y el anticuerpo monoclonal. La neutralización también se puede medir por modelos *in vivo* descritos en el presente documento.

40 En una realización, las moléculas de unión IL-31 o los antagonistas de IL-31 que se divulgan en el presente documento son fragmentos de anticuerpo que unen antígeno humano de la presente divulgación e incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden el dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo que unen antígeno incluyen anticuerpos de cadena sencilla y pueden comprender una o varias de las regiones variables (es decir, la SEC ID N^o. 1, 2, 3 o 4) sola o en combinación con la totalidad o una porción de lo siguiente: región de bisagra, dominios C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. También se divulgan en el presente documento fragmentos que unen antígeno que comprenden también cualquier combinación de una o varias regiones variables con una región de bisagra, o los dominios C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}.

45 En otra realización, las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o con una multiespecificidad mayor. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido de la presente divulgación o pueden ser específicos tanto para un polipéptido de la presente divulgación así como para un epítopo heterólogo tal como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tuft, *et al.*, J. Immunol. 146:60-69 (1991); patentes de EE.UU. N^{os}. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

55 La presente divulgación también incluye moléculas de unión de IL-1 o antagonistas de IL-31 alteradas genéticamente que son funcionalmente equivalentes a las moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en lo anterior. Se prefieren las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 modificados que proporcionen estabilidad y/o eficacia terapéutica mejoradas. Los ejemplos de anticuerpos modificados incluyen aquellos con sustituciones conservadoras de residuos aminoácidos y una o más supresiones o adiciones de aminoácidos las cuales no alteren de manera dañina significativamente la utilidad de unión de antígeno. Las sustituciones pueden variar desde cambiar o modificar uno o más residuos aminoácidos hasta rediseño completo de una región en la medida en que se mantengan la utilidad terapéutica. Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 de la presente divulgación se pueden modificar postraduccionalmente (por ejemplo acetilación y fosforilación) o se pueden modificar sintéticamente (por ejemplo, la unión de un grupo marcador).

65 Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 también incluyen anticuerpos quiméricos o fragmentos quiméricos que comprenden una región variable como se describe en el presente documento y una región constante

derivada de un humano de manera que el anticuerpo quimérico o el fragmento quimérico tenga una vida media más prolongada y que se menos inmunogénico cuando se administra a un sujeto humano. Se conoce en la técnica el procedimiento de elaboración de anticuerpos quiméricos y fragmentos quiméricos. Las regiones variables de estas moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 se pueden conectar con una región constante de una IgG humana para formar el anticuerpo quimérico deseado. Una molécula de Fc de IgG se puede fusionar a las moléculas de unión de IL-31. Para evitar la inducción de la función efectora, la molécula Fc de IgG puede ser una molécula Fc de IgG4. De esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables y las regiones variables como se describen en el presente documento se pueden utilizar para generar anticuerpos quiméricos en donde la región constante es una molécula de IgG humana y la cadena ligera y las regiones variables de cadena pesada se pueden seleccionar de aquellas de los clones 292.12.3.1, 292.84.1.6, 292.63.5.3, 294.144.3.5, 292.39.5.3, 292.51.5.2, 292.64.6.5.5, 292.105.4.1, 292.109.4.4, 292.118.6.4 y 292.72.3.1. Los anticuerpos quiméricos pueden tener: a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 8 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 9; b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 10 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 11; c) y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 13; d) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 14 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 15; e) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 16 y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 17; f) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 18 y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 19; g) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 20 y la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 21; h) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 22 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 23; i) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 24 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 25; o j) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 26 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 27 y que se utiliza junto con una molécula Fc de IgG4 humana.

Dichas regiones variables también se pueden generar con o sin las secuencias de señal. De esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables y las regiones variables como se describen en el presente documento se pueden utilizar para generar anticuerpos quiméricos en donde la región constante es una molécula de IgG humana y las regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada pueden tener una secuencia de señal y se pueden seleccionar de los clones 292.12.3.1, 292.84.1.6, 292.63.5.3, 294.144.3.5, 292.39.5.3, 292.51.5.2, 292.64.6.5.5, 292.105.4.1, 292.109.4.4, 292.118.6.4 y 292.72.3.1. Los anticuerpos quiméricos pueden tener: a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 31 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 32; b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 2 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 4; c) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 35 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 36; d) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 37 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 38; e) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 39 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 40; f) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 41 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 42; g) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 43 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 44; h) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 45 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 46; i) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 47 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 48; o j) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 49 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 50 y que se utiliza junto con una molécula Fc de IgG4 humana. Las regiones variables se pueden generar con o sin las secuencias de señal.

Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 incluyen la versión humanizada de las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento. Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 humanizados comprenden las CDR de una inmunoglobulina donante de ratón y las infraestructuras de cadena pesada y de cadena ligera de una inmunoglobulina aceptora humana. El procedimiento de elaboración de anticuerpo humanizado se divulga en las patentes de EE.UU. N^{os}. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; y 6.180.370. Las CDR de estos anticuerpos se pueden injertar en cualquiera de las infraestructuras

humanas seleccionadas, las cuales se conocen en la técnica para generar el anticuerpo humanizado deseado.

La divulgación también proporciona moléculas que se unen a IL-31 o antagonistas de IL-31 que inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo monoclonal a un polipéptido de la invención, preferentemente el polipéptido de la SEC ID N°. 2 o SEC ID N°. 4. La inhibición competitiva se puede determinar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, utilizando análisis de unión competitivos descritos en el presente documento. En realizaciones preferentes, el anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión de un anticuerpo monoclonal de la invención en por lo menos 90 %, por lo menos 80 %, por lo menos 70 %, por lo menos 60 % o por lo menos 50 % del polipéptido de la SEC ID N°. 2 o SEC ID N°. 4.

La divulgación también proporciona moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 que inhiben de manera competitiva la unión de un anticuerpo o un epítipo de la invención, determinado por cualquier procedimiento conocido en la técnica para determinar unión competitiva, por ejemplo, los inmunoanálisis descritos en el presente documento. En realizaciones preferentes, el anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión al epítipo en por lo menos 90 %, por lo menos 80 %, por lo menos 70 %, por lo menos 60 % o por lo menos 50 %.

Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento incluyen derivados que son modificados, por ejemplo, pero no a modo de limitación, y el derivado incluye moléculas que se unen a IL-31 o antagonistas de IL-31 que han sido modificados, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización (formación de derivados) por grupos protectores/bloqueadores conocidos, separación proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo por técnicas conocidas que incluyen, pero que no se limitan a separación química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. De manera adicional, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento, también abarcan moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 que tienen vidas media (por ejemplo vidas media en suero) en un mamífero, preferentemente un humano, mayor de 15 días, preferentemente mayor de 20 días, mayor de 25 días, mayor de 30 días, mayor de 35 días, mayor de 40 días, mayor de 45 días, mayor de 2 meses, mayor de 3 meses, mayor de 4 meses o mayor de 5 meses. Las vidas media aumentadas de los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos en un mamífero, preferentemente un humano, resultan en un título superior en suero de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo en el mamífero y por lo tanto reducen la frecuencia de la administración de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y/o reducen la concentración de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se administran.

La vida media *in vivo* de las moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 pueden aumentar modificando (por ejemplo, al sustituir, suprimir o agregar) residuos aminoácidos identificados como se indica en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales N^{os}. WO 97/34631 y WO 02/060919, las cuales se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad) o por unión de moléculas poliméricas tales como polietilenglicol (PEG) de peso molecular alto. Se puede unir PEG con o sin un enlazador multifuncional ya sea a través de conjugación específica de sitio de PEG a la parte N o C terminal de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o por medio de grupos ϵ -amino presentes en residuos lisina. La formación de derivados poliméricos lineales o ramificados que resulte en pérdida mínima de actividad biológica se puede utilizar. El grado de conjugación se vigilará estrechamente por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar conjugación apropiada de moléculas PEG a los anticuerpos. El PEG que no haya reaccionado se puede separar de los conjugados anticuerpo-PEG, por ejemplo, por cromatografía de exclusión de tamaño o intercambio iónico.

Se entiende que las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 humanizados diseñados por el presente procedimiento pueden tener sustituciones de aminoácidos conservadores adicionales, los cuales sustancialmente no tengan efecto sobre la unión de antígeno u otras funciones de inmunoglobulina. Por sustituciones conservadoras se quieren indicar combinaciones tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, las inmunoglobulinas humanizadas incluyen anticuerpos humanizados que han sido construidos por medio de ingeniería (manipulación) genética. La mayor parte de las inmunoglobulinas humanizadas que han sido descritas previamente (Jones *et al.*, op. cit; Verhoeyen *et al.*, op. cit; Riechmann *et al.*, op. cit) están constituidas de una infraestructura que es idéntica a la infraestructura de una cadena de inmunoglobulina humana particular, el aceptor y tres CDR de una cadena de inmunoglobulina donante no humana. Específicamente, los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especie no humana que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinadoras de complementariedad (las CDR) de una especie no humana y regiones de infraestructura de una molécula de inmunoglobulina humana.

La presente divulgación incluye criterios por medio de los cuales un número limitado de aminoácidos en la infraestructura de una cadena de inmunoglobulina humanizada se seleccionan para que sean iguales que los aminoácidos en aquellas posiciones en el donante en vez del aceptor con el fin de incrementar la afinidad de un

anticuerpo que comprende la cadena de inmunoglobulina inmunizada.

Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 que se divulgan en el presente documento se generan en base, en parte, en el modelo de que dos causas contribuyentes de la pérdida de afinidad en medios anteriores de producción de anticuerpos humanizados (utilizando como ejemplo anticuerpos de ratón como la fuente de las CDR) son:

(1) Cuando las CDR de ratón se combinan con la infraestructura humana, los aminoácidos de la infraestructura cercanos a la CDR se vuelven humanos en vez de ser de ratón. Sin desear unirse a teoría alguna, estos aminoácidos cambiados pueden distorsionar ligeramente las CDR debido a que generan fuerzas electrostáticas o hidrofóbicas diferentes que en el anticuerpo del ratón donante y las CDR distorsionadas pueden no hacer contactos eficaces con el antígeno como las CDR del anticuerpo donante; y

(2) Los aminoácidos en el anticuerpo de ratón original están cercanos, pero no son parte de las CDR (es decir, aún son parte de la infraestructura) y pueden realizar contactos con el antígeno para contribuir a la afinidad. Estos aminoácidos se pierden cuando el anticuerpo se humaniza, debido a que toda la infraestructura de aminoácidos se vuelve humana.

Para evitar problemas y para reducir los anticuerpos humanizados que tienen una afinidad muy fuerte por un antígeno deseado, la presente divulgación utiliza uno o más de los siguientes principios para diseñar inmunoglobulinas humanizadas. Además, los criterios se pueden utilizar solos o, cuando es necesario combinados para obtener la afinidad u otras características, deseadas.

Un principio es que, como aceptor, se utiliza una infraestructura de una inmunoglobulina humana particular que es inusualmente homóloga a la inmunoglobulina donante que se va a humanizar, o en uso de una infraestructura de consenso para muchos anticuerpos humanos. Por ejemplo, la comparación de la secuencia de una región variable de cadena pesada (o ligera) de ratón contra las regiones variables pesada (o ligera) de humano en un banco de datos (por ejemplo el National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource) muestra que el grado de homología a diferentes regiones humanas varía en gran medida, normalmente desde aproximadamente 40 % hasta aproximadamente 60-70 %. Al seleccionar como la inmunoglobulina aceptora una de las regiones variables de cadena pesada (respectivamente, ligera) humana, que es más homóloga que la región variable de cadena pesada (respectivamente, ligera) de la inmunoglobulina donante, se cambiarán menos aminoácidos al desplazarse desde la inmunoglobulina donante a la inmunoglobulina humanizada. Por lo tanto, y nuevamente sin desear unirse a teoría alguna, se considera que existe una menor probabilidad de cambiar el aminoácido cerca de las CDR que distorsionan su conformación. Además, la forma general precisa del anticuerpo humanizado que comprende la cadena de inmunoglobulina humanizada puede recordar más estrechamente la forma del anticuerpo donante, lo que también reduce la probabilidad de distorsionar las CDR.

Normalmente, una de 3-5 de la mayor parte de las secuencias de la región variable de cadena pesada homóloga en una colección representativa de por lo menos aproximadamente 10 a 20 cadenas pesadas humanas distintas se seleccionarán como aceptor para proporcionar la infraestructura de cadena pesada y de manera similar para la cadena ligera. Preferentemente, una de 1-3 las regiones variables más homólogas son las que se utilizarán. La cadena de inmunoglobulina aceptora seleccionada de manera más preferente tendrá por lo menos aproximadamente 65 % de homología en la región de infraestructura con la inmunoglobulina donante.

En muchos casos se puede considerar preferente utilizar cadenas ligera y pesada del mismo anticuerpo humano como secuencias aceptoras para asegurarse que las cadenas ligera y pesada humanizadas tendrán contactos favorables entre sí. En este caso, las cadenas ligera y pesada donantes se compararán únicamente contra cadenas de anticuerpos humanos de las cuales se conozca la secuencia completa, por ejemplo, los anticuerpos Eu, Lay, Pom Wol, Sie, Gal Ou y WEA (Kabat *et al.*, op. cit; ocasionalmente, los últimos aminoácidos de una cadena humana no se conocen y se deben reducir por homología con otros anticuerpos humanos). El anticuerpo humano se seleccionará en el cual las secuencias de las regiones variables de cadena ligera y pesada, tomadas juntas son en general más homólogas a las secuencias de la región variable de la cadena ligera y pesada donantes. Algunas veces se suministrará un peso mayor a las secuencias de la cadena pesada. El anticuerpo humano seleccionado después proporcionará las secuencias aceptoras de cadena ligera y pesada. En la práctica, con frecuencia se encuentra que el anticuerpo Eu humano sirve para este papel.

De acuerdo con el procedimiento del "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la totalidad de la biblioteca de las secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia humana la cual es más cercana a la del roedor se acepta entonces como la infraestructura (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro procedimiento utiliza una infraestructura particular derivada de una secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Se puede utilizar la misma infraestructura para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89; 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

Sin importar de qué manera se selecciona la inmunoglobulina aceptora, se puede obtener una afinidad mayor al seleccionar un número pequeño de aminoácidos en la infraestructura de la cadena de inmunoglobulina humanizada para que sea igual que los aminoácidos que aquellas posiciones en el donante en vez de en el aceptor. Con frecuencia, los residuos de infraestructura en las regiones de infraestructura humana estarán sustituidos con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar la unión a antígeno. Estas sustituciones de infraestructura se identifican por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de la CDR y los residuos de infraestructura para identificar residuos de infraestructura importantes para unión de antígeno y comparación de secuencia para identificar residuos de infraestructura poco comunes en posiciones particulares (véase, por ejemplo Queen *et al.*, patente de EE.UU. N.º. 5.585.089; Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988) las cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). Los anticuerpos se pueden humanizar utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, CDR-injetado (EP 239,400; publicación PCT WO 91/09967; patente de EE.UU. N.ºs. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), ocultamiento o cambios de superficie (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska, *et al.*, PNAS 91:969-973 (1994)) y barajado de cadena (patente de EE.UU. N.º. 5.565.332). En consecuencia, los anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N.º. 4.816.567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de especies no humanas.

Los anticuerpos humanizados generalmente tienen por lo menos tres ventajas potenciales con respecto a los ratones o, en algunos casos, los anticuerpos quiméricos para uso en tratamiento en humanos:

(1) Debido a que la porción efectora es humana, puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmunitario humano (por ejemplo destruir las células objetivo más eficazmente por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)).

(2) El sistema inmunitario humano no reconoce la infraestructura o región constante del anticuerpo humanizado como extraña y por lo tanto la respuesta del anticuerpo contra el anticuerpo inyectado será menor que contra un anticuerpo de ratón completamente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño.

(3) Los anticuerpos de ratón inyectados se ha informado que tienen una vida media en circulación en humano mucho más corta que la vida media de anticuerpos normales (D. Shaw *et al.*, J. Immunol., 138, 4534-4538 (1987)). Los anticuerpos humanizados inyectados probablemente tengan una vida media más similar a los anticuerpos humanos como se encuentran de manera natural, lo que permite que se administren dosis menores y menos frecuentes.

En un aspecto, la presente divulgación se relaciona con el diseño de anticuerpos humanizados que se producen al expresar segmentos de ADN recombinante que codifican para las CDR de cadena pesada y ligera a partir de una inmunoglobulina donante capaz de unirse a un antígeno deseado, tal como IL-31 unida a segmentos de ADN que codifican para regiones de infraestructura humana aceptora.

Los segmentos de ADN normalmente incluirán además una secuencia de ADN de control de expresión unida operablemente a las secuencias codificantes de inmunoglobulina humanizada que incluyen regiones asociadas naturalmente o promotoras heterólogas. Las secuencias de control de expresión serán sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucarióticas pero las secuencias control para hospedadores procarióticos también se pueden utilizar. Una vez que el vector ha sido incorporado en el hospedador apropiado, el hospedador se mantiene bajo condiciones adecuadas para expresión de alto nivel de las secuencias nucleotídicas y, como se desea, la recolección y purificación de las cadenas ligeras humanizadas, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina pueden seguir (véase S. Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979). Las moléculas anti-IL-31 se pueden fabricar por expresión en células hospedadoras de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino y células HE 293F, por ejemplo.

Las secuencias de ADN de la región constante humana se pueden aislar de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de diversas células humanas, pero de manera preferente linfocitos B inmortalizados (véase Kabat, op. cit. Y WP87/02671). Las CDR para producir las inmunoglobulinas de la presente invención se derivarán similarmente de anticuerpos monoclonales capaces de unirse al antígeno predeterminado tales como IL-31 y se producen por procedimientos bien conocidos en cualquier fuente de mamífero convencional que incluyen ratones, ratas, conejos y otros vertebrados capaces de producir anticuerpos. Las células fuente adecuadas para la región constante y las secuencias de ADN de infraestructura así como las células hospedadoras para expresión y secreción de inmunoglobulina se pueden obtener de numerosas fuentes tales como la American Type Culture Collection (Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", sexta edición (1988) Rockville, Md. EE.UU).

Además de las inmunoglobulinas humanizadas descritas específicamente en este documento, otras inmunoglobulinas modificadas "sustancialmente homólogas" para las secuencias nativas se pueden diseñar fácilmente y se pueden fabricar utilizando diversas técnicas de ADN recombinante bien conocidas por aquellos

5 expertos en la técnica. Se pueden utilizar diversas regiones de infraestructura humanas diferentes solas o combinadas, como una base para las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención. En general, las modificaciones de los genes se pueden llevar a cabo fácilmente por diversas técnicas bien conocidas, tales como mutagénesis dirigida a sitio (véase Gillman y Smith, *Gene*, 8, 81-97 (1979) y S. Roberts *et al.*, *Nature*, 328, 731-734 (1987)).

10 Los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento incluyen fragmentos así como anticuerpos intactos. Normalmente, estos fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del cual se derivan, por la unión a antígeno. Los fragmentos normalmente se unen con una afinidad de por lo menos 10^7 M^{-1} , y de manera más habitual 10^8 o 10^9 M^{-1} (es decir, dentro de los mismos intervalos que el anticuerpo intacto). Los fragmentos de anticuerpo humanizados incluyen cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, Fab, Fab', F(ab')_2 y Fv. Los fragmentos se producen por técnicas de ADN recombinante o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

15 Para detalles adicionales respecto a los anticuerpos humanizantes véanse las patentes europeas N^{os}. 239,400, 592,106 y 519,596; las publicaciones internacionales N^{os}. WO 91/09967 y WO 93/17105; las patentes de EE.UU. N^{os}. 5.225.539, 5.530.101, 5.565.332, 5.585.089, 5.766.886 y 6.407.213; y Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6): 805-814; Roguska *et al.*, 1994, *PNAS* 91: 969-973; Tan *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169: 1119-1125; Caldas *et al.*, 2000, *Protein Eng.* 13:353-360; Morea *et al.*, 2000, *Methods* 20: 267-279; Baca *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 10678-84; Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9: 895-904; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55: 1717-22; Sandhu, 1994, *Gene* 150: 409-10; Pedersen *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 235: 959-73; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522-525; Reichmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323-329; y Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596.

25 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan vía digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science*, 228:81 (1985)). No obstante, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, se pueden aislar los fragmentos de anticuerpo a partir de las bibliotecas de fago de anticuerpo descritas en lo anterior. De manera alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y se pueden acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')_2 (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')_2 se pueden aislar directamente de un cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los expertos en la técnica. Además, los ejemplos de técnicas las cuales se pueden utilizar para producir los Fv de cadena sencilla y anticuerpos incluyen aquellos descritos en la patente de EE.UU. 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu *et al.*, *PNAS* 90:7995-7999 (1993); y Skerra *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988).

40 La presente divulgación abarca anticuerpos fusionados de manera recombinante o conjugados químicamente (que incluyen conjugaciones covalentes y no covalentes) a un polipéptido (o una porción del mismo, preferentemente por lo menos 10, 20 o 50 aminoácidos del polipéptido) de la presente invención para generar proteínas de fusión. Por lo tanto, la divulgación también se relaciona con inmunoconjugados que comprende el anticuerpo descrito en el presente documento conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, micótico, vegetal o animal o fragmentos de la misma) o un isótopo radioactivo (por ejemplo un radioconjugado).

45 La presente divulgación abarca anticuerpos fusionados de manera recombinante o conjugados químicamente (que incluyen conjugaciones covalentes y no covalentes) a un polipéptido o porción del mismo, preferentemente de por lo menos 10, 20 o 50 aminoácidos del polipéptido) de la presente invención para generar proteínas de fusión. La fusión no necesariamente necesita ser directa sino que se puede llevar a cabo a través de secuencias enlazadoras. Los anticuerpos pueden ser específicos para antígenos diferentes de polipéptidos (o porciones de los mismos, preferentemente de por lo menos 10, 20 o 50 aminoácidos del polipéptido) de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden utilizar para dirigir los polipéptidos de la presente invención a tipos de células particulares, *in vitro* o *in vivo*, al fusionar o conjugar los polipéptidos de la presente invención a anticuerpos específicos para receptores de superficie celular particulares. Los anticuerpos fusionados o conjugados a los polipéptidos de la presente invención también se pueden utilizar en inmunoanálisis *in vitro* y procedimientos de purificación que utilicen procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harbor *et al.*, *supra* y la publicación PCT WO 93/21232; EP 439.095; Naramura *et al.*, *Immunol. Lett.* 39:91-99 (1994); Patente de EE.UU. número 5.474.981; Gillies *et al.*, *PNAS* 89:1428-1432 (1992); Fell *et al.*, *J. Immunol.* 146:2446-2452 (1991).

60 La presente divulgación incluye de manera adicional composiciones que comprenden los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo aquellos que comprenden un epítipo inmunogénico o antigénico) fusionado o conjugado a secuencias polipeptídicas heterólogas (por ejemplo dominios de anticuerpo diferentes de las regiones variables). Por ejemplo, los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden fusionar o conjugar a una región Fc de anticuerpo o porción de la misma. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención (que incluyen fragmentos o variantes de los mismos) se pueden fusionar con el dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM) o porciones de las mismas (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} o cualquier combinación de las mismas y porciones de las mismas, que

resulten en polipéptidos quiméricos. La porción de anticuerpo fusionada a un polipéptido de la presente invención puede comprender la región constante, región de bisagra, dominio C_{H1}, dominio C_{H2} y dominio C_{H3} o cualquier combinación de todos los dominios o porciones de las mismas. Los polipéptidos también se pueden fusionar o conjugar a las porciones de anticuerpo anteriores para formar multímeros. Por ejemplo, las porciones Fc fusionadas a los polipéptidos de la presente invención pueden formar dímeros a través de unión disulfuro entre las porciones Fc. Se pueden producir formas multiméricas superiores al fusionar los polipéptidos a porciones de IgA e IgM. Los procedimientos para fusionar o conjugar los polipéptidos de la presente invención a porciones de anticuerpo se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 5.336.603; 5.622.929; 5.359.046; 5.349.053; 5.447.851; 5.112.946; EP 307.434; EP 367.166; publicaciones PCT WO 96/04388; WO 91/06570; Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Zheng et al., J. Immunol. 154:5590-5600 (1995) y Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341 (1992). A manera de otro ejemplo no limitante, los polipéptidos y/o anticuerpos descritos en el presente documento (que incluyen fragmentos o variantes de los mismos) se pueden fusionar con albúmina (que incluye pero que no se limita a albúmina sérica humana recombinante o fragmentos o variantes de los mismos (véanse, por ejemplo, patente de EE.UU. número 5.876.969, expedida el 2 de marzo de 1999, la patente EP 0 413 622 y la patente de EE.UU. número 5.766.883 expedida el 16 de junio de 1998). Los polipéptidos y/o anticuerpos descritos en el presente documento (que incluyen fragmentos o variantes de los mismos) se pueden fusionar ya sea al extremo N o C terminal de la proteína heteróloga (por ejemplo el polipéptido Fc de inmunoglobulina o el polipéptido de albúmina sérica humana). Los polinucleótidos que codifican para proteínas de fusión también están descritos en el presente documento.

Como se describe en lo que antecede, los polipéptidos de la presente divulgación se pueden fusionar o conjugar a las porciones de anticuerpo anterior para incrementar la vida media *in vivo* de los polipéptidos o para uso en inmunoanálisis utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Además, los polipéptidos de la presente divulgación se pueden fusionar o conjugar a las porciones de anticuerpo anteriores para facilitar la codificación. Un ejemplo presentado describe proteínas quiméricas que consisten de los primeros dos dominios y el polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas de mamífero (véase, por ejemplo EP 394,827; Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988)). El suministro mejorado del antígeno a través de la barrera epitelial del sistema inmunitario se ha demostrado por antígenos (por ejemplo insulina) conjugado a un asociado de unión FcRn tal como los fragmentos IgG o Fc (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 96/22024 y WO 99/04813). Los polipéptidos de la presente divulgación fusionados o conjugados a un anticuerpo que tiene estructuras dimericas unidas a disulfuro (debido a la IgG) también pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas, en comparación con la proteína secretada monomérica o el fragmento proteínico solo (Fountoulakis et al., J. Biochem. 270:3958-3964 (1995)). En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es benéfica en el tratamiento y diagnóstico y por lo tanto puede resultar, por ejemplo, en propiedades farmacocinéticas mejoradas (EP A 232.262). De manera alternativa, se puede desear la supresión de la parte Fc después de que la proteína de fusión se ha expresado, detectado y purificado. Por ejemplo, la porción Fc puede impedir el tratamiento y el diagnóstico si la proteína de fusión se utiliza como un antígeno para inmunizaciones. En el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, se han fusionado proteínas humanas tales como hIL-5 con porciones Fc con el propósito de análisis de cribado de alto rendimiento para identificar antagonistas de hIL-5. (Véase D. Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995); K. Johanson et al., J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995). Las técnicas también incluyen, pero no se limitan al uso de agentes de conjugación bifuncionales (véase por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 5.756.065; 5.714.631; 5.696.239; 5.652.361; 5.505.931; 5.489.425; 5.435.990; 5.428.139; 5.342.604; 5.274.119; 4.994.560 y 5.808.003.

Además, los polipéptidos de la divulgación (por ejemplo anticuerpos o fragmentos de los mismos) se pueden fusionar a secuencias marcadoras tales como un péptido para facilitar su purificación. En una realización adicional los ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos (incluyen, pero no se limitan a ácidos nucleicos que codifican para epítomos inmunogénicos y/o antigénicos) también se pueden combinar con un gen de interés como una etiqueta de epítomo (por ejemplo la etiqueta hamaglutinina ("HA") o la etiqueta indicadora o de bandera) para ayudar a la detección y purificación del polipéptido expresado. En realizaciones preferentes, la secuencia de aminoácidos marcadora es hexapéptido histidina tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eto Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1998), por ejemplo, la hexahistidina proporciona la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para purificación incluyen, pero no se limitan a la etiqueta "HA", la cual corresponde a un epítomo derivado de la proteína de hemaglutinina de influenza (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) y la etiqueta "indicadora".

La presente divulgación abarca además moléculas de unión IL-31 o antagonistas de IL-31 conjugados a un agente de diagnóstico o terapéutico. Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 se pueden utilizar de manera diagnóstica, por ejemplo, para monitorear el desarrollo o progreso de un tumor como parte de un procedimiento de prueba clínica para, por ejemplo, determinar la eficacia de un tratamiento, diagnóstico, detección y/o régimen de prevención, dados. La detección se puede facilitar por acoplamiento de anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. número 4.741.900 para iones metálicos los cuales se

pueden conjugar a anticuerpos para uso como material de diagnóstico, de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuados incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuado incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

Además, las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 se pueden conjugar a una porción terapéutica tal como una citotoxina, por ejemplo un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion de metal radioactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen pero no se limitan a antimetabólitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descabazina), agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cisplatino de cis-diclorodiamina platino (II) (DDP)), antraciclinas (por ejemplo daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo vincristina y vinblastina).

Los conjugados que se divulgan en el presente documento se pueden utilizar para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o la porción de fármaco no se construye como limitada a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Las proteínas pueden incluir, por ejemplo una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *pesudomonas* o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferón A, interferón β , factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucinas-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 también se pueden unir a soportes sólidos los cuales son particularmente útiles para inmunoanálisis o purificación del antígeno objetivo. Los soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a vidrio, celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Las técnicas para conjugación de la porción terapéutica a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Residfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982).

De manera alternativa, las moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 se pueden conjugar a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe por Segal, en la patente de EE.UU. número 4.676.980.

Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31, con o sin una protección terapéutica conjugada al mismo, administrados solos o en combinación con uno o varios factores citotóxicos y/o una o varias citocinas se pueden utilizar como una sustancia terapéutica.

Diversos análisis conocidos por aquellos expertos en la técnica se pueden utilizar para detectar la unión de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 a proteínas o polipéptidos de IL-31. Los análisis ejemplares se describen con detalle en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (Eds.), Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de los análisis incluyen: inmunoelectroforesis concurrente, radioinmunoanálisis, radioinmunoprecipitación, análisis inmunosorbente unido a enzima (ELISA), punto y mancha (dot lot) o análisis de transferencia Western, análisis de inhibición o competencia y análisis de tipo emparejado. Además, los anticuerpos se pueden cribar para unión a una proteína o polipéptido de IL-31 de tipo silvestre, en comparación con un mutante.

Las moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 a IL-31 se pueden utilizar para dirigir células que expresen IL-31; para aislar IL-31 por purificación de afinidad; para análisis de diagnóstico para determinar concentraciones

circulantes de polipéptidos de IL-31; para detectar o cuantificar IL-31 soluble como un marcador de la patología o enfermedad subyacente; en procedimientos analíticos que utilizan FACS; para cribado de bibliotecas de expresión; para generar anticuerpos anti-idiotípicos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear la actividad de IL-31 *in vitro e in vivo*. Las etiquetas o marcas directas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; las etiquetas o marcas indirectas pueden describir el uso de biotina-avidina u otros pares complemento-anticomplemento como intermediarios. Los anticuerpos en el presente documento también se pueden conjugar directa o indirectamente a fármacos, toxinas, radionúclidos y similares y estos conjugados se utilizan para diagnóstico *in vivo* o aplicaciones terapéuticas. Además, los anticuerpos para IL-31 o fragmentos de los mismos se pueden utilizar *in vitro* para detectar IL-31 desnaturalizado o fragmentos de los mismos o análisis, por ejemplo, transferencia Western u otros análisis conocidos en la técnica.

La elección del dominio Fc puede tener implicaciones en (i) las funciones efectoras del anticuerpo (unión Fc γ R (ADCC) / unión Clq (CDC)) y efectos secundarios potencialmente asociados, (ii) sus propiedades farmacocinéticas (unión de FcRn) que incluye vida media y (iii) posiblemente sobre la depuración de complejos inmunitarios. Una o más funciones efectoras del dominio Fc incluyen fagocitosis, liberación de mediadores inflamatorios, regulación de producción de anticuerpo y lo que es más importante, citotoxicidad mediada por células, dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). El grado con el cual cualquiera de estas funciones efectoras se induce depende de la interacción del dominio Fc con los mediadores de proteína relevante, los receptores Fc γ y Clq y difiere en base en las regiones constantes (Fc) de la subclase IgG y su interacción con estas proteínas.

El dominio Fc de IgG1 interactúa con Fc γ RI, Fc γ RIIa y Fc γ RIII sobre células efectoras del sistema inmunitario. El papel preciso de los diferentes receptores Fc γ aún está por dilucidarse pero se considera que Fc γ RIIIa es el receptor mediador de ADCC más importante que se expresa principalmente en células NK pero también en monocitos y macrófagos. IgG1 también se une a Clq y puede activar CDC el cual es mediado principalmente por células NK que expresan Fc γ RIII. Véase Gessner, J. E., et al., The IgG Fc Receptor Family, *Ann. Hematol.* 1998 Jun;76(6):231-248. El dominio Fc de IgG4 ha reducido en gran medida la afinidad de unión a diferentes receptores Fc γ y Clq, que corresponden a ADCC y CDC reducidos. Por ejemplo, Sharma et al. examinan una comparación directa de un mAb IgG1 y su derivado IgG4, cada uno con regiones variables idénticas dirigidas a CD4. Ambos mAb disminuyen la expresión de CD4 en niveles de dosis iguales y tienen propiedades farmacocinéticas equivalentes, pero la forma IgG1 muestra un efecto ADCC más potente. Véase Sharma A., et al., Comparative pharmacodynamics of keliximab and clenoliximab in transgenic mice bearing human CD4. *JPharmacol Exp Ther.* 2000 Apr;293(1):33-41.

La afinidad de unión del mAb IgG4 negativo efector se reduce en gran medida si no se suprime cuando se compara con otros mAb de isotipo IgG. No obstante, la capacidad de interactuar con un receptor Brambell (FcRn) se retiene en IgG4 y por lo tanto afecta la farmacocinética del mAb isotipo IgG4 a través de una vida media aumentada. Aunque IgG1 generalmente muestra una actividad alta tanto para ADCC como para CDC, se considera que IgG4 tiene una actividad baja o nula de ADCC o CDC.

Varios ejemplos de los mAb isotipo IgG4 que están en el mercado, en la clínica o en diversas etapas de investigación y desarrollo. Estos mAb terapéuticos se desarrollan para varias indicaciones en oncología, autoinmunidad e inflamación así como tratamiento antiviral.

Como se informa por Aalberse et al., (véase Aalberse RC, Schuurman, J. IgG4 breaking the rules, *Immunology* 202, 105: 9-19), existe IgG4 humana en dos formas moleculares debido a la heterogeneidad de los puentes disulfuro entre cadena pesada en la región de bisagra en una porción de IgG4 humana secretada. Esta heterogeneidad se muestra únicamente bajo condiciones de desnaturalización, no reductoras en las cuales se detectan un "semi anticuerpo" HL, un fenómeno que no se observa en otros isotipos IgG humanos. Taylor informa que los fenómenos de alteración por observación durante el manejo de muestras tal como revoltura rápida disulfuro y reoxidación por exposición a reductor pueden contribuir a la cantidad de semianticuerpo presente (Taylor FR, et al., Suppression of Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Sample Preparation Artifacts for Analysis of IgG4 Half-Antibody. *Analytical Biochemistry* 2006, 353: 204-208). Bajo condiciones nativas, las interacciones no covalentes aseguran que el anticuerpo se mantiene junto como el tetrámero H2L2. Así, se ha informado que IgG4 heterodimeriza con otras moléculas de IgG4 en circulación. El análisis de las secuencias de bisagra que conectan las porciones F[ab] y Fc del anticuerpo de las cadenas pesada de IgG humana sugieren que la presencia de serina en el residuo 241 puede ser la causa de heterogeneidad: la región de bisagra IgG4 contiene una secuencia Cys-Pro-Ser-Cys en vez de una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys, como en IgG1. El cambio de serina en 241 a prolina (que se encuentra en esa posición en IgG1 e IgG2) en la cadena pesada quimérica de ratón/humano genera la producción de un anticuerpo homogéneo y suprime la heterogeneidad. Además, las IgG4 variante tiene una vida media en suero significativamente extendida y muestra una distribución mejorada de tejido en comparación con la IgG4 quimérica original.

Las moléculas detectables adecuadas se pueden unir directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo e incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores

quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas pueden unirse directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo e incluyen toxinas bacterianas o vegetales (por ejemplo de difteria, toxina saporina, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y similares), así como los radionúclidos terapéuticos tales como yodo-131, renio-188 o itrio-90 (ya sea unido directamente al polipéptido o anticuerpo, o unido indirectamente por medio de una porción quelante, por ejemplo). Los polipéptidos o anticuerpos también se pueden conjugar a fármacos citotóxicos tales como adriamicina. Para unión indirecta de una molécula detectable o citotóxica, la molécula detectable o citotóxica se puede conjugar con un miembro de un par complementario/anticomplementario, en donde el otro miembro se une a la porción polipeptídica o de anticuerpo. Para estos propósitos. La biotina/estreptavidina es un par ejemplar complementario/anticomplementario.

Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 también pueden actuar como "antagonistas" de IL-31 para bloquear la unión de IL-31 y transducción de señal *in vitro* e *in vivo*. Estas moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 pueden ser útiles para inhibir la actividad o la unión a proteína de IL-31.

Las proteínas de fusión polipéptido-toxina o proteínas de fusión anticuerpo-toxina se pueden utilizar para dirigir células o para inhibición o extirpación de tejido (por ejemplo para tratar células o tejidos cancerígenos). De manera alternativa, si el polipéptido tiene dominios funcionales múltiples (es decir, un dominio de activación o un dominio de unión a receptor más un dominio objetivo), una proteína de fusión que incluye únicamente el dominio objetivo pueden ser adecuados para dirigir una molécula detectable, una molécula citotóxica o una molécula complementaria a una célula o tipo de tejido de interés. En casos en donde el dominio únicamente de la proteína de fusión incluye una molécula complementaria, la molécula anticomplementaria se puede conjugar a una molécula detectable o citotóxica. La proteína de fusión de dominio-molécula complementaria por lo tanto representa un portador objetivo genérico o vehículo para el suministro específico para célula/tejido de conjugados detectables por anticomplementariedad/moléculas citotóxica, genéricos.

La invención proporciona un polinucleótido aislado como se define las reivindicaciones. La divulgación proporciona adicionalmente una molécula aislada de ácido nucleico que codifica para cualquiera de los anticuerpos descritos en lo anterior o en lo que sigue o una cadena complementaria o secuencia degenerada de la misma. A este respecto, el término "molécula de ácido nucleico" abarca todos los tipos diferentes de ácidos nucleicos que incluyen, sin limitación, ácidos desoxirribonucleicos "por ejemplo ADN, ADNc, ADNg, ADN sintético, etc.), ácidos ribonucleicos (por ejemplo ARN, ARNm, etc.), y ácidos peptidonucleicos (PNA). En una realización preferente, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN tal como una molécula de ADN de cadena doble o una molécula de ADNc. El término aislado significa moléculas de ácido nucleico que han sido identificadas y separadas de por lo menos una molécula contaminante de ácido nucleico con la cual habitualmente se asocia en la fuente natural. Una molécula aislada de ácido nucleico es diferente en forma o ámbito en el cual se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas aisladas de ácido nucleico se diferencian de una molécula específica de ácido nucleico como existen en las células naturales. Una secuencia degenerada designa cualquier secuencia nucleotídica que codifica para la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia nucleotídica de referencia pero que comprende una secuencia nucleotídica distinta como un resultado de la degeneración de código genético.

La invención proporciona un vector de expresión como se define en las reivindicaciones. La divulgación proporciona adicionalmente un vector que comprende ADN que codifica para cualquiera de los anticuerpos descritos en lo anterior o a continuación. El vector puede ser cualquier vector de clonación o expresión, que se replique de manera integral o autónoma, funcional en cualquier célula procariótica o eucariótica. En particular, el vector puede ser un plásmido, cósmido, virus, fago, episoma, cromosoma artificial y similar. El vector puede comprender elementos reguladores tales como un promotor, terminador, mejorador, marcador de selección, origen de replicación, etc. Los ejemplos específicos de los factores incluyen plásmidos procarióticos tales como los plásmidos pBR, pUC o pcDNA; vectores virales que incluyen vectores retrovirales, adenovirales o AAV; bacteriófagos; baculovirus; BAC o YAC, etc., como se describirá a continuación. La secuencia apropiada de ácido nucleico se puede insertar en el vector por diversos procedimientos. En general, el ADN se inserta en uno o varios sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en la técnica. La construcción de los vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utilizando técnicas de ligación estándar o convencionales las cuales son conocidas por los expertos en la técnica.

Un aspecto adicional de la presente invención es una célula cultivada como se define en las reivindicaciones. La divulgación proporciona una célula hospedadora recombinante, en donde la célula comprende una molécula de ácido nucleico o un vector como se define en lo anterior. La célula hospedadora puede ser una célula procariótica o eucariótica. Los ejemplos de células procarióticas incluyen bacterias tales como *E. coli*. Los ejemplos de células eucarióticas son células de levadura, células vegetales, células de mamífero y células de insecto que incluyen cualquier cultivo de célula primaria o línea de células establecidas (por ejemplo 3T3, Véro, HEK293, TN5, etc.). Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de proteínas glucosiladas se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9 así como células vegetales. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster Chino (CHO) y COS. Los ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea del riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977));

células de ovario de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1989)); células sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)), células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75), células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065) y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL5 1). Las células de mamífero preferentes particularmente de la presente invención son células CHO.

Como se divulga en el presente documento con anterioridad, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden producir por cualquier técnica conocida *per se* en la técnica por ejemplo por tecnologías recombinantes, síntesis química, clonación, ligaciones o combinaciones de los mismos. En una realización particular, los anticuerpos se producen por tecnologías recombinantes, por ejemplo por expresión de un ácido nucleico correspondiente en una célula hospedador adecuada. Otro objetivo de esta invención por lo tanto es un procedimiento para producir un anticuerpo de la presente divulgación (como se define en las reivindicaciones), el procedimiento comprende cultivar una célula hospedadora recombinante de la invención bajo condiciones que permiten la expresión de la molécula de ácido nucleico y recuperar el polipéptido producido. El polipéptido producido se puede glucosilar o no, o puede contener otras modificaciones postraduccionales en base en el tipo de célula hospedadora utilizada. Muchos libros y revistas proporcionan enseñanzas de como clonar y producir proteínas recombinantes utilizando vectores y células hospedadoras procarióticas o eucarióticas, algunos de los títulos de la serie "A Practical Approach" publicada por Oxford University Press ("DNA Cloning 2: Expression System", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996, "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001).

Los vectores que se van a utilizar en el procedimiento para producir un anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden ser vectores de integración episómicos o no/homólogos, los cuales se pueden introducir en las células hospedadoras apropiadas por cualquier medio adecuado (transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, etc.). Los factores importantes para seleccionar un plásmido particular, un vector viral o retroviral incluyen: la facilidad con la cual las células del receptor que contienen al vector se pueden reconocer y seleccionar de las células receptoras las cuales no contienen el vector; el número de copias del vector las cuales se desean en un hospedador particular; y si es deseable tener que "lanzar" el vector entre células hospedadoras de especies diferentes. Los vectores deben permitir la expresión de polipéptido o las proteínas de fusión de la invención en células hospedadoras procarióticas o eucarióticas, bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas de inicio transcripcional/terminación, las cuales se seleccionan para ser activas constitutivamente o inducibles en la célula. Una línea de células sustancialmente enriquecida en las células se puede aislar después para proporcionar una línea de células estables.

Las células hospedadoras se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en el presente documento para producción de proteínas y se cultivan en medio nutritivo convencional verificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican para las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo tales como el medio, temperatura, pH y similares se pueden seleccionar por una persona experta en la técnica sin experimentación indebida. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se puede encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook et al., *supra*.

Las células preferentes para ser utilizadas en la presente invención son células hospedadoras eucarióticas, por ejemplo células de mamífero tales como células de humano, mono, ratón y de ovario de hámster Chino (CHO,), debido a que proporcionan modificaciones postraduccionales a las moléculas de proteína que incluyen una naturalización o plegado correcto o glucosilación en los sitios correctos. Los ejemplos de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen las células de riñón de mono verde Africano (Vero; ATCC CRL 1587), las células de riñón embrionarias humanas (293-HEK; ATCC CRL 1573), células de riñón de hámster bebé (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células de riñón de perro (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovario de hámster Chino (CHO-K1, ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin et al., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986)), células de hipófisis de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-11-E; ATCC CRL 1548), células de riñón de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650), melanoma de Bowes y carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo Hep G2), células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658) y numerosas otras líneas de células. De manera alternativa, las células hospedadoras eucarióticas son células de levadura (por ejemplo *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, etc.), transformadas en vectores de expresión en levadura. Las células de levadura también pueden llevar a cabo modificaciones peptídicas postraduccionales que incluyen glucosilación. Existen numerosas estrategias de ADN recombinante las cuales utilizan secuencias promotoras fuertes y un número de copias elevado de plásmidos que se pueden utilizar para producción de las proteínas deseadas en levadura. Las células de levadura reconocen secuencias libres en productos de gen de mamífero clonados y secretan secuencias libres que portan los polipéptidos (es decir, prepéptidos).

Para producción de alto rendimiento y a largo plazo de un polipéptido recombinante, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo las líneas de células las cuales expresan de manera estable el polipéptido de interés se pueden transformar utilizando vectores de expresión los cuales pueden contener orígenes de replicación virales y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable sobre el mismo vector o uno separado. Después de la introducción del vector se puede permitir que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambian a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresen con éxito

las secuencias introducidas. Los clones resistentes de células transformadas de manera estable se pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo de tejido apropiadas al tipo de célula. Una línea de células sustancialmente enriquecida en las células se puede aislar después para proporcionar una línea de células estable.

- 5 Un procedimiento particularmente preferente de la invención de producción de alto rendimiento de un polipéptido recombinante es mediante el uso de amplificación con dihidrofolato reductasa (DHFR) en células CHO deficientes en DHFR mediante el uso de concentraciones sucesivamente mayores de metotrexato como se describe en la patente de EE.UU. 4.889.803. El polipéptido que se obtenga puede estar en forma glucosilada.
- 10 Los anticuerpos divulgados en el presente documento también se pueden expresar en otras células eucarióticas tales como células de aves, hongos, insectos, levaduras o plantas. El sistema de baculovirus proporciona un medio eficaz para introducir genes clonados en células de insecto. Los materiales para sistemas de expresión de baculovirus/célula de insecto están disponibles comercialmente en forma de equipo, por ejemplo de Invitrogen.
- 15 Además de las tecnologías de ADN recombinante, los anticuerpos de esta invención se pueden preparar por tecnologías de síntesis química. Los ejemplos de tecnologías de síntesis química son síntesis en fase sólida y síntesis en fase líquida. Como una síntesis en fase sólida, por ejemplo el aminoácido que corresponde a la parte carboxi terminal del polipéptido que se va a sintetizar se une a un soporte el cual es insoluble en solventes orgánicos y, por repetición alternada de reacciones (por ejemplo por condensación secuencial de aminoácidos con sus grupos amino y grupos funcionales de cadena lateral protegidos con grupos protectores apropiados), se extiende la cadena polipeptídica. Los procedimientos de síntesis en fase sólida se clasifican principalmente por el procedimiento tBoc y el procedimiento Fmoc, dependiendo del tipo de grupo protector utilizado. Las proteínas de síntesis total se describen en la literatura (Brown A et al., 1996).
- 20
- 25 Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden producir, formular, administrar o usar genéricamente en otras formas alternativas que se pueden preferir de acuerdo con el procedimiento de uso y/o producción deseados. Las proteínas de la divulgación pueden ser modificadas postraduccionalmente como por ejemplo por glucosilación. Los polipéptidos o proteínas divulgados en el presente documento se pueden proporcionar en forma aislada (o purificada) biológicamente activa o como precursores, derivados y/o sales de los mismos.
- 30
- 35 En otra realización, las moléculas de unión de IL-31 o las proteínas de fusión de antagonistas de IL-31 se pueden utilizar para destrucción *in vivo* de tejidos objetivo en donde se expresan receptores de IL-31 (véase de manera general Hornick et al., Blood 89:4437-47, 1997). Las proteínas de fusión descritas habilitan en direccionamiento de moléculas de unión IL-31 o antagonistas IL-31 en el sitio de acción deseado, por lo que se proporciona una concentración local elevada de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31, dirigidos hacia una célula o tejidos indeseables (es decir, un tumor o una leucemia) y lisis de la célula objetivo, mejorada y mediada por citocina fusionada, por parte de las células efectoras. Las citocinas adecuadas para este propósito incluyen interleucina 2 y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) por ejemplo.
- 40
- 45 Las moléculas que se unen a IL-31 o los antagonistas de IL-31 de la presente divulgación se pueden medir por su capacidad para inhibir, bloquear o neutralizar el ligando de IL-31, como se determina por varios modelos *in vivo* conocidos en la técnica y descritos en el presente documento que incluyen, pero que no se limitan a modelo NC/Nga, el modelo epicutáneo Ova, el modelo de hipersensibilidad crónica y el modelo de hapteno crónico.
- 50
- 55 Tanto los linfocitos T con ecotaxia hacia la piel como los queratinocitos epidérmicos se han implicado en la patología de enfermedades cutáneas en humanos. El ARNm para IL-31 y la expresión de proteína se limita a la población de linfocitos T CLA+ con ecotaxia hacia la piel en humanos. Véase la solicitud de patente de EE.UU. número 11/353,427 presentada el 14 de febrero de 2006. Como tal, un antagonista para IL-31, que incluye un anticuerpo o antagonista receptor, será útil para tratar enfermedades cutáneas y epidérmicas las cuales tengan expresión de linfocitos T CLA+. Las enfermedades incluyen, por ejemplo, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, reacciones alérgicas inducidas por fármacos, virus trópicos para la piel y prurito asociado a virus, vitiligo, linfoma de linfocitos T cutáneo, alopecia aerata, acné, rosácea, acné vulgar, prurito nodular y penfigoide buloso. Los marcadores de quimiocina tales como TARC y MDC son útiles para medir el efecto de un anticuerpo monoclonal neutralizante para IL-31. Los efectos inhibidores de tratamiento con moléculas que se unen a IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento se pueden medir al monitorear los niveles de TARC Y MDC.

Dermatitis de contacto

- 60 Las dermatitis de contacto alérgica se define como una reacción inmunitaria mediada por linfocitos T a un antígeno que se pone en contacto con la piel. La población de linfocitos T CLA+ se considera involucrada en el inicio de dermatitis dado que las respuestas de linfocitos T dependientes de alérgeno se confinan en gran medida a la población de células CLA+ (véase Santamaria-Babi, L.F., et al., J. Exp Med:181, 1935 (1995)). Datos recientes han encontrado que solo los linfocitos T de memoria (CD45RO+) CD4+CLA+ y no CD8+, proliferan y producen citocinas tipo-1 (IFN-) y tipo 2 (IL-5) en respuesta a níquel, un alérgeno común de hipersensibilidad de contacto común.
- 65 Además, las células que expresan CLA en combinación con CD4, CD45RO (memoria) o CD49 aumentan después de estimulación específica con níquel y expresan los receptores de quimiocina (CXCR3, CCR4, CCR10, pero no

CCR6. Véase Moed H., et al., *kBr J Dermatol*:51, 32 (2004).

En modelos en animales se ha demostrado que la dermatitis de contacto alérgica depende de linfocitos T y que los linfocitos T que responden de manera alérgica se desplazan al sitio de aplicación del alérgeno. Véase de manera general: Engeman T.M., et al., *J Immunol*: 164, 5207, (200); Ferguson T.A. & Kupper T.S. *J Immunol*: 150, 1172, (1993); y Gorbachev A.V. & Fairchild R.L. *Crit Rev Immunol*: 21, 425 (2001). Dado que los linfocitos T CLA+ producen IL-31 y la estimulación de IL-31 de queratinocitos en la piel puede inducir quimiocinas proinflamatorias tales como TARC y MDC, IL-31 puede estar involucrado en la fisiopatología de dermatitis de contacto. Mediante la utilización de un anticuerpo IL-31 neutralizante en un modelo en ratón de hipersensibilidad de contacto. Véase el ejemplo 5.

De esta manera, la neutralización de IL-31 por las moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento se pueden utilizar para mejorar el resultado clínico de hipersensibilidad de contacto por inhibición, reducción, neutralización, prevención o bloqueo de la inflamación y/o el rascado asociado con la enfermedad.

Dermatitis atópica

La dermatitis atópica (AD) es una enfermedad cutánea inflamatoria con recaída crónica, con una incidencia que aumenta de manera perceptible en las últimas décadas. Clínicamente, la AD se caracteriza por placas escoriadas con frecuencia altamente pruríticas y pápulas que muestran un curso de recaída crónica. El diagnóstico de AD se basa principalmente en hallazgos clínicos mayores y menores. Véase Hanifin J.M., *Arch Dermatol*: 135, 1551 (1999). La histopatología muestra espongiosis, paraqueratosis hiper y focal, en lesiones agudas mientras que la hiperplasia epidérmica marcada con hiper y paraqueratosis, acantosis/hipergranulosis e infiltración perivascular de la dermis con linfocitos y mastocitos abundantes son los factores distintivos de lesiones crónicas.

Los linfocitos T juegan un papel central en el inicio de las respuestas inmunitarias locales en tejidos y las pruebas sugieren que los linfocitos T que se infiltran en la piel, en particular, pueden jugar un papel clave en el inicio y mantenimiento de respuestas inmunitarias no reguladas en la piel. Aproximadamente 90 % de los linfocitos T que se infiltran en sitios inflamatorios cutáneos expresan el Ag asociado a linfocito cutáneo (CLA+) el cual une E-selectina, una molécula de adhesión inducible en el endotelio (revisado en Santamaria-Babi, L.F., et al., *Eur J Dermatol*: 14, 13, (2004)). Un incremento significativo en los linfocitos T CLA+ circulantes entre pacientes con AD, en comparación con individuos control ya ha sido documentado (Véase Teraki, Y., et al., *Br J Dermatol*: 143, 373 (2000), mientras que otros han demostrado que los linfocitos T CLA+ de memoria de pacientes con AD responden de manera preferencial a extractos de alérgeno en comparación con una población CLA- (véase Santamaria-Babi, L.F., et al., *J Exp Med*: 181, 1935, (1995)). En los humanos, la patogénesis de trastornos atópicos de la piel se ha relacionado con incrementos en los linfocitos T CLA+ que expresan niveles aumentados de citocinas tipo Th-2 como IL-5 e IL-13, 9 y 10. Véase Akdis M., et al., *Eur J Immunol*: 30, 3533 (2000); y Hamid Q., et al., *J Allergy Clin Immunol*: 98, 225 (1996).

Los ratones NC/Nga desarrollan de manera espontánea lesiones similares a AD que son paralelas a la AD humana en muchos aspectos que incluyen el curso clínico y los signos, la histopatología e inmunopatología cuando se alberga en condiciones libre de patógenos no especificado (no-SPF,) aproximadamente a las 6-8 semanas de edad. En contraste, los ratones NC/Nga que se mantienen bajo condiciones de SPF no desarrollan lesiones cutáneas. No obstante, el inicio de lesiones cutáneas espontáneas y el comportamiento de rascado se pueden sincronizar en ratones NC/Nga albergados en una instalación SPF mediante inyecciones transdérmicas semanal de antígeno crudo de polvo de ácaro. Véase Matsuoka H., et al., *Allergy*: 58, 139 (2003). Por lo tanto, el desarrollo de AD en NC/Nga es un modelo útil para la evaluación de sustancias terapéuticas novedosas para el tratamiento de AD.

Además del modelo en NC/Nga de AD espontánea, también se puede utilizar la sensibilización epicutánea de ratones utilizando Ova como un modelo para inducir engrosamiento epidérmico y dérmico, dependiente de antígeno, con un filtrado mononuclear en piel de ratones sensibilizados. Esto habitualmente coincide con concentraciones séricas elevadas de IgE total y específico, no obstante, normalmente no se produce disfunción de la barrera o prurito en este modelo. Véase Spergel J.M., et al., *J Clin Invest*, 101:1614 (1998). Este procedimiento se puede modificar con el fin de inducir una falta de regulación en la barrera cutánea y prurito al sensibilizar ratones transgénicos DO11.10 OVA TCR con OVA. Un incremento en el número de linfocitos T específicos para antígeno que pueden reconocer el antígeno sensibilizante puede aumentar el nivel de inflamación en la piel para inducir un comportamiento visible de rascado y formación de líquen/escamas de la piel.

Tanto el modelo de AD espontánea en NC/Nga como el modelo de DO11.10 epicutánea por OVA se utilizan para evaluar la capacidad de las moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento para inhibir, reducir o neutralizar los efectos de IL-31. La administración de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 puede resultar en una reducción en el rascado que sea eficaz para tratar enfermedades pruríticas que incluyen, pero que no se limitan a dermatitis atópica, prurito nodular y eczema, dado que el cese del rascado detendrá el progreso de dermatitis, cuyo desarrollo depende del rascado.

Los modelos adicionales para medir los efectos inhibidores de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento y descritos por Umeuchi, H. et al., *European Journal of Pharmacology*, 518: 133-139, 2005; y por Yoo, J. et al., *J. Experimental Medicine*, 2002:541-549, 2005.

- 5 De esta manera, la neutralización de IL-31 por moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento se puede utilizar para mejorar el resultado clínico de dermatitis y enfermedades pruríticas que incluyen dermatitis atópica, prurito nodular y eczema por inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o el rascado asociado con la enfermedad.

10 Reacciones alérgicas cutáneas de tipo retrasado inducidas por fármacos

Las reacciones alérgicas cutáneas de tipo retrasado inducidas por fármacos son muy heterogéneas y pueden reflejar muchos eventos fisiopatológicos distintos. Véase Brockow K., et al., *Allergy*: 57, 45 (2002). Se ha demostrado que los mecanismos inmunológicos involucrados en estas reacciones están dañados por anticuerpos o células. En 15 alergia inmediata a fármacos se puede demostrar una reacción de anticuerpo mediada por IgE por un parche cutáneo positivo y/o una prueba intradérmica después de 20 min, mientras que las reacciones no inmediatas a fármacos se pueden presentar más de una hora después de la última ingestión del fármacos y con frecuencia son mediadas por linfocitos T. Las reacciones de tipo retrasadas mediadas por linfocitos T no inmediatas se pueden presentar en pacientes con reacciones adversas, reacciones a fármacos adversas, por ejemplo a las penicilinas. Se ha demostrado que las respuestas a linfocitos T proliferativos a penicilina se limitan a la subpoblación de memoria (CD45RO+)CLA+ de linfocitos T a partir de pacientes alérgicos a penicilina mientras que el subconjunto CD45RO+CLA- no muestra respuesta proliferativa. Véase Blanca M., Leyva L., et al., *Blood Cells Mol Dis*:31, 75 (2003). Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retrasado (DTH) se pueden reproducir artificialmente en ratones, lo que permite la determinación de factores que pueden estar involucrados en el inicio y perpetuación de la 20 respuesta DTH. La neutralización de IL-31 por moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 puede ser eficaz en reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado.

La necrólisis epidérmica tóxica (TEN) es una reacción a fármacos muy rara pero extremadamente grave caracterizada por apoptosis diseminada de epidermis con ampollas extensas. Los estudios han demostrado que los 30 linfocitos que se infiltran en las ampollas son linfocitos T CLA+ y pueden mostrar citotoxicidad hacia queratinocitos epidérmicos, Véase Leyva L., et al., *J Allergy Clin Immunol*: 105, 157 (2000); y Nassif A., Bensussan A., et al., *J Allergy Clin Immunol*: 114, 1209 (2004). Se ha generado un sistema de ratón transgénico, por el cual se expresa OVA bajo el control del promotor queratina-5 (K5) en la epidermis y queratinocitos foliculares pilosos de ratones para establecer un modelo en animales para TEN. Los linfocitos T CD8+ específicos para OVA, cuando se transfieren de 35 manera adoptada a ratones K5-Ova, experimentan activación y proliferación en los nódulos linfáticos que drenan a la piel y que se dirigen a la piel de ratones K5-OVA, lo que resulta en desarrollo de lesiones cutáneas que recuerdan a TEN. Véase Azukizawa H., et al., *Eur J Immunol*: 33, 1879 (2003).

De esta manera, la neutralización de IL-31 por moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en el 40 presente documento se pueden utilizar para mejorar el resultado clínico de TEN por inhibición, reducción, prevención o bloqueo de inflamación y/o rascado asociado con la enfermedad.

Penfigoide buloso

El penfigoide buloso es un trastorno subepidérmico el cual se manifiesta como ampollas subepidérmicas con un 45 filtrado dérmico de neutrófilos y eosinófilos. El diagnóstico se caracteriza por la presencia de anticuerpos específico a antígeno contra proteínas de adhesión específicas de la epidermis y la unión dérmica-epidérmica. Véase Jordon R.E., et al., *JAMA*: 2000, 751 (1967). Los estudios que analizan el papel de los linfocitos T en las patogénesis de penfigoide buloso por análisis de PBL y linfocitos T en ampollas cutáneas han encontrado una predominancia de 50 linfocitos T CLA+ que expresan niveles aumentados de citocinas Th2 como IL-4 e IL-13, Véase Teraki Y., et al., *J Invest Dermatol*: 117, 1097 (2001). En pacientes con penfigoide buloso que siguen el tratamiento con corticosteroides sistémicos la frecuencia de CLA+ pero no de CLA-, células productoras de interleucina-13 disminuye de manera significativa. La disminución en células CLA+ siguiendo el tratamiento con corticosteroides se relaciona con una mejoría clínica. Véase Teraki, *ibid*.

De esta manera, la neutralización de IL-31 por las moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en el 55 presente documento se puede utilizar para mejorar el resultado clínico de penfigoide buloso por inhibición, reducción, prevención o bloqueo de inflamación y/o rascado asociado con la enfermedad.

60 Alopecia areata

La alopecia areata (AA) se considera como una enfermedad autoinmunitaria limitada a tejido de los folículos pilosos en los cuales la actividad folicular se suprime debido a una actividad continua de infiltrados linfocíticos. La 65 enfermedad AA resulta en parches de pérdida completa de pelo en cualquier parte en el cuerpo, aunque la pérdida real de folículos pilosos no se produce, incluso en lesiones sin pelo. Aunque hay ausencia de signos clínicos de inflamación, las biopsias cutáneas de los sitios de enfermedad activa muestran inflamación linfocítica perifolicular de

células CD4+ principalmente junto con un infiltrado intrafolicular CD8+. Véase Kalish R.S. & Gilhar A. *J. Investig Dermatol Symp Proc*: 8, 164 (2003).

Los estudios han demostrado que la piel del cuero cabelludo que infiltra linfocitos CD4+ o CD8+ que expresan CLA, y sangre periférica de individuos con AA, el porcentaje de linfocitos CLA+, CD4+ o CD8+ es significativamente mayor que el de los controles normales. Además, los pacientes con AA grave o progresiva muestran una positividad CLA mucho mayor en comparación con pacientes que se recuperan de la enfermedad y una disminución en el porcentaje de células CLA+ paralelo a un curso clínico bueno. Véase Yano S., et al., *Acta Derm Venereol*: 82, 82 (2002). Por lo tanto, estos estudios sugieren que los linfocitos CLA+ pueden jugar un papel importante en AA. Los modelos de xenoinjerto han demostrado que los linfocitos T activados es probable que jueguen un papel en la patogénesis de AA. El cuero cabelludo con lesiones de pacientes con AA injertado en ratones atímicos hace crecer nuevamente el pelo, lo que concuerda con una pérdida de linfocitos infiltrados del injerto y transferencia de los linfocitos T activados por la lesión a ratones SCID pueden transferir la pérdida de pelo a explantes de cuero cabelludo humanos en ratones SCID. Véase Kalish R.S. & Gilhar A. *J Investig Dermatol Symp Proc*: 8, 164 (2003).

Diversos tratamientos inmunomoduladores son parte del tratamiento habitual para este trastorno, no obstante, ninguno de estos tratamientos ha sido consistente en cuanto a su eficacia. Véase Tang L., et al., *J Invest Dermatol*: 120, 400 (2003); Tang L., et al., (2004); y Tang L., et al., *J Am Acad Dermatol*: 49, 1013 (2003). No obstante, sus usos en modelos animales válidos proporcionan una herramienta para analizar los mecanismos moleculares de los efectos terapéuticos. Véase Shapiro J., et al., *J Investig Dermatol Symp Proc*: 4, 239 (1999); Tang L., et al., *Old wine in new bottles: reviving old therapies for alopecia areata using rodent models* (2003); y Verma D.D., et al., *Eur J Dermatol*: 14, 332 (2004).

De esta manera, la neutralización de IL-31 por moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento se pueden utilizar para mejorar el resultado clínico de alopecia areata por inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o rascado asociado con la enfermedad.

Acné rosácea/acné vulgar

El acné vulgar, trastorno del aparato pilosebáceo es el problema cutáneo más común de la adolescencia. Se considera que las anomalías en la queratinización folicular producen la lesión acneica. El acné rosácea se diferencia del acné vulgar por la presencia de pápulas rojas, pústulas, quistes y telangiectasias extensas, pero la ausencia de comedones (cabezas blancas). Una expresión aumentada de sebo de las glándulas sebáceas es un factor principal en la fisiopatología del acné vulgar. Otras funciones de las glándulas sebáceas también se relacionan con el desarrollo de acné, que incluye lípidos proinflamatorios sebáceos; diferentes citocinas producidas localmente; péptidos y neuropéptidos periglandulares tales como hormona liberadora de corticotropina la cual es producida por sebocitos; y sustancia P, la cual se expresa en las terminales nerviosas en la vecindad de glándulas con apariencia sana de pacientes con acné. Véase Zouboulis C.C. *Clin Dermatol*: 22, 360 (2004).

Aunque la fisiopatología del acné vulgar y el acné rosácea permanece desconocida, las observaciones clínicas y estudios histopatológicos sugieren que la inflamación del folículo pilosebáceo puede ser central a la patogénesis de rosácea y acné vulgar. Los estudios iniciales respecto al análisis subpoblaciones de linfocitos T que infiltran las lesiones rosáceas indican que la mayor parte de los linfocitos T expresan CD4. Véase Ruffi T. & Buchner S.A. *Dermatologica*: 169, 1 (1984).

Los linfocitos T CD4+ producen IL-31 y el análisis IHC en la piel para expresión de IL-31 sugiere que IL-31 se expresa en glándulas sebáceas y en sudor. La estimulación por IL-31 de queratinocitos epidérmicos induce la expresión de quimiocina lo cual probablemente resulte en infiltración celular lo que sugiere que IL-31 puede contribuir a la respuesta proinflamatoria en la piel. Véase Dillon S.R., et al., *Nat Immunol*: 5, 752 (2004). Por lo tanto, IL-31 puede contribuir a la fisiopatología de acné rosácea y acné vulgar.

Por lo tanto, se puede utilizar la neutralización de IL-31 por las moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento para mejorar el resultado clínico de acné vulgar por inhibición, reducción, prevención o bloqueo de inflamación y/o rascado asociado con la enfermedad.

Prurito nodular

El prurito nodular es una erupción de nódulos liquenificados o escoriados provocados por prurito intratable que es difícil de tratar. Aunque el frotado crónico resulta en liquenificación y el rascado en excoriaciones lineales los individuos que pellizcan y raspan su piel irritada y con prurito tienen a producir pápulas notablemente engrosadas conocidas como nódulos pruríticos. Aunque el prurito nodular no es específico de dermatitis atópica, muchos pacientes con estos nódulos también tienen una reacción atópica la cual se manifiesta como rinitis alérgica, asma o alergia a los alimentos. Los linfocitos T representan la mayor parte de células infiltrantes en lesiones pruríticas y estas lesiones con frecuencia representan la lesión cutánea más prurítica en pacientes con atopía.

El tratamiento tópico de prurito nodular con capsaicina, un alcaloide antiprurítico que interfiere con la percepción y la afección prurítica y el dolor al suprimir neuropéptidos con la sustancia P en nervios cutáneos sensitivos pequeños, ha demostrado ser un régimen eficaz e inocuo que resulta en eliminación de las lesiones cutáneas. Véase Stander S., et al., *J Am Acad Dermatol*: 44, 471 (2001). Los estudios de las respuestas de rascado en ratones NC/Nga utilizando tratamiento con capsaicina muestra que el desarrollo espontáneo de lesiones dermatíticas se evita casi de manera completa. Además, el incremento en las concentraciones séricas de IgE se suprime de manera significativa y los números eosinófilos y mastocitos que se infiltran en la piel con lesiones de ratones tratados con capsaicina se reducen. Véase Mihara K., et al., *Br J Dermatol*: 151, 335 (2004). Las observaciones para este grupo sugieren que el comportamiento de rascado puede contribuir al desarrollo por lo cual al aumentar diversas respuestas inmunitarias por lo cual se implica que la prevención de la sensación de rascado y/o el comportamiento de rascado asociado con prurito puede ser un tratamiento eficaz para AD. Véase Mihara K., et al., *Br J Dermatol*: 151, 335 (2004). De esta manera, los anticuerpos anti-IL-31 descritos en el presente documento serán útiles para minimizar los efectos de AD, prurito nodular y otras enfermedades pruríticas dado que se ha demostrado en el presente documento que reduce la cantidad de rascado en ratones NC/Nga.

El suministro crónico de IL-31 induce prurito y alopecia en ratones seguido por el desarrollo de lesiones cutáneas que recuerdan dermatitis lo que sugiere que IL-31 puede inducir prurito. Véase Dillon S.R., et al., *Nat Immunol*: 5, 752 (2004). La relación de IL-31 y la inducción de la respuesta de prurito por los dos procedimientos (i) tratamiento de capsaicina de ratones tratados con IL-31 y (ii) tratamiento con IL-31 de ratones con genes inactivados en la expresión del gen para Tac1, lo cual reduce de manera significativa la respuesta de dolor nociceptivo debido a la carencia de expresión de neuropéptidos, se prueba en el ejemplo 10. Además, cuando la neutralización de IL-31 en ratones tratados con IL-31, con moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31, pueden evitar el producto y la alopecia, se prueba en el ejemplo 12.

De esta manera, la neutralización de IL-31 por las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento se pueden utilizar para mejorar el resultado clínico de prurito nodular por inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o rascado asociado con la enfermedad.

Virus trópico para la piel y prurito asociado a virus

Los linfocitos T CD8+ específicos para virus de herpes simple (HSV) en la sangre periférica y linfocitos T CD8+ específicos para HSV recuperados de lesiones herpéticas expresan concentraciones altas de CLA como linfocitos T CD8+ que no son específicos para virus de herpes trópico cutáneo carecen de expresión de CLA. Véase Koelle D.M., et al., *J Clin Invest*: 110, 537 (2002). Los linfocitos T CD4+ reactivos a HSV-2 también expresan CLA pero a niveles menores que los observados previamente para linfocitos T CD8+. Véase Gonzalez J.C., et al., *J Infect Dis*: 191, 243 (2005). El prurito también es asociado con infecciones virales de herpes (Véase Hung K.Y., et al., *Blood Purif*: 16, 147 (1988)), aunque otras enfermedades virales, como VIH, también se han relacionado con lesiones cutáneas pruríticas. El prurito intratable y grave asociado con frecuencia con lesiones cutáneas eritematopapulares e hipereosinofilia, es una afección que se observa en algunos pacientes 36 infectados por VIH no atópicos. Véase Singh F. & Rudikoff D. *Am J Clin Dermatol*; 4, 177 (2003); y Milazzo F., Piconi S., et al., *Allergy*: 54, 266 (1999).

La asociación de virus trópicos para la piel con pruritos y linfocitos T CLA+ sugiere que los linfocitos T productores de IL-31 pueden estar involucrados en la fisiopatología de infecciones virales.

Por lo tanto, la neutralización de IL-31 por moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento se pueden utilizar para mejorar el resultado clínico de prurito asociado con virus trópico para la piel mediante inhibición, reducción, prevención o bloqueo de inflamación y/o rascado asociado con la enfermedad.

La relación de IL-31 en la inducción de una respuesta prurítica y su reducción, bloqueo, inhibición o neutralización por moléculas de unión de IL-31 descritas en el presente documento se puede medir de numerosas maneras.

Procedimiento I (Tratamiento con capsaicina de ratones tratados con IL-31):

Se anestesian animales BLAB/c de diez semanas de edad (CRL) y se les inyecta con un agente analgésico de larga duración, clorhidrato de bupranorfina por vía subcutánea a 0.1 mg/kg antes de la inyección de 0,25 ml de una solución 4 mg/ml de capsaicina en etanol 10 % + Tween-80 10 % en solución salina subcutáneamente en la cerviz. Se mantienen anestesiados a los animales durante por lo menos 30 min después del tratamiento con neurotoxina. A las 48 horas después se implanten subcutáneamente bombas osmóticas de 14 días para el suministro continuo de 20 µg/día de IL-31 durante 14 días. Se monitorea a los ratones diariamente durante 6 días para determinar alopecia y prurito utilizando el siguiente criterio: 0 = sin rascado, animales con apariencia normal, 1 = adelgazamiento de la piel en áreas pequeñas, se observa rascado, 2 = pérdida en pelo menor (parches pequeños), rascado, 3 = pérdida moderada de pelo, rascado y 4 = pérdida grave de pelo, rascado excesivo. Cuando este experimento se realiza, los resultados demuestran que aunque los ratones no tratados con capsaicina muestran una media de rascado/pérdida de pelo con una calificación de 2.625 después de tres días de suministro de IL-31, los ratones tratados con capsaicina muestran una calificación significativamente menor de 1. Por lo tanto, los ratones tratados con capsaicina antes del suministro de IL-31 muestran un retardo en la incidencia de rascado y pérdida de pelo y una calificación

menor en la intensidad de rascado y pérdida de pelo durante los seis días del experimento. Estos datos sugieren que IL-31 no induce algún componente neuronal que contribuya a la alopecia y prurito producido por IL-31. Por lo tanto, la neutralización de IL-31 puede disminuir la incidencia e intensidad de la prurito y por lo tanto la dermatitis en pacientes que padecen trastornos cutáneos que involucran prurito.

5 Procedimiento II:

Ratones que son homocigotos nulos para el gen Tac1 no expresan sustancia P detectable o neurocinina A. Estos ratones tienen respuestas de dolor nociceptiva reducidas de manera significativa a estímulos moderados o intensos y por lo tanto son una herramienta útil para estudiar la contribución de péptidos de taquicinina para el procesamiento de dolor/prurito y estado de enfermedad inflamatoria. Se implanta a ratones de doce semanas de edad, con genes inactivados en la expresión del gen para Tac1, con bombas osmóticas de 14 días que suministran 1 µg/día de proteínas IL-31 y se les observa diariamente para determinar alopecia y prurito utilizando el siguiente criterio: 0 = sin rascado, el animal tiene una apariencia normal, 1 = adelgazamiento del pelaje en áreas pequeñas, se observa rascado = 2 pérdida menor de pelo (parches pequeños), rascado, 3 = pérdida moderada de pelo, rascado y 4 = pérdida grave de pelo, rascado excesivo.

Los resultados de este estudio muestran que ratones deficientes en Tac1 son menos susceptibles a rascado/pérdida de pelo inducida por IL-31 en comparación con ratones control tipo silvestre. Aunque 100 % (10/10) de ratones tipo silvestre desarrollaron pruebas de rascado y pérdida de pelo al día 6 del tratamiento con IL-31, solo 33,3 % (2/6) de ratones deficientes en Tac1 mostraron signos de rascado y pérdida de pelo en el mismo punto en el tiempo. Estos datos muestran que IL-31 induce un componente neuronal que contribuye al fenotipo de rascado/pérdida de pelo en ratones tratados con IL-31 y neutralización de IL-31 por moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 pueden disminuir la incidencia e intensidad de rascado en el contexto de dermatitis.

25 Procedimiento III (Administración de cuerpo neutralizante de IL-31):

A ratones BALB/c hembra normales (CRL) de aproximadamente 8 a 12 semanas de edad se les implanta subcutáneamente con bombas osmóticas de 14 días suministrando 1 µg/día de mIL-31. Los grupos de ratones recibieron inyecciones intraperitoneales (Alzet, #2002) de anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-31 de ratón, 10 mg/kg (200 µg/ratón) dos veces a la semana, comenzando una semana antes del suministro de IL-31. Los grupos control de ratones recibieron inyecciones i.p. de vehículo (PBS/BSA 0,1 %) con protocolos de dosificación idénticos. Se calificó diariamente a los ratones para determinar alopecia y prurito utilizando el siguiente criterio: 0 = sin rascado, los animales tienen una apariencia normal, 1 O engrosamiento del pelaje en áreas pequeñas, se observa rascado, 2 = pérdida menor de pelo (parches pequeños), rascado, 3 = pérdida moderada de pelo, rascado y 4 = pérdida grave de pelo, rascado excesivo.

En todos los experimentos los ratones tratados con mAb de rata anti-mIL-31 presentaron un retraso en el inicio de los síntomas de aproximadamente 5 a 7 días y una calificación general menor para alopecia y prurito. Todos los grupos de ratones tratados con mAb (sin importar la frecuencia de dosis o la concentración) desarrollaron alopecia y prurito similar a los ratones control a los 13 días de estudio. Estos datos sugieren que la neutralización de IL-31 por moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 puede retardar el inicio de la respuesta de rascado/pérdida de pelo inducida por IL-31. Los efectos de las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 se miden por inhibición de rascado, prurito, dermatitis o reducción en la expresión de IL31RA en queratinocitos y/o reducción en la calificación para alopecia y prurito.

La inflamación es una respuesta protectora por un organismo para eliminar un agente invasor. La inflamación es una sucesión de eventos que involucran muchos mediadores celulares y humorales. Por una parte, la supresión de respuestas inflamatorias puede generar a un hospedador inmunodeteriorado; no obstante, si se deja sin verificar, la inflamación puede generar complicaciones graves que incluyen enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de intestino inflamatorio, y similares), choque septicémico y fallo múltiple de órganos. De manera importante, estos diferentes estados de enfermedad comparten mediadores inflamatorios comunes. Las enfermedades colectivas que se caracterizan por inflamación tienen un gran impacto en la morbilidad y mortalidad humana. Por lo tanto, es evidente que los anticuerpos antiinflamatorios y los polipéptidos de unión tales como anticuerpos anti-IL-31 y polipéptidos de unión descritos en el presente documento pueden tener un potencial terapéutico fundamental para una gran cantidad de enfermedades en humanos y animales, desde asma y alergia hasta autoinmunidad y choque septicémico. De esta manera, el uso de anticuerpos anti-IL31 antiinflamatorios y polipéptidos de unión descritos en el presente documento se pueden utilizar terapéuticamente como antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento, particularmente en enfermedades tales como artritis, endotoxemia, enfermedad de intestino inflamatorio, psoriasis, enfermedades relacionadas y similares.

1. Artritis

La artritis, que incluye osteoartritis, artritis reumatoide, articulaciones artríticas como un resultado de daño y similares son condiciones inflamatorias comunes las cuales se pueden beneficiar del uso terapéutico de anticuerpos antiinflamatorios y polipéptidos de unión tales como anticuerpos anti-IL31 y polipéptidos de unión de la presente

invencción. Por ejemplo, la artritis reumatoide (RA) es una enfermedad sistémica que afecta a todo el cuerpo y es una de las formas más comunes de artritis. Se caracteriza por la inflamación del revestimiento membranal de la articulación lo que provoca dolor, rigidez, ardor, enrojecimiento e hinchazón. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir hueso y cartílago. Como un resultado de artritis reumatoide, el revestimiento de la articulación inflamada, el sinovio, puede invadir y dañar el hueso y cartílago lo que lleva al deterioro de la articulación y dolor grave, entre otros efectos fisiológicos. La articulación involucrada puede perder su forma y alineación lo que resulta en dolor y pérdida de movimiento.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad mediada por el sistema inmunitario que se caracteriza particularmente por inflamación y daño subsecuente del tejido lo que genera inhabilitación grave y mortalidad aumentada. Diversas citocinas se produce localmente en las articulaciones reumáticas. Numerosos estudios han demostrado que IL-1 y TNF- α , dos citocinas proinflamatorias prototípicas pueden jugar un papel importante en los mecanismos involucrados en la inflamación sinovial y en la destrucción progresiva de las articulaciones. En realidad, la administración de inhibidores de TNF- α e IL-1 en pacientes con RA ha generado una mejoría perceptible en los signos clínicos y biológicos de inflamación y una reducción de los signos radiológicos de la erosión ósea y destrucción de cartílago. No obstante, pese a estos resultados alentadores, un porcentaje significativo de pacientes no responden a estos agentes, lo que sugiere que también están involucrados otros mediadores en la fisiopatología de artritis (Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2): 135-149, 2002). Uno de estos mediadores puede ser IL-31 y como tal, una molécula que se une o que inhibe IL-31, tal como anticuerpos anti-IL-31 o asociados de unión, pueden servir como una herramienta terapéutica valiosa para reducir la inflamación en artritis reumatoide y otras enfermedades artríticas.

Existen varios modelos animales para artritis reumatoide conocidos en la técnica. Por ejemplo, en un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica y recuerdan mucho a la artritis reumatoide humana. Dado que CIA comparte características inmunológicas y patológicas similares con RA, lo vuelve un modelo ideal para analizar compuestos potenciales antiinflamatorios humanos. El modelo de CIA es un modelo bien conocido en ratones que dependen tanto de una respuesta inmunitaria como de una respuesta inflamatoria con el fin de que se produzca. La respuesta inmunitaria comprende la interacción de linfocitos B y linfocitos T CD4+ en respuesta a colágeno, el cual se suministra como antígeno y genera la producción de anticuerpos anti-colágeno. La fase inflamatoria es el resultado de respuestas del tejido a partir de mediadores de inflamación, como una consecuencia de algunos de estos anticuerpos los cuales dan reacción cruzada con el colágeno nativo del ratón y activan la cascada del complemento. Una ventaja en el uso del modelo de CIA es que se conocen los mecanismos básicos de patogénesis. Los epítomos relevantes de linfocitos T y linfocitos B es colágeno tipo II se han identificado y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (por ejemplo hipersensibilidad de tipo retrasado y anticuerpo anti-colágeno) así como inflamatorios (por ejemplo citocinas, quimiocinas y enzimas degradadoras de matriz) en relación a artritis mediada por sistema inmunitario y por lo tanto se pueden utilizar para determinar compuestos de prueba eficazmente en el modelo CIA (Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3:407-20, 1999; Williams et al., Immunol. 89:9784-788, 1992; Myrs et al., Life Sci. 61:1861-78, 1997; y Wang et al., Immunol. 92:8955-959, 1995).

La administración de IL-31RA soluble que comprende polipéptidos (que incluyen receptores heterodiméricos y multiméricos descritos en el presente documento tales como IL-31RA-Fc4 u otras proteínas solubles y de fusión de IL-31RA para este modelo de CIA en ratón se puede utilizar para evaluar el uso de IL-31RA para disminuir los síntomas y alterar el curso de la enfermedad. Como una molécula que modula la respuesta inmunitaria e inflamatoria, IL-31 puede inducir producción de SAA, la cual está implicada en la patogénesis de artritis reumatoide, las moléculas de unión de IL-21 o los antagonistas de IL-31 pueden reducir la actividad de SAA *in vitro* e *in vivo*, la administración sistémica o local de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 pueden suprimir potencialmente la respuesta inflamatoria en RA.

2. Endotoxemia

La endotoxemia es una afección grave que resulta comúnmente de agentes infecciosos tales como bacterias y otros agentes infecciosos de enfermedad, septicemia, síndrome de choque tóxico o pacientes inmunodeteriorados sometidos a infecciones oportunistas y similares. La utilidad terapéutica de los anticuerpos antiinflamatorios y los polipéptidos de unión tales como los anticuerpos anti-IL-31 y polipéptidos de unión de la presente invencción pueden ayudar a evitar y tratar endotoxina en humanos y animales. Otras sustancias terapéuticas potenciales incluyen polipéptidos IL-31RA, polipéptidos detectores heterodiméricos y multiméricos solubles o anticuerpos anti-IL-31 o asociados en unión de la presente invencción y similares, que pueden servir como una sustancia terapéutica valiosa para reducir la inflamación y los efectos patológicos en endotoxemia.

La endotoxemia inducida por lipopolisacárido (LPS) relaciona muchos de los mediadores proinflamatorios que producen efectos patológicos en las enfermedades infecciones y la endotoxina inducida por LPS en roedores se utiliza ampliamente como un modelo aceptable para estudiar los efectos farmacológicos de agentes potenciales proinflamatorios o inmunomoduladores. LPS producirá en bacterias gramnegativas es el agente causal principal en la patogénesis de choque septicémico (Glausner et al., Lancet 338:732, 1991). En realidad, se puede inducir experimentalmente un estado similar a choque mediante la inyección única de LPS en animales. Las moléculas

producidas por células que responden a LPS pueden dirigir patógenos directa o indirectamente. Aunque estas respuestas biológicas protegen al hospedador contra patógenos invasores, también provocan daño. Por lo tanto, la estimulación masiva de la inmunidad innata, que se produce como resultado de una infección grave bacteriana gramnegativa genera una producción en exceso de citocinas y otras moléculas del desarrollo de un síndrome mortal, el síndrome de choque septicémico el cual está caracterizado por fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada y fallo de órganos múltiples (Dumitru et al. Cell 103-1071-1083, 2000).

Estos efectos tóxicos de LPS se relacionan en su mayoría con activación de macrófago lo que genera la liberación de mediadores inflamatorios múltiples. Entre estos mediadores, TNF parece jugar un papel fundamental, como se indica por la prevención de toxicidad por LPS mediante la administración de anticuerpos neutralizantes anti-TNF (Beutler et al., Science 229:869, 1985). Está bien establecido que la inyección de 1 µg de LPS de *E. coli* en un ratón C57B1/6 resultará en incrementos significativos en IL-6 circulante, TNF-α, IL-1 y proteínas de fase agudas (por ejemplo, SAA) aproximadamente 2 horas después de la inyección. La toxicidad de LPS parece estar mediada por estas citocinas como inmunización pasiva contra estos mediadores lo que pueda resultar en mortalidad disminuida (Beutler et al., Science 229:869, 1985). Las estrategias de inmunointervención potenciales para la prevención y/o tratamiento de choque septicémico incluye mAb anti-TNF, antagonista receptor de IL-1, LIF, IL-19 y G-CSF. Dado que LPS induce la producción de factores proinflamatorios que posiblemente contribuyan a la patología de endotoxemia, la neutralización de la actividad de IL-31, SAA u otros factores proinflamatorios por antagonizado del polipéptido IL-31 se puede utilizar para reducir los síntomas de endotoxina tal como se observa en choque endotóxico. Otros procedimientos terapéuticos potenciales incluyen moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31.

3. Enfermedad de intestino inflamatorio IBD

En los Estados Unidos muchas personas sufren de enfermedad de intestino inflamatorio (IBD) lo cual puede afectar al colon y recto (colitis ulcerativa) o ambos, intestino delgado y grueso (enfermedad de Crohn). La patogénesis de esta enfermedad es poco clara pero involucra inflamación crónica de los tejidos afectados. El tratamiento potencial incluye polipéptidos IL-31RA, polipéptidos receptores heterodiméricos y multiméricos solubles o anticuerpos anti-IL-31 o asociados de unión de la presente invención y similares, que pueden servir como una sustancia terapéutica valiosa para reducir la inflamación y los efectos patológicos de IBD y enfermedades relacionadas.

La colitis ulcerativa (UC) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, comúnmente denominado colon, caracterizada por inflamación y ulceración de la mucosa o el revestimiento más interior del colon. Esta inflamación provoca que el colon se vacíe con frecuencia, lo que resulta en diarrea. Los síntomas incluyen heces sueltas y dolor abdominal asociado, fiebre y pérdida de peso. Aunque se desconoce la causa exacta de UC, investigaciones recientes sugieren que las defensas naturales del cuerpo están operando contra proteínas en el cuerpo con las cuales el cuerpo considera que son extrañas (una "reacción autoinmune"). Tal vez debido a que recuerda a las proteínas bacterianas en el intestino, estas proteínas pueden inducir o estimular un proceso inflamatorio que comienza a destruir el revestimiento del colon. Conforme se destruye el revestimiento del color en forma ulceral que liberan moco, pus y sangre. La enfermedad habitualmente comienza en el área rectal y posteriormente se puede extender a la totalidad del intestino grueso. Los episodios repetidos de inflamación generan engrosamiento de la pared del intestino recto con tejido cicatrizante. Puede presentarse muerte de tejido del colon o septicemia, con enfermedad grave. Los síntomas de colitis ulcerativa varían en gravedad y su inicio puede ser gradual o súbito. Los ataques pueden ser provocados por muchos factores que incluyen infecciones respiratorias o estrés.

Aunque actualmente no existe cura para UC disponible, los tratamientos se enfocan en suprimir el proceso inflamatorio normal en el revestimiento del colon. Los tratamientos incluyen inmunosupresores corticosteroides (por ejemplo azatioprina, mercaptopurina y metotrexato) y los aminosalicilatos están disponibles para tratar la enfermedad. No obstante, el uso a largo plazo de inmunosupresores tales como corticosteroides y azatioprina puede resultar en efectos secundarios graves que incluyen debilitamiento de huesos, cataratas, infección de hígado y efectos en médula ósea. En pacientes en quienes los tratamientos actuales no han tenido éxito es una opción la cirugía. La cirugía involucra la extirpación de todo el colon y el recto.

Existen varios modelos animales que pueden imitar parcialmente la colitis ulcerativa crónica. El modelo utilizado más ampliamente es el modelo de colitis inducido por ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico/etanol (TNBS) el cual induce inflamación crónica y ulceración en el colon. Cuando se introducen TNBS en el colon de ratones susceptibles por medio de instilación intrarrectal, se induce una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en la mucosa del colon, en este caso genera una inflamación mucosal masiva caracterizada por infiltración densa del intestino grueso. Además, este cuadro histopatológico se acompaña por un cuadro clínico de pérdida de peso (debilitamiento) progresivo, diarrea con sangre, prolapso rectal y engrosamiento de la pared del intestino grueso (Neurath et al. Intern. Rev. Immunol. 19:51-62 2000).

Otro modelo de colitis utiliza sulfato de dextrano y sodio (DSS), el cual induce una colitis aguda que se manifiesta por diarrea con sangre, pérdida de peso, acortamiento del colon y ulceración con mucosa, con infiltración de neutrófilos. La colitis inducida por DSS está caracterizada histológicamente por infiltración de células inflamatorias en la lámina propia, con hiperplasia linfoide, daño cripto focal y ulceración epitelial. Se considera que estos cambios

se desarrollan debido a un efecto tóxico de DSS en el epitelio y por fagocitosis de las células de lámina propia e inducción de TNF- α e IFN- 1γ . Pese a su uso común, varias preocupaciones respecto a los mecanismos de DSS acerca de la relevancia para la enfermedad humana permanecen sin resolver. Se considera a DSS como un modelo independiente de linfocitos T debido a que se observan animales deficientes en linfocitos T tales como los ratones SCID.

La administración de anticuerpos anti-IL-31 o asociados de unión, IL-31RA soluble que comprende polipéptidos (que incluye receptores heterodiméricos y multiméricos) tales como IL-31RA-Fc4 u otras IL-31RA solubles y proteínas de fusión para estos modelos de TNBS o DSS se pueden utilizar para evaluar el uso de antagonistas de IL-31 para disminuir los síntomas y alterar el desarrollo de la enfermedad gastrointestinal. IL-31 puede jugar un papel en la respuesta inflamatoria en colitis y la neutralización de actividad de IL-31 por administración de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 es un enfoque terapéutico potencial para IBD.

4. Psoriasis

La psoriasis es una afección cutánea crónica que afecta a más de siete millones de norteamericanos. La psoriasis se presenta cuando células cutáneas nuevas crecen de manera normal lo que resulta en parches inflamados, expandidos y con escamas en la piel en donde la piel anterior no había cicatrizado suficientemente rápido. Las placas psoriáticas, la forma más común, está caracterizada por parches inflamados de la piel ("lesiones") cubiertas con escamas blancas o plateadas. La psoriasis se puede limitar a algunas placas o involucrar áreas moderadas o extensas de la piel, apareciendo de manera más común en el cuero cabelludo, rodillas, codos y en el tórax. Aunque es claramente visible, la psoriasis no es una enfermedad contagiosa. La patogénesis de la enfermedad involucra inflamación crónica de los tejidos afectados. Los polipéptidos de IL-31RA, los polipéptidos receptores heterodiméricos y multiméricos solubles o los anticuerpos anti-IL-31 o asociados de unión de la presente invención y similares pueden servir como sustancias terapéuticas valiosas para reducir la inflamación y efectos patológicos en psoriasis, otras enfermedades cutáneas inflamatorias, alergias en la piel y las mucosas y enfermedades relacionadas.

La psoriasis es un trastorno inflamatorio mediado por linfocitos T en la piel que puede provocar incomodidad considerable. Es una enfermedad para la cual no hay cura y afecta a personas de todas las edades. La psoriasis afecta aproximadamente a dos por ciento de la población Europea y de América del Norte. Aunque los individuos con psoriasis ligera con frecuencia controlan su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes en el mundo requieren tratamiento inmunosupresor con radiación ultravioleta o sistémico. Desafortunadamente, la inconveniencia y los riesgos de radiación ultravioleta así como la toxicidad de muchos tratamientos limitan su uso a largo plazo. Además, los pacientes habitualmente presentan recurrencia de psoriasis y en algunos casos r.

Se ha aislado IL-31 de tejido que se sabe que tiene una función inmunológica importante que contiene células que juegan un papel en el sistema inmunitario. IL-31 se expresa en células de sangre periférica activada seleccionados CD3+ y se ha demostrado que la expresión de IL-31 aumenta después de la activación de los linfocitos T. Además, los resultados de los experimentos descritos en la sección de ejemplos en el presente documento sugieren que los polipéptidos de la presente invención pueden tener un efecto sobre el crecimiento/expansión de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células NK y/o un estado diferenciado de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células NK o estos progenitores de células. Los factores que estimulan la proliferación de progenitores hematopoyéticos inactivan a las células maduras se conocen generalmente. No obstante, la proliferación de activación también puede requerir factores de crecimiento adicionales. Por ejemplo, se ha demostrado que IL-7 y el factor Steel (ligando c-kit) se requieren para formación de colonia de progenitores NK. IL-15 + IL-2 en combinación con IL-7 y el factor Steel son más eficaces (Mrozek et al., Blood 87:2632-2640, 1996). No obstante pueden necesitarse citocinas no identificadas para proliferación de subconjuntos específicos de células NK y/o progenitores NK (Robertson et al., Blood 76:2451-2438, 1990). De manera similar, IL-31 puede actuar solo o de manera concertada o en sinergia con otras citocinas para incrementar el crecimiento, la expansión por proliferación y modificación de diferenciación de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B o células NK.

La presente invención proporciona un procedimiento para inhibir la activación o diferenciación de monocitos/macrófagos. Los monocitos son células que se han diferenciado de manera incompleta que se desplazan a diversos tejidos en donde maduran y se vuelven macrófagos. Los macrófagos juegan un papel central en la respuesta inmunitaria al presentar antígeno de linfocitos y juegan un papel de soporte como células adicionales a los linfocitos secretando numerosas citocinas. Los macrófagos pueden internalizar moléculas extracelulares y, cuando se activan, tienen una capacidad aumentada para destruir microorganismos intracelulares y células tumorales. Los macrófagos activados también están involucrados en la estimulación de inflamación aguda o local.

La distribución en tejido de receptores para una citocina dada proporciona una indicación concluyente de los sitios potenciales de acción de la citocina. La expresión de IL-31RA se ha observado en monocitos y linfocitos B con un incremento perceptible de expresión por activación para linfocitos T CD3+ y CD4+ y CD8+. Además, dos líneas de células monocíticas, THP-1 (Tsuchiya et al., Int. J. Cancer 26:171-176, 1980) y U937 (Sundstrom et al., Int. J. Cancer 17:565-577, 1976), también son positivas para la expresión de IL-31RA.

La expresión de OSMR se ha informado que es muy amplia (Mosley et al, JBC 271:32635-32643, 1996). Esta distribución de IL-31RA y receptores OSM fundamentan el papel de IL-31 en las respuestas inmunitarias, especialmente expansión de linfocitos T por activación o con un papel en el brazo monocito/macrófago del sistema inmunitario.

5 Así, las realizaciones particulares de la presente invención se relacionan con el uso de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31, como antagonistas en enfermedades inflamatorias e inmunitarias o condiciones tales como pancreatitis, diabetes tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Graves, enfermedad de intestino inflamatorio (IBD), enfermedad de Crohn, cáncer de colon e intestinal, diverticulosis, enfermedades autoinmunitarias, septicemia, trasplantes de órganos o médula ósea; inflamación debido a traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad de rechazo inverso y en donde hay inhibición e inflamación, supresión inmunitaria, reducción de proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (que incluyen a células Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), supresión de la respuesta inmunitaria a un patógeno o antígeno. Además, la presencia de expresión de IL-31RA en células inmunitarias activadas tales como las células activadas CD4+ y CD19+ muestran que el receptor IL-31RA puede estar involucrado en las reacciones defensivas inmunitarias de un cuerpo contra invasores extraños; tales microorganismos y residuos celulares y puede jugar un papel en las respuestas inmunitarias durante la inflamación y formación de cáncer. Como tales, los anticuerpos y asociados de unión de la presente invención que son agonistas o antagonistas para la función del receptor de IL-31RA tales como IL-31, se pueden utilizar para modificar la respuesta inmunitaria y la inflamación.

Las moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 también se pueden utilizar dentro de sistemas de diagnóstico para la detección de niveles circulantes de IL-31. Dentro de una realización relacionada, los anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente a polipéptidos de IL-31 se pueden utilizar para detectar polipéptidos de IL-31 circulantes. Los niveles elevados o disminuidos de polipéptidos de ligando pueden ser indicativos de condiciones patológicas, que incluyen cáncer. Los polipéptidos de IL-31 pueden contribuir a procesos patológicos y pueden ser un marcador indirecto de una enfermedad subyacente.

En lesiones ateroscleróticas una de las primeras anomalías es la localización de monocitos/macrófagos a células endoteliales. Estas lesiones se pueden evitar por el uso de antagonistas para IL-31. Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 también se pueden utilizar como antagonistas para la IL-31. Además, la leucemia monoblástica se relaciona con diversas anomalías clínicas que reflejan la liberación de los productos biológicos del macrófago, por ejemplo incluyen altos niveles de lisozima en el suero y orina y fiebres altas. Además, las leucemias muestran un incremento anormal de células monocíticas. Posiblemente estos efectos se pueden evitar por antagonistas para IL-31 tales como los que se describen en el presente documento. Además, se puede conjugar anti-IL-31 a moléculas tales como porciones tóxicas y citocinas, como se describe en el presente documento para dirigir la destrucción de células monocíticas leucémicas.

Dado que IL-31 se expresa de manera específica en linfocitos T, macrófagos y monocitos y estas enfermedades involucran anomalías en células monocíticas, tal como proliferación celular, función, localización y activación, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar como elementos de diagnóstico para detectar las anomalías de células monocíticas e indicar la presencia de la enfermedad. Los procedimientos involucran tomar una muestra biológica de un paciente tal como sangre, saliva o biopsia y compararla con una muestra control normal. Se pueden utilizar procedimientos histológicos, citológicos, citométricos de flujo, bioquímicos y de otro tipo para determinar los niveles relativos o la localización de IL-31 o células que expresan IL-31, es decir, monocitos, en la muestra del paciente en comparación con el control normal. Un cambio en el nivel (aumento o disminución) de expresión de IL-31 o un cambio en el número o localización de monocitos (por ejemplo incremento o infiltración de células monocíticas en tejidos cuando normalmente no están presentes) en comparación con un control, puede ser indicativo de enfermedad. Los procedimientos de diagnóstico también pueden incluir el uso de etiquetas radiométricas, fluorescentes y colorimétricas unidas a polinucleótidos, polipéptidos o anticuerpos de la presente invención. Los procedimientos son bien conocidos en la técnica y se describen en el presente documento.

Se ha demostrado que IL-31 se expresa en células mononucleares activadas y puede estar involucrado en regulación de inflamación. Como tal, los polipéptidos de la presente invención se pueden analizar y utilizar para determinar su capacidad para modificar inflamación o se pueden utilizar como un marcador para inflamación. Los procedimientos para determinar calidad proinflamatorio y anti-inflamatoria de IL-31 se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Además, se puede involucrar en regulación por aumento la producción de reactivos en fase aguda tal como amiloide A sérico (SAA), α 1-antiquimiotripsina y haptoglobina y la expresión del ligando receptor de IL-31RA se puede incrementar por inyección de lipopolisacárido (LPS) *in vivo* que esté involucrado en la respuesta inflamatoria (Dumoutier, L. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000). La producción de proteínas en fase aguda tales como SAA se considera un mecanismo de supervivencia a corto plazo en donde es benéfica la inflamación; no obstante el mantenimiento de proteínas en fase aguda por períodos más prolongados contribuye a la inflamación crónica y puede ser dañino para la salud humana. Para una revisión, véase Uhlar, CM y Whitehead, As, Eur. K. Biochem. 265:501-523, 1999, y Baumann H. y Gauldie, J. Immunology Today 15:74-80, 1994. Además, la proteína en fase aguda SAA está implicada en la patogénesis de varias enfermedades

inflamatorias crónicas, está implicado en aterosclerosis y artritis reumatoide y es el precursor de proteína amiloide A depositada en amiloidosis (Uhlar, CM y Whitehead, supra). Por lo tanto, cuando un ligando tal como IL-31 que actúa como una molécula proinflamatoria se induce la producción de SSA, los antagonistas pueden ser útiles para tratar enfermedad inflamatoria y otras enfermedades asociadas con proteínas de respuesta en fase aguda inducidas por el ligando. Los antagonistas se proporcionan por la presente invención. Por ejemplo un procedimiento para reducir la inflamación comprende administrar un mamífero con inflamación una cantidad de una composición de IL-31 o anticuerpo anti-IL-31 (por ejemplo un anticuerpo neutralizante) que es suficiente para reducir la inflamación. Además, un procedimiento para suprimir una respuesta inflamatoria en un animal con inflamación puede comprender: (1) determinar un nivel de proteína amiloide A sérica; (2) administrar una composición que comprende un polipéptido IL-31 o anticuerpo anti-IL-31 como se describe en el presente documento en un portador farmacéutico aceptable; (3) determinar un nivel post administración de proteína amiloide A sérica; (4) comparar el nivel de proteína amiloide A sérica en la etapa (1) con el nivel de proteína amiloide A sérica en la etapa (3) en donde una carencia de incremento o una disminución en el nivel de proteína amiloide A en suero es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria.

La distribución de tejido del ARNm que corresponde a su ADNc de receptor IL-31RA muestra que el nivel de ARNm es más alto en monocitos y células de próstata y está elevado en monocitos activados y células CD4+ activadas, CD8+ activadas y CD3+ activadas. Por lo tanto, el receptor IL-31RA también se implica en la inducción de respuesta inflamatoria e inmunitaria. Por lo tanto, las realizaciones particulares de la presente invención se relacionan con el uso de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 en enfermedades inflamatorias e inmunitarias o condiciones tales como pancreatitis, diabetes tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de graves, enfermedad de intestino inflamatorio (IBD), enfermedad de Crohn, cáncer de colon e intestinal, diverticulosis, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, trasplante de órgano o médula ósea; inflamación debido a traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad de rechazo inverso; y en donde la inhibición de inflamación, supresión inmunitaria, reducción de proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (que incluyen células Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), supresión de la respuesta inmunitaria a un patógeno o antígeno. Además, la presencia del receptor IL-31RA y la expresión de IL-31RA en células inmunitarias activadas tales como las células CD3+ activadas, monocitos, CD4+ y CD19+ muestran que el receptor IL-31RA puede estar involucrado en las reacciones defensivas inmunitarias del cuerpo contra invasores extraños; tales como microorganismos y residuos celulares y puede jugar un papel en las respuestas inmunitarias durante la inflamación y formación de cáncer. Como tal, IL-31 y los anticuerpos de IL-31 de la presente invención que son agonistas o antagonistas a la función del receptor de IL-31RA, se pueden utilizar para modificar la respuesta inmunitaria y la inflamación.

Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 son útiles para:

1) Antagonizar o bloquear la señalización vía receptores que comprenden IL-31RA en el tratamiento de inflamación aguda, inflamación como un resultado de traumatismo, daño a tejido, cirugía, septicemia o infección y enfermedades inflamatorias crónicas tales como asma, enfermedad de intestino inflamatorio (IBD), colitis crónica, esplenomegalia, artritis reumatoide, episodios inflamatorios agudos recurrentes (por ejemplo tuberculosis) y tratamiento de amiloidosis y aterosclerosis, enfermedad de Castleman, asma y otras enfermedades relacionadas con la inducción de respuesta en fase aguda.

2) Antagonizar o bloquear la señalización vía los receptores del receptor IL-31RA en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como IDDM, esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (SLE), miastenia grave, artritis reumatoide e IBD para evitar o inhibir la señalización en células inmunitarias (por ejemplo linfocitos, monocitos, leucocitos) vía el receptor IL-31RA (Hughes C et al., J. Immunol 153: 3319-3325, 1994). También se pueden utilizar anticuerpos alternativos, tales como anticuerpos monoclonales (MAb) para IL-31 como un antagonista para suprimir células inmunitarias no deseadas para tratar enfermedades autoinmunitarias. El asma, la alergia y otras enfermedades atópicas se pueden tratar con un MAb contra, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-31, receptores solubles de receptor IL-31RA o heterodímeros IL-31RA/CRF2-4 para inhibir la respuesta inmunitaria o para suprimir a células agresoras. El bloqueo o inhibición de la señalización vía IL-31RA utilizando los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención también puede beneficiar enfermedades al páncreas, riñón, hipófisis y células neuronales. IDDM, NIDDM, pancreatitis y carcinoma pancreático se pueden beneficiar. IL-31RA puede servir como un objetivo para tratamiento con MAb de cáncer en donde el MAb antagonizante inhibe el crecimiento de cáncer y dirige la destrucción mediada por el sistema inmunitario (Holliger P, y Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998). Los MAb para los monómeros, homodímeros, heterodímeros y multímeros de receptor IL-31RA solubles también pueden ser útiles para tratar neuropatías tales como glomeruloesclerosis, neuropatía membranosa, amiloidosis (la cual también afecta al riñón entre otros tejidos), arterioesclerosis renal, glomerulonefritis de diversos orígenes, enfermedades fibroproliferativas de riñón así como disfunción renal asociada con SLE, IDDM, diabetes tipo II (NIDDM), tumores renales y otras enfermedades.

3) Funcionar como agonista o iniciar la señalización vía los receptores IL-31RA en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como IDDM, MS, SLE, miastenia grave, artritis reumatoide e IBD. IL-31 puede señalar linfocitos u otras células inmunitarias para diferenciar, alterar la proliferación o cambiar la producción de citocinas o proteínas de superficie celular que disminuye la autoinmunidad. Específicamente, la modulación de una respuesta de linfocitos T cooperadores (helper) a un patrón alternativo de secreción de

citocina puede desviar una respuesta autoinmunitaria para disminuir la enfermedad (Smith JA et al., J. Immunol. 160: 4841-4849, 1998). De manera similar, se puede utilizar IL-31 para señalar, suprimir y desviar células inmunitarias involucradas en asma, alergia y enfermedad atópica. La señalización del receptor IL-31RA también puede beneficiar enfermedades del páncreas, riñón, hipófisis y células neuronales. Se pueden beneficiar IDDM, NIDDM, pancreatitis y carcinoma pancreático. IL-31RA puede servir como objetivo para el tratamiento con MAb de cáncer pancreático en donde el MAb de señalización inhibe el crecimiento de cáncer y dirige la destrucción mediada por el sistema inmunitario (Tutt, AL et al., J Immunol. 161: 3175-3185, 1998). De manera similar, las leucemias específicas de linfocitos T, linfomas, discrasia de células plasmáticas (por ejemplo mieloma múltiple) y carcinoma se pueden tratar con anticuerpos monoclonales (por ejemplo un anticuerpo neutralizante) para receptores solubles que comprenden IL-31RA de la presente invención.

Generalmente, la dosificación de las moléculas de unión de IL-31 antagonistas de IL-31 administrados variará en base en factores tales como la edad del paciente, el peso, altura, sexo, condición médica general y antecedentes médicos. Normalmente, es deseable proporcionar al receptor una dosificación de polipéptido IL-31 la cual está en el intervalo de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal de paciente), aunque también se puede administrar una dosificación menor o mayor según los determinen las circunstancias. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente las dosificaciones y ajustes a la misma, utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

La administración de una de las moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 a un sujeto puede ser por vía tópica, por inhalación, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, por perfusión a través de un catéter regional o por inyección intralesional directa. Cuando se administran proteínas terapéuticas por inyección, la administración puede ser por infusión continua o por un bolo único o múltiple.

Las vías de administración adicionales incluyen oral, mucosal-membrana, pulmonar y transcutánea. El suministro oral es adecuado para microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas proteínicas, microesferas de policianoacrilato y sistemas basados en lípidos (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins," in *Protein delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). Los factible del suministro intranasal se ejemplifica por el modo de administración de insulina (véanse, por ejemplo Hincheliff y Illum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:199 (1999)). Las partículas secas o líquida que comprenden IL-31 se pueden preparar e inhalar con la ayuda de surtidores de polvo seco, generadores de aerosol líquido o nebulizadores (es decir, Pettit y Gombotz, *TIBTECH* 16:342 (1998); Patton et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:235 (1999)). Esta solución se ilustra por el sistema de administración de diabetes AERX el cual es un inhalador electrónico portátil que suministra insulina aerosolizada a los pulmones. Los estudios han demostrado que las proteínas tan grandes como 48,000 kDa se han suministrado a través de la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonido de baja frecuencia, lo que ilustra lo factible de la administración transcutánea (Mitragotri et al., *Science* 269:850 (1995)). El suministro transdérmico utilizando electroporación proporciona otro medio para administrar una molécula que tenga actividad de unión de IL-31 (Potts et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:213 (1997)).

Una composición farmacéutica que comprende moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 que tengan actividad de unión de IL-31 se pueden formular de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por lo que las proteínas terapéuticas se combinan en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "portador farmacéuticamente aceptable" si la administración puede ser tolerada por el paciente receptor. La solución salina amortiguada con fosfato estéril es un ejemplo de un portador farmacéuticamente aceptable. Otros portadores adecuados son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, décimo novena edición (Mack Publishing Company 1995).

Para propósitos de tratamiento, las moléculas que tengan actividad de unión de IL-31 y un portador farmacéuticamente aceptable se administra en un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una combinación de una proteína, polipéptido o péptido que tenga actividad de unión a IL-31 y un portador farmacéuticamente aceptable se afirma que se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia resulta en un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente utilizado para tratar inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia por lo menos una porción de la respuesta inflamatoria.

Una composición farmacéutica que comprende moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 se puede suministrar en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran por soluciones inyectables, aerosoles, gotitas, soluciones topológicas y suspensiones orales. Las formas sólidas ejemplares incluyen cápsulas, comprimidos o tabletas y formas de liberación controlada. Esta última forma se ilustra por bombas miniosmóticas e implantes (Bremer et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer et al., "Protein Delivery with Infusion Pumps," in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey et al., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)). Otras formas sólidas

incluyen cremas, pastas, otras aplicaciones topológicas y similares.

Las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por procedimientos conocidos en la técnica tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y Patentes de EE.UU. Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorada se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.013.556.

Las formulaciones terapéuticas de las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 se preparan para almacenamiento por mezclado del anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences décimo sexta edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos al receptor a las dosificaciones y concentraciones utilizadas e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservadores (tal como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tal como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrina; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, triosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tal como sodio; complejos de metal (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween^{MR}, Pluronic^{MR} o polietilenglicol (PEG).

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según se necesite para tratar una indicación particular, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además anticuerpos que se unan a IL-31 en una formulación. De manera alternativa o adicional, la composición puede comprender un agente quimioterapéutico o una citocina. Las moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito deseado.

Los ingredientes activos también pueden ser retenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente en sistemas de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Las técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences décimo sexta edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones para ser utilizadas para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se cumple fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden elaborar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen en anticuerpo, matrices las cuales están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de EE.UU. N° 3.773.919), copolímeros de ácidos L-glutámico y γ-L-glutamato de etilo, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como Lupron Depot^{MR} (microesferas inyectables constituidas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo por un período prolongado, se pueden desnaturalizar o agregarse como resultados de la exposición a humedad a 37°C, lo que resulta en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Las estrategias razonadas pueden diseñarse para estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de un intercambio tio-disulfuro, se puede obtener estabilización al modificar los residuos sulfidrílo, liofilización a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones específicas para matriz polimérica.

Los polipéptidos que tengan actividad de unión de IL-31 se pueden encapsular dentro de liposomas utilizando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson et al., Infect. Immun. 31: 1099 (1981), Anderson et al., Cancer Res. 50:1853 (1990) y Cohen et al., Biochim. Biophys. Acta 1063:95 (1991), Alving et al., "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," in *Liposome Technology*, segunda edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993)), Wassef et al., Meth. Enzymol. 149:124 (1987)). Como se indica anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener diversos componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen et al.,

Biochim, Biophys. Acta 1150:9 (1993)).

Se han diseñados microesferas poliméricas degradables para mantener niveles sistémicos altos de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables tales como poli(lactida-co-glicolida) (PLG), polianhídridos, poli (orotésteres), polímeros no biodegradables de acetato de etilvinilo, en los cuales las proteínas están atrapadas en el polímero (Gombotz and Pettit, *Bioconjugate Chem* 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995); Roskos and Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus et al., *Science* 281:1161 (1998); Putney and Burke, *Nature Biotechnology* 16:153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.*2:548 (1998). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar portadores para administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase por ejemplo Gref et al., *Pharm. Biotechnol*, 10:167 (1997)).

Otras formas de dosificación se pueden diseñar por aquellos expertos en la técnica como se muestra, por ejemplo, por Ansel y Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, quinta edición (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, décimo novena edición (Mack Publishing Company 1995) y por Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

Como una ilustración las composiciones farmacéuticas se pueden suministrar como un equipo que comprende un recipiente que comprende un polipéptido IL-31 o un antagonista de IL-31 (por ejemplo un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un polipéptido IL-31). Los polipéptidos terapéuticos se pueden proporcionar en forma de una solución inyectable para dosis únicas o múltiples o como un polvo estéril que se puede diluir antes de su inyección. De manera alternativa, el equipo puede incluir un surtidor de polvo seco, un generador de aerosol líquido o un nebulizador para administración de un polipéptido terapéutico.

Dentro de un aspecto, la presente divulgación se relaciona con un anticuerpo aislado que se une a IL-31 humana, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado ante la American Type Culture Collection que la Designación de Depósito de Patente ATCC seleccionado de: a) Designación de Depósito de Patente ATCC PTA-6815; y en donde el anticuerpo comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada el cual es una IgG4 humana. En una realización, el dominio de IgG4 humana es una forma mutada estable en solución y con poca o nula actividad activadora de complemento. En una realización particular, el dominio de la región constante de inmunoglobulina de cadena pesada es un dominio constante de IgG4 humana con una mutación Ser a Pro en la posición 241 (numeración de Kabat).

Dentro de otro aspecto, estos anticuerpos se utilizan para tratar enfermedades que incluyen dermatitis atópica, dermatitis de contacto, reacciones alérgicas inducidas por fármacos, prurito por virus trópico cutáneo y asociado viral, vitiligo, linfoma de linfocitos T cutáneos, alopecia aerata, acné rosácea, acné vulgar, prurito nodular y penfigoide buloso, como se describe en el presente documento.

En una realización, la presente divulgación se relaciona con un anticuerpo aislado como se divulga en el presente documento en donde el dominio de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina humana κ o λ . Preferentemente, el dominio de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina es la región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina humana κ .

En un aspecto, la presente divulgación se relaciona con un anticuerpo aislado como se divulga en el presente documento en donde el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera comprenden las secuencias CDR de los clones 292.12.3.1, 202.84.1.6, 292.63.5.3, 294.144.3.5, 292.39.5.3, 292.51.5.2, 292.64.6.5.5, 292.105.4.1, 292.109.4.4, 192.118.6.4 y 292.72.3.1. Las secuencias de CDR se muestran en las figuras y en la tabla 3 siguiente.

En un aspecto, la presente divulgación se relaciona con un anticuerpo aislado como se divulga en el presente documento en donde junto a) el dominio variable de cadena pesada comprende la primera secuencia de CDR que consiste de la secuencias de aminoácidos SEC ID N° 51, una segunda secuencia CDR que consiste de la SEC ID N° 52 o SEC ID N° 57, y una tercera secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N° 53; y b) el dominio variable de cadena ligera comprende la primera secuencia de CDR que consiste de las secuencias de aminoácidos SEC ID N° 54, una segunda secuencia CDR que consiste de la SEC ID N° 55 y una tercer secuencia CDR que consiste de la SEC ID N° 56. En una realización, el anticuerpo se utiliza para tratar enfermedades que incluyen dermatitis atópica, dermatitis de contacto, reacciones alérgicas inducidas por fármacos, prurito de virus trópicos para la piel y asociados a virus, vitiligo, linfoma de linfocito T cutáneos, alopecia aerata, acné rosácea, acné vulgar, prurito nodular y penfigoide buloso, como se describe en el presente documento. En otra realización, se miden las quimiocinas tales como TARC o MDC.

En una realización, la presente divulgación se relaciona con un anticuerpo aislado como se divulga en el presente documento en donde a) el dominio variable de cadena pesada comprende una primera secuencia de CDR que

consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 51, una segunda secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 58 y una tercera secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 59; y b) el dominio variable de cadena ligera comprende una primera secuencia de CDR que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 60, una segunda secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 61 y una tercera secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 62. En una realización, el anticuerpo se utiliza para tratar enfermedades que incluyen dermatitis atópica, dermatitis de contacto, reacciones alérgicas inducidas por fármacos, prurito por virus trópico cutáneo y asociado a virus, vitíligo, linfoma de linfocitos T cutáneo, alopecia aerata, acné rosácea, acné vulgar, prurito nodular y penfigoide buloso, como se describe en el presente documento. En otra realización, se miden las quimiocinas tales como TARC o MDC.

En una realización, la presente divulgación se relaciona con un anticuerpo aislado como se divulga en el presente documento, en donde a) el dominio variable de cadena pesada comprende una primera secuencia de CDR que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 63, una segunda secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 64 y una tercera secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 65; y b) el dominio variable de cadena ligera comprende una primera secuencia de CDR que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 66, una segunda secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 67 y una tercera secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 68. En una realización, el anticuerpo se utiliza para tratar enfermedades que incluyen dermatitis atópica, dermatitis de contacto, reacciones alérgicas inducidas por fármacos, prurito de virus trópico para la piel o asociados a virus, vitíligo, linfoma de linfocitos T cutáneos, alopecia aerata, acné rosácea, acné vulgar, prurito nodular y penfigoide buloso, como se describe en el presente documento. En otra realización, se miden las quimiocinas tales como TARC o MDC.

En una realización, la presente divulgación se relaciona con un anticuerpo aislado como se divulga en el presente documento, en donde a) el dominio variable de cadena pesada comprende una primera secuencia de CDR que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 69, una segunda secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 70 o SEC ID N°. 79, una tercera secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 71; y b) el dominio variable de cadena ligera comprende una primera secuencia de CDR que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 72, una segunda secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 73 y una tercera secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 74. En una realización, el anticuerpo se utiliza para tratar enfermedades que incluyen dermatitis atópica, dermatitis de contacto, reacciones alérgicas inducidas por fármacos, prurito por virus trópico cutáneo y asociado a virus, vitíligo, linfoma de linfocitos T cutáneos, alopecia aerata, acné rosácea, acné vulgar, prurito nodular y penfigoide buloso, como se describe en el presente documento. En otra realización, se miden las quimiocinas tales como TARC o MDC.

En una realización, la presente divulgación se relaciona con un anticuerpo aislado como se divulga en el presente documento, en donde a) el dominio variable de cadena pesada comprende una primera secuencia de CDR que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 75, una segunda secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 76 y una tercera secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 65; y b) el dominio variable de cadena ligera comprende una primera secuencia de CDR que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 77, una segunda secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 78 y una tercera secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 68. En una realización, se utiliza el anticuerpo para tratar enfermedades que incluyen dermatitis atópica, dermatitis de contacto, reacciones alérgicas inducidas por fármacos, prurito por virus trópico cutáneo y asociado a virus, vitíligo, linfoma de linfocitos T cutáneos, alopecia aerata, acné rosácea, acné vulgar, prurito nodular y penfigoide buloso, como se describe en el presente documento. En otra realización, se miden las quimiocinas tales como TARC o MDC.

En una realización, la presente divulgación se relaciona con un anticuerpo aislado como se divulga en el presente documento, en donde a) el dominio variable de cadena pesada comprende una primera secuencia de CDR que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 80, una segunda secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 817 y una tercera secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 82; y b) el dominio variable de cadena ligera comprende una primera secuencia de CDR que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 83, una segunda secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 84 y una tercera secuencia de CDR que consiste de la SEC ID N°. 85. En una realización, el anticuerpo se utiliza para tratar enfermedades que incluyen dermatitis atópica, dermatitis de contacto, reacciones alérgicas inducidas por fármacos, prurito por virus trópico cutáneo o asociado a virus, vitíligo, linfoma de linfocitos T cutáneos, alopecia aerata, acné rosácea, acné vulgar, prurito nodular y penfigoide buloso, como se describe en el presente documento. En otra realización, se miden las quimiocinas tales como TARC o MDC.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo que compite por unión específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID N°. 2, en donde el anticuerpo monoclonal comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que se seleccionan del grupo que consiste de: a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 8 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 9; b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 10 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 11; c) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEC ID N° 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 13; d) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 14 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 15; e) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 16 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 17; f) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 18 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 19; g) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 20 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 21; h) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 22 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 23; i) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 24 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25; j) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 27 y en el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo se utiliza junto con una molécula Fc de IgG4 humana. En una realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo inhibe, bloquea o neutraliza la interacción de IL-31 (SEC ID N° 2) con IL-31RA (SEC ID N° 5) dentro de otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de: (a) anticuerpo monoclonal murino o fragmento de anticuerpo; (b) anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo y (c) anticuerpo monoclonal humano. Dentro de otra realización, el anticuerpo comprende además PEGilación.

Dentro de otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de: a) un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo que compite por unión específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste de: i) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9; y ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 27; y b) un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo que compite por unión específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste de: i) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 11; y ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 13; iii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 14 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 15; iv) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 16 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 17; v) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 18 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 19; vi) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 20 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 21; vii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 22 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 23; y viii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 24 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25; y en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo se utiliza junto con una molécula Fc de IgG4 humana. Dentro de una realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo inhibe, bloquea o neutraliza la interacción de IL-31 (SEC ID N° 2) con IL-31RA (SEC ID N° 5) dentro de otra realización, en anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo compite por la unión específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste de: a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9; y b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 27; y en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo se utiliza junto con la molécula Fc de IgG4 humana. Dentro de otra realización, el anticuerpo monoclonal se selecciona del grupo que consiste de: (a) un anticuerpo monoclonal murino o fragmento de anticuerpo; (b) un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo; y (c) un anticuerpo monoclonal humano. Dentro de otra realización el anticuerpo comprende además PEGilación. Dentro de otra realización, el anticuerpo

monoclonal o fragmento de anticuerpo compite por la unión específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 2, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste de: a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 10 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 11; b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 13; c) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 14 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 15; d) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 16 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 17; e) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 18 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 19; f) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 20 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 21; g) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 22 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 23; y h) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 24 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 25. En otra realización, el anticuerpo monoclonal se selecciona del grupo que consiste de: (a) un anticuerpo monoclonal murino o un fragmento de anticuerpo; (b) un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo; y (c) un anticuerpo monoclonal humano. En otra realización, el anticuerpo comprende además PEGilación.

En otro aspecto, la divulgación proporciona reducir, bloquear, inhibir o neutralizar inflamación en un mamífero, que comprende administrar al mamífero un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo que compite por unión específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 2, en donde el anticuerpo monoclonal comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste de: a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 8 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 9; b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 10 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 11; c) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 13; d) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 14 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 15; e) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 16 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 17; f) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 18 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 19; g) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 20 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 21; h) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 22 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 23; i) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 24 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 25; y j) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 26 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 27 y en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo se utiliza junto con la molécula Fc de IgG4 humana. En una realización, la administración del anticuerpo al mamífero reduce, bloquea, inhibe o neutraliza la producción de quimiocinas proinflamatorias. En una realización adicional, las quimiocinas proinflamatorias son TARC o MDC. En otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo compiten por la unión específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste de: a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 8 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 9; y b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 26 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 27, y donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo se utiliza junto con una molécula Fc de IgG4 humana. En otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo compite por unión específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 2, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste de: a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 10 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 11; b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o. 13; c) una región variable de cadena ligera que

anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo reduce, bloquea, inhibe o neutraliza la dermatitis. Dentro de una realización adicional, la dermatitis es dermatitis atópica o prurito nodular.

5 Dentro de otro aspecto, la divulgación describe reducir, bloquear, inhibir o neutralizar el rascado en un mamífero, que comprende administrar al mamífero un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo que compite por unión específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, en donde el anticuerpo monoclonal comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que se seleccionan del grupo que consiste de: a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9; b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 11; c) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 13; d) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 14 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 15; e) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 16 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 17; f) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 18 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 19; g) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 20 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 21; h) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 22 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 23; i) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 24 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25; y j) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 27 y en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo se utiliza junto con una molécula Fc de IgG4 humana. Dentro de otra realización, el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo compite por la unión específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste de: a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9; y b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 27, y en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo se utiliza junto con una molécula Fc de IgG4 humana. Dentro de otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo compite por unión específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste de: a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 11; b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 13; c) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 14 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 15; d) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 16 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 17; e) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 18 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 19; f) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 20 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 21; g) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 22 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 23; y h) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 24 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25.

60 Dentro de otro aspecto, la presente memoria describe un procedimiento para inhibir la proliferación o diferenciación, inducida por IL-31, de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas que comprende cultivar médula ósea o células de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 como se describe en el presente documento suficientes para reducir la proliferación o diferenciación de las células hematopoyéticas en la médula ósea o células de sangre periférica en comparación con la médula ósea o células de sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor de citocina soluble. En una realización, inhibir proliferación o diferenciación inducida por IL-31 de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es como se describe anteriormente, en donde las células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, inhibir proliferación o diferenciación

inducida por IL-31 de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es como se describe anteriormente, en donde las células linfoides son macrófagos o linfocitos T.

5 Dentro de otro aspecto, la presente memoria describe reducir inflamación inducida, inducida por IL-31, a un mamífero con inflamación usando una cantidad de una composición de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31, como se describe en el presente documento, suficientes para reducir la inflamación.

10 Dentro de otro aspecto, la memoria descriptiva describe suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación, que comprende: (1) determinar el nivel de una molécula inflamatoria; (2) tras la administración de una composición que comprende moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 como se divulga en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable; determinar un nivel post-administración de la molécula inflamatoria; (3) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (2), en donde una carencia de incremento o una disminución en el nivel de molécula inflamatoria es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria. En una realización, el anticuerpo es como el desvelado anteriormente, en el que el anticuerpo comprende además un radionúclido, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimioiluminiscente, etiqueta péptida, partícula magnética, fármaco o toxina.

20 Dentro de otro aspecto, la presente memoria describe inhibir la proliferación o diferenciación, inducida por IL-31, de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas que comprende cultivar médula ósea o células de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 como se describe en el presente documento suficientes para reducir la proliferación o diferenciación de las células hematopoyéticas en la médula ósea o células de sangre periférica en comparación con la médula ósea o células de sangre periférica cultivadas en ausencia del receptor de citocina soluble. En una realización, el procedimiento para inhibir proliferación o diferenciación inducida por IL-31 de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es como se describe anteriormente, en donde las células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, el procedimiento para inhibir proliferación o diferenciación inducida por IL-31 de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas es como se describe anteriormente, en donde las células linfoides son macrófagos o linfocitos T.

30 Dentro de otro aspecto, la presente memoria describe reducir inflamación inducida, inducida por IL-31, que comprende administrar a un mamífero con inflamación una cantidad de una composición de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31, como se describe en el presente documento, suficientes para reducir la inflamación.

35 Dentro de otro aspecto, la presente memoria describe suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación, que comprende: (1) determinar el nivel de una molécula inflamatoria; (2) administrar una composición que comprende moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 como se divulga en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable; determinar un nivel post-administración de la molécula inflamatoria; (3) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (2), en donde una carencia de incremento o una disminución en el nivel de molécula inflamatoria es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria.

45 Dentro de otro aspecto, la presente memoria describe tratar a un mamífero que presenta una enfermedad inflamatoria en el cual IL-31 juega un papel, usar un antagonista de IL-31 de manera tal que se reduzca la inflamación, en donde el antagonista se selecciona del grupo que consiste de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 que se unen específicamente a un polipéptido o fragmento polipeptídico de IL-31 (SEC ID N° 2). En una realización, el tratamiento de un mamífero con una enfermedad inflamatoria es como se describe en lo anterior, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica. En otra realización, el mamífero con una enfermedad inflamatoria es como se describe en lo anterior, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica que se selecciona del grupo que consiste de: enfermedad de intestino inflamatorio; colitis ulcerativa; enfermedad de Crohn; dermatitis atópica; eczema y psoriasis. En otra realización, tratar a un mamífero con una enfermedad inflamatoria es como se describe en lo anterior, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda. En otra realización, tratar a un mamífero con una enfermedad inflamatoria es como se describe en lo anterior, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda que se selecciona del grupo que consiste de: endotoxemia; septicemia; síndrome de choque tóxico y enfermedad infecciosa. En otra realización, el tratar a un mamífero afligido con una enfermedad inflamatoria es como se divulga anteriormente, en donde el anticuerpo comprende además un radionúclido, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimioiluminiscente, etiqueta péptida, partícula magnética, fármacos o toxina.

60 En otro aspecto, la presente memoria describe detectar inflamación en un paciente, que comprende: obtener un tejido o una muestra biológica de un paciente; incubar el tejido o muestra biológica con moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 como se describe en el presente documento bajo condiciones en donde las moléculas de unión de IL-31 o los antagonistas de IL-31 se unen a su polipéptido complementario en el tejido o la muestra biológica; visualizar las moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 unidas en el tejido o la muestra biológica; y comparar los niveles de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 unidos en el tejido o muestra biológica del paciente en comparación con un tejido o muestra biológica control normal, en donde un incremento en el nivel de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 unidos al tejido o muestra biológica

del paciente en relación al tejido o muestra biológica control normal es indicativo de inflamación en el paciente.

La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

5 **Ejemplos**

Ejemplo 1

Determinación de las Regiones Variables

10

Las secuencias de las regiones variables de la cadena ligera y pesada se determinaron de la siguiente manera:

Extracción de ARN/producción de ADNc listo para 5' RACE Ready

15

Se recolectaron líneas de células de hibridoma (aproximadamente 4.5×10^6 células) por centrifugación después de lavado en PBS 1X. Se purificó el ARN utilizando el equipo de mini purificación Qiagen RNeasy de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN resultante se muestra en E-Gel 1.2 % para validación. La síntesis de ADNc de la primera cadena se realiza utilizando el equipo de amplificación de ADNc BD Biosciences BD SMART RACE, el cual proporciona el ADNc listo para 5'RACE Ready.

20

Amplificación de las secuencias de la región variable de la cadena ligera y pesada

25

El ADNc 5'RACE ready se utiliza como plantilla para PCR como se describe en el equipo de amplificación de ADNc BD Biosciences BD SMART RACE. Las amplificaciones por PCR tanto de la cadena pesada como ligera utilizaron UPM 10X (mezcla de cebador universal) proporcionada por los equipos en el oligonucleótido 5' PCR. Los oligonucleótidos 3' PCR son los siguientes:

30

Ratón κ (zc54289: 5'-CGACTGAGCCACCTCCAGATGTTAACTGCTCAC-3' SEC ID N°. 28)

Ratón IgG1 (zc54983: 5'-CAGGGGCCAGTGGATAGACAGATGGGG-3' SEC ID N°. 29)

Ratón IgG2a (zc55640: 5'-CAGGGGCCAGTGGATAGACCGATGGGG-3' SEC ID N°. 30)

35

Los productos de PCR de la secuencia de la región variable de las cadenas ligera y pesada se purifican en gel utilizando GE Healthcare illustra GFX tm PCR ADN y el equipo de purificación Gel Band y se clonan por el equipo de clonación Invitrogen TOPO TA. se criban ocho colonias individuales por hibridoma por región variable, por colonia de PCR con los cebadores de equipo M13R y M13F y se envían para secuenciado. El secuenciado se realiza utilizando el equipo de secuenciado ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Cycle (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones de secuencias se purifican utilizando cartuchos de filtración en gel EdgeBioSystems Centriflex (Gaithersburg, MD) y se corren en un secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los datos de secuencia resultante se ensamblan y editan utilizando el programa Sequencher v4.1 (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, MI).

40

La tabla 1 muestra las SEC ID N^{OS}:: para las secuencias de las regiones variables, las cuales se describen adicionalmente en las figuras 1-4.

45

Tabla 1. Números de listados de secuencia para las regiones ligera variable y pesada variable.

Número de clon	Región variable de la cadena ligera, SEC ID N°:	Región variable de la cadena ligera con secuencia de señal, SEC ID N°:	Región variable de la cadena pesada, SEC ID N°:	Región variable de la cadena pesada con la secuencia de señal, SEC ID N°:
292.12.3.1	8	31	9	32
292.84.1.6	8 con Arg sustituido en la posición 42	31 con Arg sustituido en la posición 62	9 con sustituciones: - Thr en la posición 50; - Ser en la posición 69; - Asn en la posición 77; y - Phe en la posición 95	32 con sustituciones: - Thr en la posición 50; - Ser en la posición 88; - Asn en la posición 95; y - Phe en la posición 114
292.63.5.3	10	33	11	34
294.144.3.5	12	35	13	36
292.39.5.3	14	37	15	38
292.51.5.2	16	39	17	40
292.64.6.5.5	18	41	19	42
292.105.4.1	20	43	21	44
292.109.4.4	22	45	23	46
292.118.6.4	24	47	25	48
292.72.3.1	26	49	27	50

5 Tabla 2 que muestra las SEC ID N°. para las secuencias de las regiones variables, las cuales se describen adicionalmente en las figuras 1-4.

Tabla 2: Números de listados de secuencias para las CDR de las regiones ligera variable y pesada variable

Número de clon	CDR1 de la región pesada variable	CDR2 de la región pesada variable	CDR3 de la región pesada variable	CDR1 de la región ligera variable	CDR2 de la región ligera variable	CDR3 de la región ligera variable
292.12.3.1	SEC ID N°.: 51 (CDR1 VH de 292.12.3.1) RYWMQ	SEC ID N°.: 52 (CDR2 VH de 292.12.3.1): AIYPGDGTRYQKFKG	SEC ID N°.: 53: (CDR3 VH de 292.12.3.1): PDGYYAAPYGMDY	SEC ID N°.: 54: (CDR1 VL de 292.12.3.1): RASGNIHNYLA	SEC ID N°.: 55: (CDR2 VL de 292.12.3.1): NAKTLAD	SEC ID N°.: 56: (CDR3 VL de 292.12.3.1): QHFWSPTWT
293.84.1.6	SEC ID N°.: 51 (CDR1 VH de 292.12.3.1): RYWMQ	SEC ID N°.: 57 (CDR2 VH de 292.84.1.6): TIYPGDGTRYQKFKG	SEC ID N°.: 53: (CDR3 VH de 292.12.3.1): PDGYYAAPY GMDY	SEC ID N°.: 54: (CDR1 VL de 292.12.3.1): RASGNIHNYLA	SEC ID N°.: 55: (CDR2 VL de 292.12.3.1): NAKTLAD	SEC ID N°.: 56: (CDR3 VL de 292.12.3.1): QHFWSPTWT
292.72.3.1	SEC ID N°.: 51 (CDR1 VH de 292.12.3.1): RYWMQ	SEC ID N°.: 58 (CDR2 VH de 292.72.3.1): AIYPRDGDTRYQKFKG	SEC ID NO.: 59: (CDR3 VH de 292.72.3.1): PDGSYAAPN GMEY	SEC ID N°.: 60: (CDR1 VL de 292.72.3.1): RASGNIHNYLA	SEC ID N°.: 61: (CDR2 VL de 292.72.3.1): NAETLAD	SEC ID N°.: 62: (CDR3 VL de 292.72.3.1): QHFWSPTWT
292.63.5.3	SEC ID N°.: 63 (CDR1 VH de 292.63.5.3): TFIMS	SEC ID N°.: 64 (CDR2 VH de 292.63.5.3: TINSGGYYT FHPDSVKG	SEC ID N°.: 65: (CDR3 VH de 292.63.5.3): QEGWSSAYFSY	SEC ID N°.: 66: (CDR1 VL de 292.63.5.3): KSSQSLNNGSNQKNYLA	SEC ID N°.: 67: (CDR2 VL de 292.63.5.3): FASTRDS	SEC ID N°.: 68: (CDR3 VL de 292.63.5.3): QQHYDTPYT
292.39.5.3	SEC ID N°.: 69 (CDR1 VH de 292.39.5.3): TYIMS	SEC ID N°.: 70 (CDR2 VH de 292.39.5.3: TINSGGYYT LYPDSVKG	SEC ID N°.: 71: (CDR3 VH de 292.39.5.3): QEGWSSAWFAY	SEC ID N°.: 72: (CDR1 VL de 292.39.5.3): NSSQSLNNS NQKNYLA	SEC ID N°.: 73: (CDR2 VL de 292.39.5.3): FASTGES	SEC ID N°.: 74: (CDR3 VL de 292.39.5.3): QQHFSTPYT
292.51.5.2	SEC ID N°.: 75 (CDR1 VH de 292.51.5.2): SFVMS	SEC ID N°.: 76 (CDR2 VH de 292.51.5.2: TINSGGYYSFHPDSVKG	SEC ID N°.: 65: (CDR3 VH de 292.63.5.3): QBCWSSAVFSY	SEC ID N°.: 77: (CDR1 VL de 292.51.5.2): KSSQSLNNS NQKNYLA	SEC ID N°.: 78: (CDR2 VL de 292.51.5.2): FTSTRES	SEC ID N°.: 68: (CDR3 VL de 292.63.5.3): QQHYDTPYT
292.64.6.5.5	SEC ID N°.: 69 (CDR1 VH de 292.39.5.3): TYIMS	SEC ID N°.: 70 (CDR2 VH de 292.39.5.3: TINSGGYYT LYPDSVKG	SEC ID N°.: 71: (CDR3 VH de 292.39.5.3): QEGWSSAWFAY	SEC ID N°.: 72: (CDR1 VL de 292.39.5.3): NSSQSLNNS NQKNYLA	SEC ID N°.: 73: (CDR2 VL de 292.39.5.3): FASTGES	SEC ID N°.: 74: (CDR3 VL de 292.39.5.3): QQHFSTPYT
292.105.4.1	SEC ID N°.: 69 (CDR1 VH de 292.39.5.3): TYIMS	SEC ID N°.: 70 (CDR2 VH de 292.39.5.3: TINSGGYYT LYPDSVKG	SEC ID N°.: 71: (CDR3 VH de 292.39.5.3): QEGWSSAWFAY	SEC ID N°.: 72: (CDR1 VL de 292.39.5.3): NSSQSLNNS NQKNYLA	SEC ID N°.: 73: (CDR2 VL de 292.39.5.3): FASTGES	SEC ID N°.: 74: (CDR3 VL de 292.39.5.3): QQHFSTPYT

Número de clon	CDRI de la región pesada variable	CDR2 de la región pesada variable	CDR3 de la región pesada variable	CDRI de la región ligera variable	CDR2 de la región ligera variable	CDR3 de la región ligera variable
292.109.4.4	SEC ID N°.: 69 (CDR1 VH de 292.39.5.3): TYIMS	SEC ID N°.: 70 (CDR2 VH de 292.39.5.3): TINSGGYT LYPDSVKG	SEC ID N°.: 71: (CDR3 VH de 292.39.5.3): QEGWSSAW FAY	SEC ID N°.: 72: (CDR1 VL de 292.39.5.3): NSSQSLNSSN QKNYLA	SEC ID N°.: 73: (CDR2 VL de 292.39.5.3): FASTGES	SEC ID N°.: 74: (CDR3 VL de 292.39.5.3): QQHFSTPYT
292.118.6.4	SEC ID N°.: 69 (CDR1 VH de 292.39.5.3): TYIMS	SEC ID N°.: 79 (CDR2 VH de 292.118.6.4): TINSGGYT IYPDSVKG	SEC ID N°.: 71: (CDR3 VH de 292.39.5.3): QEGWSSAW FAY	SEC ID N°.: 72: (CDR1 VL de 292.39.5.3): NSSQSLNSSN QKNYLA	SEC ID N°.: 73: (CDR2 VL de 292.39.5.3): FASTGES	SEC ID N°.: 74: (CDR3 VL de 292.39.5.3): QQHFSTPYT
292.144.3.5	SEC ID N°.: 80 (CDR1 VH de 292.144.3.5): TYWIE	SEC ID N°.: 81 (CDR2 VH de 292.144.3.5): EILPGRGTT NYNAKFQG	SEC ID N°.: 82: (CDR3 VH de 292.144.3.5): ESKLGDDDY	SEC ID N°.: 83: (CDR1 VL de 292.144.3.5): SASSSVSYM	SEC ID N°.: 84: (CDR2 VL de 292.144.3.5): DTTKLAS	SEC ID N°.: 85: (CDR3 VL de 292.144.3.5): FQGSEHPLT

Los hibridomas 292.12.3.1 y 292.84.1.6 expresan cadenas ligera y pesada que comparten identidad de secuencia extensa entre sí. Las alineaciones de secuencia de aminoácidos de 292.12.3.1 y 292.84.1.6 de las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada se muestran en la figura 2. El alto grado de identidad de secuencia compartida sugiere que las regiones variables de la cadena ligera se derivan del mismo gen de línea germinal de la región variable de la cadena ligera, mientras que las regiones variables de la cadena pesada también se derivan del mismo gen de la línea germinal de la región variable de la cadena pesada. Adicionalmente, la identidad a través de las CDR3 de la cadena ligera y pesada y FR4 indican la utilización del mismo JL en la cadena ligera y las mismas regiones JH y D así como las adiciones nucleotídicas N y P en la CDR3 de la cadena pesada. Ambos hibridomas, 292.12.3.1 y 202.84.1.6 expresan cadenas ligeras κ pero 202.12.3.1 expresa la cadena pesada de IgG1 mientras que 292.84.1.6 expresa la cadena pesada de IgG2a. Parece que ambos hibridomas son derivados de los mismos eventos de rearreglos de los loci de inmunoglobulina de linfocitos B iniciales y que 292.84.1.6 es el resultado de una clase subsecuente de conmutación a la cadena pesada de IgG2a. Ya sea antes o después, la conmutación de la clase 292.12.3.1 y 292.84.1.6 divergen por la incorporación de ciertas mutaciones somáticas las cuales llevan a una diferencia única de aminoácido en la cadena ligera y diferencias de cuatro aminoácidos en la cadena pesada.

Ejemplo 2

Determinación de la secuencia proteínica de la parte amino terminal

Se utiliza el secuenciado de proteína de la parte N terminal para determinar las secuencias de anticuerpo de cadena pesada y ligera. Los anticuerpos se procesan con el fin de tratamiento con piroglutamato aminopeptidasa (PGAP). Las muestras no tratadas se procesan por adición de 100 picomoles (pmol) de proteína y agua. Las muestras tratadas con PGAP se procesan por adición de 100 pmoles de proteína, agua, SDS 0.3 %, amortiguador PGAP 5X (Takar Bio Inc., Japón) y la enzima PGAP (1 mU) en amortiguador PGAP. La reacción de PGAP se corre durante 10 minutos a 95°C. Este tratamiento enzimático elimina los grupos de ácido piroglutámico bloqueadores en la parte N terminal. El amortiguador SDS PAGE reductor se agrega tanto a las muestras no tratadas como tratadas con PGAP y después las muestras se calientan durante 5 minutos en un baño de agua en ebullición. Las muestras se corren en un gel de gradiente SDS PAGE. El gel se transfiere a una membrana PVDF y se tiñen con azul de coomassie. Se observan dos bandas visibles para cada muestra con pesos moleculares aparentes, en SDS PAGE de 50 kDa y 25 kDa. Cada banda se corta y se somete a secuenciado de proteína de la parte N-terminal. Se corren veinte ciclos de secuencia para determinar la secuencia.

Ejemplo 3

Análisis con luciferasa sobre líneas de células epiteliales transformadas humanas por medio de infección transitoria con un gen indicador adenoviral STAT/SRE

La inhibición, reducción y/o naturalización de la actividad de IL-31 se puede medir por el análisis con luciferasa. Por ejemplo, se pueden sembrar líneas de células transformadas humanas en placas de fondo plano de 96 pocillos a 10,000 células/pocillo en un medio de crecimiento regular, como se especifica para cada tipo de célula. Al día siguiente se infectan las células con una construcción indicadora de adenovirus, KZ136 a una multiplicidad de infección de 5000. El indicador KZ136 contiene los elementos STAT además del elemento de respuesta de suero. El volumen total de 100 μ l/pocillo utilizando DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM (GibcoBRL), piruvato de sodio 1 mM (GibcoBRL) y suplemento de insulina-transferina-selenio 1x (GibcoBRL) (a continuación denominado como medio libre de suero). Las células se cultivan durante la noche.

El día siguiente se retira el medio y se sustituye con 100 μ l de medio de inducción. El medio de inducción es IL-31 humana diluida en medio libre de suero a 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25 ng/ml, 3.125 ng/ml y 1.56 ng/ml. Se utiliza un control positivo de FBS 20 % para validar el análisis y asegurar que la inyección por adenovirus es exitosa. Las células se inducen durante 5 horas, tiempo en el cual se aspira el medio. Las células después se lavan con 50 μ l/pocillo de PBS y posteriormente se lisan en 30 μ l/pocillo de amortiguador de lisis celular 1X (Promega). Después de una incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, 25 μ l/pocillo del lisado se transfieren a placas de 96 pocillos blancas, opacas. Las placas después se leen en un luminómetro utilizando integración durante 5 segundos con 40 μ l/pocillo de inyección de sustratos de luciferasa (Promega).

Ejemplo 4

Bioanálisis de IL-31

Células BAF3 transfectadas con hzCYTOR17 (IL-31RA), hOSMRB y KZ134 se hacen crecer a 5×10^5 y 1×10^6 células/ml. Las células se lavan con medio de análisis (RPMI 1640, FBS 10 %, L-Glutamina, piruvato de sodio y Pen/Strep (todos de Gibco)) y se resuspenden hasta 3×10^5 células/ml en medio de análisis. En una placa opaca de 96 pocillos se titulan estándares de hIL-31 por duplicado desde 600 pg/ml a 9.38 pg/ml en medio de análisis por medio de 100 μ l/pocillo, dilución seriada 1:2. Los estándares de control de calidad se agregan por duplicado a la placa a 350 pg/ml y 35 μ g/ml en 100 μ l. Las muestras de prueba después se diluyen 1:2 ó 1:4 y se agregan por duplicado a los pocillos de muestra. Se agregan a cada pocillo 100 μ l de células BAF3 lavadas para una

concentración final de 3×10^4 células/pocillo. La placa se incuba durante 16-24 horas a $+37^\circ\text{C}$ en un incubador con CO_2 5 %. La placa se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos, el medio se extrae y se agregan a cada pocillo 25 μl /pocillo de amortiguador de lisis (Promega). Después de 10 minutos se leen las placas en un luminómetro (Berthold). El luminómetro agrega 40 μl /pocillo de mezcla de sustrato de luciferasa (Promega) y se integra la luminiscencia por un período de 4 segundos. Los valores de luminiscencia se exportan a una hora de cálculo en donde se analizan y convierten en picogramos de IL-31 por 10^6 células por ml de volumen.

Ejemplo 5

10 Relación de IL-31 en el inicio y perpetuación de hipersensibilidad de contacto *in vivo*

Procedimiento I

15 A ratones BALB/c se les pinta en la parte media del lomo rasurada con 25 μl de DNFB 0.5 % disuelto (2,4-dinitrofluorobenceno, Sigma, St. Louis MO) en solución de acetona:aceite de oliva (4:1) utilizando una pipeta. Un grupo control con vehículo recibe 25 μl de acetona:aceite de oliva únicamente. Después de 5 días se anestesia a los ratones con isoflurano en una cámara de inhalación y tanto la punta de la oreja de los animales experimentales como los controles se mide con un micrómetro de ingeniero (Mitutoyo) para obtener una medición basal. Después a los ratones se les expone al aplicar 10 μl de DNFB 0.25 % en acetona:aceite de oliva (4:1) en ambos lados de cada oreja a todos los ratones. Se mide la hipersensibilidad por contacto a las 24 h y 48 h después, como la diferencia entre la oreja derecha (expuesta) y la oreja izquierda (no expuesta). Todas las mediciones se realizan con el micrómetro para ingenieros. Se determinan los valores de fondo por la diferencia en la inserción de la oreja entre las orejas expuestas y no expuestas de ratones que previamente no han sido expuestos.

25 La sangre completa y el suero para análisis FACS y/o ELISA se recolecta antes de matar a los ratones y las orejas se extirpan para análisis histológico.

Procedimiento II (Induce respuestas Th2)

30 A ratones BALB/c se les pinta en la parte media del lomo rasurada con 100 μl de FITC 0.5 % (isotiocianato de fluoresceína) en una solución 1:1 de acetona/ftalato de dibutilo (MSDS disponible utilizando pipeta los días 1, 2 y 8). En el día 13 se anestesia a los ratones con isoflurano en una cámara de inhalación y las puntas de las orejas de los animales experimentales y control se miden con un micrómetro de ingeniero (Mitutoyo) para obtener una medición basal. Se expone a los ratones al aplicarles 25 μl de FITC 0.5 % (en 1:1 de acetona/ftalato de dibutilo) en la superficie dorsal de cada oreja. Se mide la hipersensibilidad por contacto a las 24 h y 48 h después como la diferencia entre la oreja derecha (expuesta) y la oreja izquierda (no expuesta). Todas las mediciones se realizan con un micrómetro de ingeniero. Se determinan los valores de fondo por la diferencia en la hinchazón de la oreja entre las orejas expuestas y no expuesta de ratones que previamente no han sido expuestos. La sangre completa y el suero para análisis por FACS y/o ELISA se recolectan antes de matar a los ratones y las orejas se extirpan para análisis histológico.

Procedimiento III (induce respuestas Th1)

45 A ratones BALB/c se les pinta en la parte media del lomo, rasurada, con 25 μl de oxazolona 2 % (en 4:1 de acetona/aceite de oliva) utilizando una pipeta. En el día 7, se anestesia a los ratones con isoflurano en una cámara de inhalación y las puntas de las orejas de los animales experimentales y control se miden con un micrómetro de ingeniero (Mitutoyo) para obtener una medición basal. Los ratones se exponen al aplicar 8 μl de oxazolona en la superficie dorsal de cada oreja. Se mide la hipersensibilidad por contacto a las 24 h y 48 h después como la diferencia entre la oreja derecha (expuesta) y la oreja izquierda (no expuesta). Todas las mediciones se realizan con un micrómetro de ingeniero. Se determinan los valores de fondo por la diferencia en la hinchazón de la oreja entre las orejas expuesta y no expuesta de ratones previamente no expuestos. La sangre completa y el suero para los análisis de FACS y/o ELISA se recolecta antes de matar a los ratones y se extirpan las orejas para realizar análisis histológico.

55 Se prueba la relación de IL-31 en el inicio y perpetuación de la hipersensibilidad por contacto utilizando moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento, contra IL-31 en las fases tanto de sensibilización como de exposición del experimento.

Ejemplo 6

60 Relación de IL-31 en dermatitis atópica *in vivo*

Procedimiento I (sensibilización de ratones NC/Nga)

65 Ratones NC/Nga macho de 4 semanas de edad (CRL, Japón) se albergan en condiciones de cuarentena SPF durante 4 semanas para aclimatarlos. Los ratones son de aproximadamente 10-11 semanas de edad al inicio de la

sensibilización con antígeno. Se anestesia a los ratones con isoflurano y se rasura la parte trasera de los lomos con una rasuradora eléctrica. Aproximadamente 10 ug de extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) (Indoor Biotechnologies, solicitud especial) se inyecta intradérmicamente en la nuca de 3 veces por semana durante 5 a 6 semanas hasta que los ratones desarrollan lesiones cutáneas. Los animales control reciben 10 ul de inyecciones intradérmicas de PBS 3 veces por semana. Se prepara el extracto de Dp de acuerdo con el procedimiento de Matsuoka y colaboradores. Matsuoka H., *et al.*, *Allergy*. 58, 139 (2003). Brevemente, 595 mg de extracto de cultivo agotado liofilizado de Dp se disuelve en 12 ml de PBS estéril (Gibco). Se mezcla Dp en un tubo Falcon de 50 ml en un oscilador de agitación durante 30 minutos. El extracto se centrifuga durante 10 minutos a 2000 rpm y el sobrenadante se recolecta y se toman alícuotas en tubos de frascos criogénicos de 1 ml y se almacena a -20°C.

Los efectos de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 se miden por inhibición de rascado, prurito y/o dermatitis.

Procedimientos II (Sensibilización de ratones DO11.10)

Se crían ratones transgénicos DO11.10 a partir de una colonia endogámica y tienen 9.5 y 14 semanas de edad al inicio de la sensibilización con antígeno. A las 24 horas antes de la sensibilización epicutánea se anestesian a los ratones con isoflurano y el tronco completo (lomo y abdomen) de los ratones se rasura con rasuradora eléctrica. A los ratones después se les colocan tiras de cinta adhesiva con cinta quirúrgica elastina (Johnson y Johnson) en el lomo. Se humedecen parches calibrados estériles de 1 cm² con 500 µg de ovalbúmina (Calbiochem 32467) o PBS estéril (Gibco) y se adhiere al lado trasero izquierdo de ratones con el apósito extradelgado DuoDerm (CovaTec 187932). El parche y el apósito después se cubren en una envoltura para el cuerpo de la cinta quirúrgica de elastina de manera que el ratón no puede quitar o destruir los parches. Los parches se colocan durante 7 días y se retiran. Se deja reposar a los ratones durante dos semanas antes de que se realice otra ronda de sensibilización epicutánea. Los ratones reciben un total de tres sensibilizaciones de una semana.

Los efectos de las moléculas de unión a IL-31 o antagonistas de IL-31 se miden por inhibición de rascado, prurito y/o dermatitis y/o una reducción en la expresión de IL-31RA en queratinocitos.

Ejemplo 7

Reducción de TARC y MDC en respuesta a anticuerpo anti-IL-31 en modelos de ratón AD

Procedimiento I

Se sensibiliza intradérmicamente a ratones NC/Nga macho de seis semanas de edad (CRL Japón) con 50 µg de extracto de polvo de ácaro (*D. pteronyssinus*, Indoor Biotechnologies) tres veces a la semana en el lomo y se califica para lesiones similares a AD. Después de 5 semanas de sensibilización se mata a los ratones y se extirpan las orejas derechas y se colocan en un pocillo único de un recipiente de cultivo de 48 pocillos (Corning) suplementado con RPMI-FBS 2 % (GIBCO Invitrogen). Se colocan placas en incubadoras con humedad controlada y CO₂ 5 %. Los sobrenadantes se recolectan después de 24 horas y se congelan a -20°C hasta análisis adicionales.

Procedimiento II

Se sensibiliza intradérmicamente a ratones NC/Nga hembra de doce semanas de edad (CRL, Japón) con 10 µg de SEB (Toxin Technology) en la oreja y en el lomo, tres veces por semana. Se califica a los ratones para lesiones similares a AD. Después de 5 semanas de sensibilización se mata a los ratones y se toman perforaciones de biopsia de 6 mm de la oreja inyectada de cada ratón y se colocan en un pocillo único de un recipiente de cultivo de 48 pocillos suplementado con RPMI+ FBS 2 %. Las placas se colocan en incubadoras con humedad controlada y CO₂ 5 %. Los sobrenadantes se recolectan después de 24 horas y se congelan a -20°C hasta análisis adicional.

Los grupos de ratones en ambos estudios se tratan con moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 intraperitonealmente dos veces cada semana comenzando después de una a dos semanas de sensibilización.

Las concentraciones de TARC y MDC en las muestras de sobrenadante de 24 horas se miden por ELISA convencional (R&D Systems).

Ejemplo 8

Administración del anticuerpo neutralizante de IL-31

A ratones BALB/c hembra normales (CRL) de aproximadamente 8 a 12 semanas de edad se les implanta subcutáneamente con bombas osmóticas durante 14 días (Alzet, #2002) suministrando 1 ug/día de mIL-31. Los grupos de ratones recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) de anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-31 de ratón, 10 mg/kg (200 ug/ratón) dos veces a la semana comenzando una semana antes del suministro de IL-31. Los grupos control de ratones recibieron inyecciones (i.p.) de vehículo (PBS/BSA 0.1 %) con protocolos de dosificación

idénticos. Los ratones se califican diariamente para alopecia y prurito utilizando los siguientes criterios: 0 = sin rascado, los animales tienen una apariencia normal, 1 = adelgazamiento de la piel en áreas pequeñas, se observa rascado, 2 = pérdida menor de pelo (parches pequeños), rascado, 3 = pérdida moderada de pelo, rascado y 4 = pérdida grave de pelo, rascado excesivo.

Los efectos de moléculas de unión de IL-31 o antagonistas de IL-31 se miden por un retraso en el inicio de síntomas de aproximadamente 5 a 7 días y una calificación general menor para alopecia y prurito.

Ejemplo 9

Expresión de anticuerpos monoclonales quiméricos recombinantes anti-IL-31 humana

Las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de dos anticuerpos monoclonales de ratón anti-IL-31 humana, 292.12.3.1 y 292.63.5.3, se obtienen por PCR. Las secuencias de ADN se determinan y las construcciones de expresión se generan utilizando secuencias de ADN para la región constante humana.

Las construcciones de expresión de cadena ligera consisten de un híbrido MPSV/CMV promotor/mejorador que dirige la expresión de la región variable de ratón quimérica anti-IL-31 humana fusionada a una región constante κ de inmunoglobulina humana.

Las construcciones de expresión de cadena pesada consisten de un híbrido MPSV/CMV promotor/mejorador que dirige la expresión de la región variable de ratón quimérica anti-IL31 humana fusionada a una región constante de IgG4 de inmunoglobulina humana con una sustitución de aminoácido en la región de bisagra, serina 228 cambia a prolina.

Las construcciones de expresión de cadena ligera y pesada que codifican para las cadenas ligera y pesada quiméricas de cada hibridoma se cotransfectan en células HEK 293F. Se cosecha medio acondicionado después de 4 días. El análisis de transferencia Western demuestra anticuerpo quimérico intacto de tamaño esperado en SDS-PAGE no reductor.

La capacidad de unión de antígeno de los anticuerpos quiméricos se determinó por un protocolo basado en ELISA para medir la CE_{50} aparente (concentración eficaz para unirse a 50 % del antígeno en una concentración fija). El formato de análisis utilizó la inmovilización de anticuerpo de chivo anti-FC humano para captación de anticuerpos monoclonales humanos a partir de medios acondicionados de cultivo celular no procesados. Una serie de dilución de IL-31 biotinado probó el parámetro "C" de un ajuste de 4 parámetros lo cual resulta en un K_d aparente (o CE_{50}) ya sea en ng/ml o nM de IL31. La sensibilidad del análisis es suficientemente alta de manera que se puede evaluar anticuerpo monoclonal diluido o medio acondicionado de cultivo de célula de anticuerpo quimérico. La K_d determinada por este medio todo generalmente se aproxima a la K_d medida para anticuerpos monoclonales homogéneos purificados, medida utilizando Biacore. Ambos anticuerpos quiméricos anti-IL31 muestran valores CE_{50} similares en comparación con el anticuerpo monoclonal de hibridoma de ratón "original" control 292.63.5.3 como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Determinación de CE_{50} de medio acondicionado de transfecciones transitorias en HEK 293F

Muestra	CE_{50} (ng/ml) ^a	CE_{50} (nM) ^a
Quimérico 292.63.5.3	1,3	0,08
Quimérico 292.12.3.1	2,0	0,12
Medio de control HEK 293F no transfectado	Sin unión	Sin unión
Anticuerpo monoclonal control 292.63.5.3 (Lote E9289)	4,3	0,26

^aPromedio de medida duplicada

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics, Inc.

5 <120> REGIÓN VARIABLE DE SECUENCIAS DE IL-31
ANTICUERPOS MONOCLONALES Y PROCEDIMIENTOS DE USO

<130> P33477ep-d2-pct

10 <140> NO ASIGNADA TODAVÍA
<141> 04-09-2007

<150> 60/824.403
<151> 01-09-2006

15 <150> 60/890.792
<151> 20-02-2007
<160> 85

20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 904
<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (28)...(519)

30 <400> 1

ES 2 548 714 T3

```

ctgaagctgg ccttgctctc tctcgcc atg gcc tct cac tca ggc ccc tcg acg 54
Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr
      1                      5

tct gtg ctc ttt ctg ttc tgc tgc ctg gga ggc tgg ctg gcc tcc cac 102
Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His
  10                      15                      20                      25

acg ttg ccc gtc cgt tta cta cga cca agt gat gat gta cag aaa ata 150
Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile
      30                      35                      40

gtc gag gaa tta cag tcc ctc tcg aag atg ctt ttg aaa gat gtg gag 198
Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu
      45                      50                      55

gaa gag aag ggc gtg ctc gtg tcc cag aat tac acg ctg ccg tgt ctc 246
Glu Glu Lys Gly Val Leu Val Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu
      60                      65                      70

agc cct gac gcc cag ccg cca aac aac atc cac agc cca gcc atc cgg 294
Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg
      75                      80                      85

gca tat ctc aag aca atc aga cag cta gac aac aaa tct gtt att gat 342
Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp
  90                      95                      100                      105

gag atc ata gag cac ctc gac aaa ctc ata ttt caa gat gca cca gaa 390
Glu Ile Ile Glu His Leu Asp Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu
      110                      115                      120

aca aac att tct gtg cca aca gac acc cat gaa tgt aaa cgc ttc atc 438
Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile
      125                      130                      135

ctg act att tct caa cag ttt tca gag tgc atg gac ctc gca cta aaa 486
Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys
      140                      145                      150

tca ttg acc tct gga gcc caa cag gcc acc act taaggccatc tcttcctttc 539
Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln Gln Ala Thr Thr
      155                      160

ggattggcag gaacttaagg agccttaaaa agatgaccga cagctaagtg tgggaactct 599
gccgtgattc cttaagtaca tttttccaat gaataatctc agggaccocct catatgggct 659
agtcccggga gggctgagat gtgaatttgt gaattacctt gaaaaacatt aggttattgt 719
tattagtctt ggtatttatg gaatgctttt cttctgcagg cttaagtctt acttattata 779
ccctcgtgag ggtgggaggt ggcagctatg ttaatttatt gatatttatt gtactaagag 839
ttgtcaatgc tccctggggg agccctcgga atctatttaa taaattatat tgaatttttc 899
tcata 904

```

5 <210> 2
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2

ES 2 548 714 T3

```

Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys
 1      5      10
Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu
 20
Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu
 35      40      45
Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu Glu Glu Lys Gly Val Leu Val
 50      55      60
Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro
 65      70      75
Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg
 85      90      95
Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp Glu Ile Ile Glu His Leu Asp
 100
Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr
 115      120      125
Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe
 130      135      140
Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln
 145      150      155
Gln Ala Thr Thr

```

<210> 3
 <211> 755
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(489)
 <400> 3

10

ES 2 548 714 T3

```

atg atc ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc 48
Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys
1 5 10 15

tgt ata gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca 96

Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro
20 25 30

ata tcg aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag 144
Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu
35 40 45

tct cag gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg 192
Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met
50 55 60

tca gca gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa 240
Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu
65 70 75 80

gca tta acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa 288
Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys
85 90 95

gtg ttg agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta 336
Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu
100 105 110

aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct 384
Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro
115 120 125

gga aat act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt 432
Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val
130 135 140

tta aag cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat 480
Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn
145 150 155 160

act aca tgc tgagtgatgg gggggggggg ggtgcagtgt cctcagcagt 529
Thr Thr Cys

gcctgtcett cgagggctga gcttgcaacc caggacttaa ctccaaaggg actgtgcggt 589
cattactagt catgttattt atgtttttat tttgtccact gaaatcttgt tctgtaccc 649
tgtagggact ggaagtggca gctatattta tttatttatg tactgagttt gttaacgctc 709
catggaggag ccttcagagt ctatttaata aattatattg acatga 755

```

- <210> 4
- <211> 163
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 4

ES 2 548 714 T3

```

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

          115              120              125
Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val
      130              135              140
Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn
      145              150              155              160
Thr Thr Cys

```

<210> 5
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

5

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				
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	
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	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
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
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
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
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> 6
 <211> 979
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

ES 2 548 714 T3

Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg Leu Pro Leu
 20 25 30
 Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg Gln Ser Leu
 35 40 45
 His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln Glu Leu Lys
 50 55 60
 Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser Asn Val Ile
 65 70 75 80
 Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln Val Leu His
 85 90 95
 Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr His Phe Val
 100 105 110
 Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu Pro Asn Phe
 115 120 125
 Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln Asp Ser Thr
 130 135 140
 Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu Val Glu Glu
 145 150 155 160
 Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile Gln Asn Asn
 165 170 175
 Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu Gln Leu Asp

ES 2 548 714 T3

Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala
 705 710 715 720
 Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu
 725 730 735
 His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val Phe Cys Val
 740 745 750
 Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Ile Lys Glu
 755 760 765
 Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser
 770 775 780
 Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met Asn Val Ser
 785 790 795 800
 Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro Glu Gly Thr
 805 810 815
 Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu Thr Glu Leu
 820 825 830
 Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys Asn His Ser
 835 840 845
 Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr Asn Gln Ala
 850 855 860
 Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser Pro Lys Ala
 865 870 875 880
 Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val Leu Lys Ala
 885 890 895
 Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro Ala Gly Glu
 900 905 910
 Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met Phe Gly Asp
 915 920 925
 Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His Cys Ser Glu
 930 935 940
 Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu Pro Pro Pro
 945 950 955 960
 Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp Pro Gly Glu
 965 970 975
 His Tyr Cys

5 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido etiqueta Glu-Glu
 <400> 7

Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5

15 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (42)...(0)
 <223> Xaa es Lys o Arg

25 <400> 8

```

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Xaa Ser Pro Gln Leu Leu Val
          35           40
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Arg Ser Glu Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65          70           75           80
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Trp
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105
    
```

- 5 <210> 9
- <211> 122
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

- 10 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (50)...(50)
- <223> Xaa es Ala o Thr

- 15 <221> VARIANTE
- <222> (69)...(69)
- <223> Xaa es Thr o Ser

- 20 <221> VARIANTE
- <222> (77)...(77)
- <223> Xaa es Ser o Asn

- 25 <221> VARIANTE
- <222> 50, 69, 77, 95
- <223> Xaa = cualquier aminoácido

- 30 <400> 9

```

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

ES 2 548 714 T3

<210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 10

```

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

10 <210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 11

```

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

20 <210> 12
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 12

ES 2 548 714 T3

```

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

```

5 <210> 13
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 13

```

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

```

10 <210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus

<400> 14

ES 2 548 714 T3

```

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

```

5 <210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 15

```

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

```

10 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

15 <210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16

ES 2 548 714 T3

```

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

```

5 <210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 17

```

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

```

10 <210> 18
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus

<400> 18

ES 2 548 714 T3

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly
1      5      10      15
Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Asn Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20      25      30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35      40      45
Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Gly Glu Ser Gly Val

```

```

50      55      60
Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65      70      75      80
Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
85      90      95
His Phe Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100      105      110
Arg

```

5 <210> 19
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 19

```

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

```

10 <210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 20

ES 2 548 714 T3

```

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

```

5 <210> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 21

```

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

```

10
 15 <210> 22
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 22

ES 2 548 714 T3

```

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

```

5 <210> 23
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23

```

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

```

10 <210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus

<400> 24

ES 2 548 714 T3

```

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

```

5 <210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 25

```

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

```

10 <210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus

<400> 26

ES 2 548 714 T3

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

5 <210> 27
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 27

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

10 <210> 28
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> Mus musculus
 <400> 28
 cgactgagcc acctccagat gttaactgct cac 33
 20 <210> 29
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 25 <400> 29
 caggggccag tggatagaca gatggggg 28
 <210> 30
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Mus musculus

ES 2 548 714 T3

<400> 30
caggggccag tggatagacc gatgggg 27

5 <210> 31
<211> 127
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (62) ... (62)
<223> Xaa es Lys o Arg

15 <221> SEÑAL
<222> (1) ... (20)

<400> 31

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

20 <210> 32
<211> 141
<212> PRT
<213> Mus musculus

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (69) ... (69)
<223> Xaa es Ala o Thr

30 <221> VARIANTE
<222> (88)...(88)
<223> Xaa es Thr o Ser

35 <221> VARIANTE
<222> (95)...(95)
<223> Xaa es Ser o Asn

40 <221> VARIANTE
<222> (114)...(114)
<223> Xaa es Tyr o Phe

45 <221> SEÑAL
<222> (1)...(19)

<400> 32

ES 2 548 714 T3

```

Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly
 1      5      10      15
Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
      20      25      30
Pro Gly Ala Ser Val Asn Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu
      35      40      45
Thr Arg Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      50      55      60
Glu Trp Ile Gly Xaa Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser
65      70      75      80
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Xaa Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Xaa
      85      90      95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Asn Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val
      100      105      110
Tyr Xaa Cys Ala Phe Pro Asp Gly Tyr Tyr Ala Ala Pro Tyr Gly Met
      115      120      125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
      130      135      140

```

5 <210> 33
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) ... (20)

<400> 33

```

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1      5      10      15
Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Asp
      20      25      30
Met Ser Glu Gly Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser
      35      40      45
Leu Leu Asn Gly Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
      50      55      60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val Ser Phe Ala Ser Thr Arg
65      70      75      80
Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      85      90      95
Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
      100      105      110
Phe Cys Gln Gln His Tyr Asp Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Lys
      115      120      125
Leu Glu Ile Arg
      130

```

15 <210> 34
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) ... (19)

25 <400> 34

ES 2 548 714 T3

```

Met Asn Phe Val Arg Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1      5      10      15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20      25      30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35      40      45
Ser Thr Phe Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu
 50      55      60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Phe His Pro
 65      70      75
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85      90      95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
 100     105
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Tyr Phe Ser Trp
 115     120     125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130     135

```

5 <210> 35
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) ... (21)

<400> 35

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1      5      10      15
Val Ile Met Ser Arg Gly Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20      25      30
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 35      40      45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Asn Ser
 50      55      60
Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Thr Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65      70      75
Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85      90      95
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Phe Gln Gly
 100     105     110
Ser Glu His Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile
 115     120     125

```

15 <210> 36
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) ... (19)

25 <400> 36

```

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1      5      10      15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys
      20      25      30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
      35      40      45
Ser Thr Tyr Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
      50      55      60
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Arg Gly Thr Thr Asn Tyr Asn
65      70      75      80
Ala Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Glu Thr Ser Ser Asn
      85      90      95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
      100      105      110
Tyr Tyr Cys Thr Thr Glu Ser Lys Leu Gly Asp Asp Asp Tyr Trp Gln
      115      120      125
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
      130      135

```

5 <210> 37
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(20)

<400> 37

```

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1      5      10      15
Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
      20      25      30
Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Asn Ser Ser Gln Ser
      35      40      45
Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
      50      55      60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Gly
65      70      75      80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      85      90      95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
      100      105      110
Phe Cys Gln Gln His Phe Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
      115      120      125
Lys Leu Glu Ile Arg
      130

```

15 <210> 38
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(19)

25 <400> 38

```

Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1      5      10
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
      20      25      30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      35      40
Ser Thr Tyr Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu
      50      55      60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Leu Tyr Pro
65      70      75      80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn
      85      90      95
Thr Leu Ser Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
      100      105      110
Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
      115      120      125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
      130      135

```

5 <210> 39
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) ... (20)

<400> 39

```

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1      5      10      15
Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
      20      25      30
Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser

      35      40      45
Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
      50      55      60
Lys Pro Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Val Ser Phe Thr Ser Thr Arg
65      70      75      80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      85      90      95
Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Met Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
      100      105      110
Phe Cys Gln Gln His Tyr Asp Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
      115      120      125
Lys Leu Glu Ile Arg
      130

```

15 <210> 40
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(19)

25 <400> 40


```

Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1      5      10      15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
      20      25      30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      35      40      45
Ser Ser Phe Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu
      50      55      60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Ser Phe His Pro
65      70      75      80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
      85      90      95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
      100      105
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Tyr Phe Ser Tyr
      115      120      125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
      130      135

```

5 <210> 41
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(20)

<400> 41

```

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1      5      10      15
Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
      20      25      30
Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Asn Ser Ser Gln Ser
      35      40      45
Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
      50      55      60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Gly
65      70      75      80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      85      90      95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
      100      105      110
Phe Cys Gln Gln His Phe Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
      115      120      125
Lys Leu Glu Ile Arg
      130

```

15 <210> 42
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(19)

25 <400> 42

```

Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1      5      10
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
      20      25      30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      35      40      45
Ser Thr Tyr Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu
      50      55      60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Leu Tyr Pro
65      70      75      80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
      85      90      95
Thr Leu Ser Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
      100      105      110
Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
      115      120      125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
      130      135

```

5 <210> 43
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1) ... (20)

<400> 43

```

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1      5      10      15
Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
      20      25      30
Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Asn Ser Ser Gln Ser
      35      40      45
Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
      50      55      60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Gly
65      70      75      80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      85      90      95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
      100      105      110
Phe Cys Gln Gln His Phe Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
      115      120      125
      Lys Leu Glu Ile Arg
      130

```

15 <210> 44
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(19)

25 <400> 44

```

Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1      5      10      15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
      20      25      30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      35      40      45
Ser Thr Tyr Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu
      50      55      60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Leu Tyr Pro
65      70      75      80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
      85      90      95
Thr Leu Ser Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
      100      105      110
Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
      115      120      125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
      130      135

```

5 <210> 45
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) ... (20)

<400> 45

```

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1      5      10      15
Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
      20      25      30
Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Asn Ser Ser Gln Ser
      35      40      45
Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
      50      55      60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Gly
65      70      75      80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      85      90      95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
      100      105      110
Phe Cys Gln Gln His Phe Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
      115      120      125
Lys Leu Glu Ile Arg
      130

```

15 <210> 46
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) ... (19)

25 <400> 46

ES 2 548 714 T3

```

Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1      5      10
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20      25      30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35      40      45
Ser Thr Tyr Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu
 50      55      60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Leu Tyr Pro
 65      70      75      80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85      90      95
Thr Leu Ser Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100     105     110
Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
 115     120     125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130     135

```

5 <210> 47
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(20)

<400> 47

```

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1      5      10
Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20      25      30
Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Asn Ser Ser Gln Ser
 35      40      45
Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50      55      60
Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Gly
 65      70      75      80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Met Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85      90      95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
 100     105     110
Phe Cys Gln Gln His Phe Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115     120     125
Lys Leu Glu Ile Arg
 130

```

15 <210> 48
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(19)

25 <400> 48

```

Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1          5          10          15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
          20          25          30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe
          35          40          45
Lys Thr Tyr Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu
          50          55          60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Ile Tyr Pro
65          70          75          80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
          85          90          95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
          100          105          110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
          115          120          125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
          130          135

```

5 <210> 49
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) ... (20)

<400> 49

```

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1          5          10          15
Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Ser Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
          20          25          30
Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Ser
          35          40          45
Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
          50          55          60
Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
65          70          75          80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser
          85          90          95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
          100          105          110
Ile Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          115          120          125

```

15 <210> 50
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) ... (19)

25 <400> 50

ES 2 548 714 T3

```

Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly
 1      5      10      15

Val Tyr Ser Gln Val Gln Val Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
 20      25      30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu
 35      40      45
Thr Arg Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50      55      60
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser
 65      70      75
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr
 85      90      95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100     105
Tyr Tyr Cys Ala Tyr Pro Asp Gly Ser Tyr Ala Ala Pro Asn Gly Met
 115     120     125
Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Ser
 130     135     140

```

5 <210> 51
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 51

```

Arg Tyr Trp Met Gln
 1      5

```

10
 15 <210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 52

```

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
 1      5      10      15
Gly

```

20 <210> 53
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 53

```

Pro Asp Gly Tyr Tyr Ala Ala Pro Tyr Gly Met Asp Tyr
 1      5      10

```

30 <210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 54

```

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala
 1      5      10

```

ES 2 548 714 T3

5 <210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 55

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp
1 5

10 <210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

15 <400> 56

Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

20 <210> 57
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

25 <400> 57

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

30 <210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

35 <400> 58

Ala Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

40 <210> 59
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 59

Pro Asp Gly Ser Tyr Ala Ala Pro Asn Gly Met Glu Tyr
1 5 10

45 <210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

50 <400> 60

ES 2 548 714 T3

Arg Ala Ser Gly Ser Ile His Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

5
<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 61

Asn Ala Glu Thr Leu Ala Asp
1 5

10

15
<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 62

Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp Thr
1 5

20

25
<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 63

Thr Phe Ile Met Ser
1 5

30

35
<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 64

Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Phe His Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

40

45
<210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 65

Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Tyr Phe Ser Tyr
1 5 10

<210> 66
<211> 17

ES 2 548 714 T3

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 66

5
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Gly Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 67

Phe Ala Ser Thr Arg Asp Ser

15
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 68

Gln Gln His Tyr Asp Thr Pro Tyr Thr
1 5

25
<210> 69
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

30
<400> 69

Thr Tyr Ile Met Ser
1 5

35
<210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

40
<400> 70

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

45
<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

50
<400> 71

ES 2 548 714 T3

Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

5
<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 72

Asn Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

10

15
<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 73

Phe Ala Ser Thr Gly Glu Ser
1 5

20

25
<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 74

Gln Gln His Phe Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

30

<210> 75
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 75

Ser Phe Val Met Ser
1 5

35

40
<210> 76
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 76

Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Ser Phe His Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5
<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 77

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

10
15
<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 78

Phe Thr Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

20
25
<210> 79
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 79

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

Gly

30
35
<210> 80
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 80

Thr Tyr Trp Ile Glu
1 5

40
45
<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 81

ES 2 548 714 T3

Glu Ile Leu Pro Gly Arg Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

5 <210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 82

Glu Ser Lys Leu Gly Asp Asp Asp Tyr
1 5

10

15 <210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 83

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

20

25 <210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 84

Asp Thr Thr Lys Leu Ala Ser
1 5

30 <210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

35 <400> 85

Phe Gln Gly Ser Glu His Pro Leu Thr
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo monoclonal que se une a IL-31 humana, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado ante la American Type Culture Collection que tiene la Designación de depósito de patente ATCC PTA-6815; en donde dicho anticuerpo comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada el cual es una IgG4 humana; en donde dicho dominio constante de IgG4 humana tiene una mutación Ser a Pro en la posición 241 de Kabat.
- 10 2. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente:
un promotor de la transcripción;
un segmento de ADN comprendiendo el polinucleótido de la reivindicación 1; y
un terminador de la transcripción.
- 15 3. Una célula cultivada que comprende el vector de expresión de la reivindicación 2, en donde la célula expresa el anticuerpo monoclonal codificado por el segmento de ADN.
- 20 4. La célula cultivada de acuerdo con la reivindicación 3, en donde las células son células eucariotas.
5. La célula cultivada de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las células eucariotas son células de ovario de hámster chino (CHO).
- 25 6. Un método para producir un anticuerpo monoclonal que comprende:
cultivar una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-5; y
recuperar el anticuerpo monoclonal expresado.

Figura 1: Secuencias numeradas según Kabat. Las CDR están indicadas mediante subrayado.

VL	1	10	20	35	40	50	60	70	80	90	100			
NOMBRE														
292.12.3.1	DIQNTOSPASLSASVGETVTITCRASG-----NIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVPFRFSGSRSETOYSLKINSLQPEDFGSYQCQHFWSFPWFEGGGTKLEIK													
292.84.1.6	DIQNTOSPASLSASVGETVTITCRASG-----NIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVPFRFSGSRSETOYSLKINSLQPEDFGSYQCQHFWSFPWFEGGGTKLEIK													
292.63.5.3	DIVMTQSPSSLDMSEGGKVTMICKSSQSLNGSNQKNYLAWYQKPGQSPKLLVSEASTRDSGVPDRFIGSGSGTDFTLITNVQAEADLADYFCQOHYDTPYTFGGGTKLEIK													
294.144.3.5	ENVLTQSPAINASPGERVTMTCSASS-----SVSYMHWYQKSNSEPKIWIYDITTKLASGVPGRFSGSGSGNSYSILTISSMEAEADVATYFCQGEHPLTFGGGTTLEIK													
VH	1	10	20	30	36	40	50	65	70	80	90	103	110	
Nombre														
292.12.3.1	QVQLQQSGAELARPGASVNLSCKASGYTLTFRYMQWYKORPGQGLENI ³⁵ GALYEGGDTRYSO ⁴⁰ KEK ⁴⁵ KATLTADKSSSTAYMOLNLLRSEDSAVY ⁵⁰ CAFPDGYAAPYGMIDYWGQGTSTVTVSS													
292.84.1.6	QVQLQQSGAELARPGASVNLSCKASGYTLTFRYMQWYKORPGQGLENI ³⁵ GTLTYPGDGDTRY ⁴⁰ SO ⁴⁵ KFKGKASLTADKSSNTAYMOLNLLRSEDSAVY ⁵⁰ F ⁵⁵ CFR ⁶⁰ FDGYAAPYGMIDYWGQGTSTVTVSS													
292.63.5.3	EVLVDSGGDLVXPGGSLKLSCAASGTFSTFIMSWVROSPEKLEWVATINSGGYTFHPDSVAGRFTISRDNAMNTLYLQMSLRSEIDALY ⁸⁵ YCRARQEGWSSA ⁹⁰ --YFSTYWGQGTSTVTVSS													
294.144.3.5	QVQLQQSGPELMKPGASVKISCKATGTFSTYTI ³⁵ LEWIKORPFGHLENI ⁴⁰ GEILLPGRGTTNNAKFDGKATFT ⁴⁵ AE ⁵⁰ TSNTAYMOLLSIT ⁵⁵ SEDSAVY ⁶⁰ YCTTESKL ⁶⁵ -----GDDDYWGQGTSTVTVSS													

Figura 2: Secuencias numeradas según Kabat. Las CDR están indicadas mediante subrayado.

VL	1	10	20	35	40	50	60	70	80	90	100																																																																																													
NOMBRE																																																																																																								
292.12.3.1	D	I	O	M	T	Q	S	P	A	S	L	S	A	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	G	N	I	H	N	Y	L	A	W	Y	O	O	K	G	K	S	P	O	L	L	V	H	A	K	T	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	R	S	E	T	O	Y	S	L	K	I	N	S	L	O	P	E	D	F	G	S	Y	Y	C	O	H	E	N	S	T	P	W	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K
292.84.1.6	D	I	O	M	T	Q	S	P	A	S	L	S	A	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	G	N	I	H	N	Y	L	A	W	Y	O	O	K	G	K	S	P	O	L	L	V	H	A	K	T	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	R	S	E	T	O	Y	S	L	K	I	N	S	L	O	P	E	D	F	G	S	Y	Y	C	O	H	E	N	S	T	P	W	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K

VH	1	10	20	30	36	40	50	65	70	80	90	103	110																																																																																																				
Nombre																																																																																																																	
292.12.3.1	Q	V	L	Q	S	G	A	E	L	A	R	F	G	R	S	V	N	L	S	C	K	A	S	G	T	L	T	R	Y	M	Q	V	K	R	E	G	O	G	L	E	M	I	C	A	L	T	Y	P	G	D	G	D	T	R	Y	S	O	R	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	T	R	A	M	O	L	A	N	L	A	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	F	F	D	G	Y	A	A	P	Y	G	H	D	Y	W	G	Q	T	S	V	T	V	S
292.84.1.6	Q	V	L	Q	S	G	A	E	L	A	R	F	G	R	S	V	N	L	S	C	K	A	S	G	T	L	T	R	Y	M	Q	V	K	R	E	G	O	G	L	E	M	I	C	A	L	T	Y	P	G	D	G	D	T	R	Y	S	O	R	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	T	R	A	M	O	L	A	N	L	A	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	F	F	D	G	Y	A	A	P	Y	G	H	D	Y	W	G	Q	T	S	V	T	V	S

